

UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement

Relation entre structure, réactivité et interactions cellulaires de nanotubes inorganiques ; cas des imogolites

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Discipline : Géosciences de l'Environnement

Ecole doctorale: Sciences de l'Environnement

Présentée et soutenue publiquement par

Astrid AVELLAN

Le 9 décembre 2015

JURY

M. Kevin WILKINSON	Full professor, université de Montréal	Rapporteur
M. Karim BENZERARA	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Pascale BAUDA	Professeur, université de Lorraine	Examinatrice
Mme Corinne CHANEAC	Professeur, UPMC	Examinatrice
Mme Wafa ACHOUAK	Directeur de recherche, CNRS	Examinatrice
M. Jérôme ROSE	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
M. Armand MASION	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse
M. Clément LEVARD	Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse

UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement

Relation entre structure, réactivité et interactions cellulaires de nanotubes inorganiques ; cas des imogolites

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Discipline : Géosciences de l'Environnement

Ecole doctorale: Sciences de l'Environnement

Présentée et soutenue publiquement par

Astrid AVELLAN

Le 9 décembre 2015

JURY

M. Kevin WILKINSON	Full professor, université de Montréal	Rapporteur
M. Karim BENZERARA	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Pascale BAUDA	Professeur, université de Lorraine	Examinatrice
Mme Corinne CHANEAC	Professeur, UPMC	Examinatrice
Mme Wafa ACHOUAK	Directeur de recherche, CNRS	Examinatrice
M. Jérôme ROSE	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
M. Armand MASION	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse
M. Clément LEVARD	Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse

Remerciements

Quelle aventure !

Après ces trois années de labeur dans l'enthousiasme, je suis ravie d'avoir l'occasion de remercier ici tous ceux qui ont fait que ma thèse ce soit si bien déroulée !

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont évalué ma thèse. Merci aux rapporteurs, Karim Benzerara et Kevin Wilkinson, ainsi qu'à la présidente du jury, Pascale Bauda, et aux examinateurs Corinne Chanéac, Wafa Achouak et Jérôme Rose d'avoir lu avec un regard éclairé mes travaux et d'y avoir apporté une expertise de très grande qualité.

Je voudrais remercier très sincèrement mes deux directeurs ainsi que mes deux soutiens de l'ombre sans qui cette thèse aurait eu une toute autre couleur...

Tout d'abord mon directeur Armand; tu m'as fait avancer sur plusieurs tableaux ! Ta justesse scientifique m'a permis de me hisser à un niveau d'exigence et à une rigueur (si, si ! Du moins, c'est en cours d'acquisition !) que je n'avais pas avant de commencer cette thèse. Tu as également permis de transformer des moments qui auraient pu être critiques en instants clefs dans la réussite de ma thèse, malgré mon envie de fuir à toutes jambes ! Mon co-directeur, Clément, je te dois un grand merci ! Je peux dire que grâce à toi les imogolites n'ont pas eu de secret pour moi bien longtemps. Bien des situations se sont débloquées alors que je t'envoyais des mails de spams, que je faisais irruption dans ton bureau ou que je t'appelais à pas d'heure pour une question existentielle. Tes encouragements, ton écoute amicale (même pour mes blagues pourries !) et ta bienveillance ont été sans égale. Malgré ta signature officielle pas terrible, je suis très heureuse d'avoir été ta première thésarde !

Viennent ensuite Jérôme et Perrine. C'est en partie vous, les initiateurs ... Je me souviens encore de votre appel téléphonique pour m'embaucher en CDD alors que j'étais fraîchement sortie du master ! Jérôme, travailler avec toi est une chance et un plaisir ! Merci pour ta disponibilité et ton aide malgré ton emploi du temps surligné en jaune fluo, et pour la grande bonté avec laquelle tu le fais. Perrine, c'est toi qui m'a ouvert les portes des laboratoires (très beau trousseau !). Tu as pris le temps de tout m'apprendre, de tout me montrer, dans les meilleures des conditions. Merci pour ta sympathie, ta connaissance des X, et tes petits gâteaux !

Merci à tous les quatre de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir offert ces conditions de travail exceptionnelles, dans une ambiance aussi agréable.

Mais tout ça ne serait rien sans une team de qualité ! Tous les membres d'InterfasT ont, de près ou de loin, participé à cette épopée ! Merci à tous, Jean-Yves le papa, Mélanieuh la blonde futée, Jérôme L le pro de l'argile, Daniel toujours là pour un coup de main, Hélène et Bernard les ICPIens, Jean-Paul le sifflement à gauche, Vladimir la chansonnette à droite, Naresh aux blagues impénétrables (ou presque), mais aussi Fabienne, Isabelle, Samuel, Wei, Ester, Manu, Clément La., Danielle, Lorette, Anne, Yuljia et Marie. Sans oublier la génialissime Sylvie, toujours au top, à toute heure, dans toute circonstance !

Je pense aussi à mes labos d'adoption. Tout d'abord le LEMIRE. Merci à Wafa, Catherine, Thierry, Dr. Hamidat, Momo, Sylvain, Gillou, Marie, Desi, Nicolas et Blanche de m'avoir accueillie pendant une année, sans JAMAIS se plaindre de mes sifflements et de mes chansonnettes matinales. Vous avez été super. J'ai adoré votre humour de haut niveau ! Merci aussi à Coco pour m'avoir ouvert les portes de la cuisson micro-onde à l'UPMC et à Bénédicte pour son initiation à la titration !

Je fais bien évidemment un spécial big-up à mon bureau 211 ! Sans vous, rien n'aurait été pareil. C'est vrai, qu'aurait été ma thèse sans les cheveux fous d'une Paquita, le flegme inégalé d'un Bibi ou une Hélène à la patience d'ange ? Grâce à vous je peux ouvrir un terminal et créer un truc qui existe pas en ligne de commande, même sur mac ! Merci d'avoir été là. Et le bureau s'agrandit ! Merci aux anciens nouveaux du bureau, Clément F. pour ta poésie du quotidien et ta joie de vivre, et Jade pour ta douceur. Je dirais qu'en plus tu m'as littéralement nourrie pendant les derniers jours de thèse.

En restant dans l'architecture, je remercie aussi tous les copains du « 2^{ème} bureau », ceux toujours présents pour un réconfort, un café, un thé ou un coup de flip ! à commencer par Mister T. (you are the best -close enough !- my friend), Pierrot et NicoBo toujours prêts pour un bonne blague et Manon pour nos cafés matinaux (que dis-je, auroraux !). Tous ceux qui, de manière plus ou moins fugace, ont participé à l'ambiance : Moulinux, Jim, Alexia, Julie, Sophie, Chloé, Camille, Marcos, Anne, Céline, Guillaume, et en particulier ceux que j'oublie, merci !

Hors mur, les soutiens ont été précieux ! Merci à Nathan et ces blagues (nulles !! Et tant mieux), Nelly (plus à fond, tu meurs ! Et ça fait du bien !), PJ dit firefox (le pro du debrieff) et Léon (celle qui se retrouve dans deux paragraphes). J'ai tissé des liens forts avec vous quatre, et ça, c'est hibou ! Sans oublier les DromArdéchoix, ceux avec qui j'ai grandi. Ben, Thomas, Julien, Guillaume, Jo, Rémi, Simon et Gaël, que je ne vois pas assez à mon goût ! Et Claire et Sarah bien sûr. La personne que je suis aujourd'hui, c'est un peu grâce à vous.

Je veux enfin remercier ma famille, vous qui êtes mes fondations. Un immense merci à Jacques, Isabelle, Quentin et Marc pour leur soutien, leur encouragement et leur amour. Et enfin à Antoine pour ton épaullement à chaque épreuve, tes attentions qui m'ont permis d'avancer sereinement et ta joie !

Astrid
Décembre 2015

SOMMAIRE GENERAL

Chapitre I : Comprendre la toxicité des nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles. Etat de l'art et Objectifs.	7
1 Apparition des matériaux à l'échelle du nanomètre.	7
1.1 Historique.	7
1.2 Définitions	8
1.3 Législation relative aux nanomatériaux.....	9
2 Les nanomatériaux présentent-ils un risque pour l'environnement ?	10
2.1 La notion de risque	10
2.2 Exposition aux nanomatériaux	11
2.2.1 Scénarios de relargage de nanomatériaux	11
2.2.2 Le devenir des nanomatériaux dans l'environnement.....	12
2.3 Les événements toxiques que peuvent induire les nanomatériaux.....	13
2.3.1 Les mécanismes de toxicité.....	13
2.3.1.1 La génération d'espèces réactives de l'oxygène	14
2.3.1.2 Les mécanismes résultants de l'interaction nanomatériaux/bactéries...	16
2.3.2 Les caractéristiques physico-chimiques pouvant moduler ces toxicités	18
3 La nécessité d'un nanomatériau modèle, les nanotubes imogolites	22
3.1 Historique : les imogolites Al/Si	22
3.2 Une structure analogue aux imogolites : les Ge-imogolites.....	23
3.2.1 Les protocoles de synthèse	24
3.2.1.1 Etape 1 : obtention des précurseurs (proto-imogolites)	24
3.2.1.2 Etape 2 : formation et croissance des tubes.....	25
3.2.1.3 Etape 3 : désalinisation de la solution	25
3.2.2 La modification des caractéristiques physico-chimiques.....	25
3.2.2.1 Variation du nombre de parois	26
3.2.2.2 Variation de la cristallinité :	27
3.2.2.3 Variation de la taille	27
3.2.3 Utiliser les imogolites comme modèle.....	28
3.2.2.4 Les études de toxicité existantes	29
3.2.2.5 Les limites à leur utilisation	29
4 Le choix du modèle bactérien, <i>Pseudomonas brassicacearum</i> et des marqueurs de toxicité.....	31

4.1	Les bactéries comme modèle.....	31
4.2	Notre bactérie modèle, <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	32
4.2.1	Description du genre <i>Pseudomonas</i> et de l'espèce <i>P. brassicacearum</i>	32
1.6.4	Adaptation de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> à son environnement.....	33
4.2.1.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> et la rhizosphère.....	33
4.2.1.2	Variation phénotypique de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	34
4.3	La régulation génotypique en réponse à un stress.....	34
4.3.1	Les ARN non codants (ARNnc) régulateurs de l'expression génique.....	34
4.3.2	Les stratégies pour la régulation de l'homéostasie du fer.....	36
4.3.2.1	La chélation du Fe(III).....	37
4.3.2.2	La régulation génique.....	39
5	Objectifs et organisation de la thèse.....	42
	Références bibliographiques.....	44

Chapitre II : Matériels et Méthodes.....57

1 Matériels.....57

1.1 Les nanomatériaux.....57

1.1.1 Les protocoles pour le contrôle des caractéristiques des Ge-imogolites..... 57

1.1.1.1 L'optimisation du temps de croissance..... 57

1.1.1.2 Les modifications morphologiques..... 58

1.1.1.3 Les Ge-imogolites à défauts structuraux..... 58

1.1.1.4 L'ajout de fer dans la structure..... 59

1.1.1.5 La séparation de taille..... 59

1.1.1.6 Bilan des échantillons de Ge-imogolites obtenus..... 60

1.1.2 Les nanoparticules d'or..... 62

1.2 Les modèles biologiques et leur exposition aux nanomatériaux..... 62

1.2.1 La plante *Arabidopsis thaliana*..... 62

1.2.2 La bactérie *Pseudomonas brassicacearum*..... 62

1.2.2.1 Souches..... 62

1.2.2.2 Cultures et exposition aux nanomatériaux..... 63

1.3 Le suivi des réponses biologiques..... 64

1.3.1 Le suivi de croissance..... 64

1.3.2	Les tests de toxicités.....	64
1.3.3	La génération d'espèces réactives de l'oxygène	65
1.3.4	L'état de l'homéostasie du fer	66
2	Méthodes de caractérisations	67
2.1	Caractérisation physico-chimique	67
2.1.1	ICP (-MS et -AES)	67
2.1.2	Granulométrie.....	68
2.1.3	Zétamétrie.....	69
2.1.4	AFM	70
2.1.4.1	Principe.....	70
2.1.4.2	Protocoles et traitement de données	71
2.1.5	DRX	72
2.1.6	Spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX).....	73
2.1.6.1	Principe.....	73
2.1.6.2	Formalisme EXAFS	76
2.1.6.3	Analyse des données XAS	77
2.1.6.4	Mise en œuvre expérimentale	79
2.2	Les outils pour le suivi des interactions nanomatériaux/organismes	80
2.2.1	Microscope à champs sombre couplé à de l'imagerie hyperspectrale	80
2.2.1.1	Principe et acquisition des données.....	80
2.2.1.2	Traitement des données	82
2.2.1.2.1	La construction de la librairie hyperspectrale	82
2.2.1.2.2	L'identification des pixels d'intérêts.....	83
2.1	Nanotomographie aux rayons X.....	85
2.1.1	Principe de mesure	85
2.1.2	Préparation des échantillons et conditions de mesures	86
2.1.3	Traitement des données	87
2.1.3.1	Reconstruction 3D.....	87
2.1.3.1	Isolement et mesure des particules d'intérêts.....	87
3	Bilan du chapitre	88
	Références Bibliographiques	90

Chapitre III. Synthèses accélérées de Ge-imogolites	97
1 Introduction	97
1.1 Rappels bibliographiques	97
1.2 Objectifs du chapitre	98
2 La synthèse en fluide supercritique	99
2.1 Le principe.....	99
2.2 La synthèse d'imogolites en fluide supercritique.....	100
2.3 Résultats	100
2.4 Conclusions	102
3 Croissance des Ge-imogolites sous irradiation MW	103
3.1 Le principe.....	103
3.2 Résumé étendu de l'article	104
3.3 Accelerated Microwave Synthesis of Alumino-Germanates Imogolites Nanotubes.....	106
3.3.1 Abstract	106
3.3.2 Introduction	107
3.3.3 Experimental	108
3.3.4 Results and discussion.....	108
3.3.5 Outlook.....	113
3.3.6 Supporting information	114
4 Conclusions du chapitre.....	115
Références bibliographiques.....	116

Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la cristallinité des Ge- imogolites sur l'induction d'effets toxiques	123
1 Introduction et objectifs du chapitre	123
2 Modification de la croissance de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> en présence de Ge-imogolites à morphologies variables.....	125
2.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons	125
2.1.1 Le diamètre des tubes et leur nombre de parois	125

2.1.2	La longueur des tubes.....	127
2.1.3	La présence de lacunes.....	129
2.1.4	Les potentiels zéta	130
2.2	Etudes des effets des Ge-imogolites sur la croissance de <i>P. brassicacearum</i> ..	131
3	La modification des effets toxiques des Ge-imogolites en fonction de leurs défauts structuraux.	133
3.1	Résumé étendu de l'article	133
3.2	Influence of structure defects of Ge-imogolite nanotubes on their toxicity towards <i>Pseudomonas brassicacearum</i> bacteria.	135
3.2.1	Introduction	135
3.2.2	Material and methods	136
3.2.3	Results and discussion.....	138
3.2.4	Conclusion.....	143
3.2.5	Supporting information	145
4	Conclusions du chapitre.....	147
	Références bibliographiques.....	149

Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-imogolites sur les réponses de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>.....	155
1 Contexte scientifique	155
1.1 L'effet du dopage en Fer de nanomatériaux sur les réponses biologiques.....	155
1.2 L'importance de la régulation du fer et les mécanismes cellulaires associés....	156
1.3 Objectifs du chapitre.....	156
2 La synthèse de Ge-imogolites dopées en fer	157
2.1 Résumé étendu de l'article.	157
2.2 Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials.	159
2.2.1 Article.....	159
2.2.2 Conclusions	165
2.2.3 Supporting information	166
3 La modification des réponses de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> exposées aux Ge-imogolites dopées en fer ou non.	168

3.1	Résumé étendu de l'article.....	168
3.2	Iron-doping of Ge-imogolite inorganic nanotube; modulation of toxicity and afar biotransformation to bacteria in relation with iron homeostasis	170
3.2.1	Introduction	170
3.2.2	Materials and methods	172
3.2.2.1	Imogolite synthesis.....	172
3.2.2.2	Bacterial strain and culture.....	173
3.2.2.3	NPs exposure and bacterial growth.....	173
3.2.2.4	Toxicity mechanisms.....	173
3.2.2.5	Biodegradation and biodistribution.....	174
3.2.3	Results and discussion.....	175
3.2.3.1	Imogolite-bacteria interactions and toxicity.....	175
3.2.3.2	Iron homeostasis in bacteria exposed to imogolites.....	177
3.2.3.3	Fe-imo transformation in biotic and abiotic media.	179
3.2.3.4	ROS generation in <i>P. brassicacearum</i> exposed to imogolite.....	181
3.2.4	Conclusion.....	182
3.2.5	Supporting information	182
4	Conclusions du chapitre.....	184
	Références bibliographies	185

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules.....	195
1 Introduction et objectifs du chapitre	195
2 Etude des interactions entre des nanomatériaux d'or et des racines de plantes grâce à l'imagerie hyperspectrale.....	198
2.1 La construction des bibliothèques spectrales spécifiques aux nanomatériaux	199
2.2 La cartographie des nanomatériaux sur les images de racines exposées.....	202
3 La nanotomographie aux rayons X et la visualisation en 3 dimensions des nanomatériaux dans les cellules exposées.	205
3.1 La normalisation des histogrammes des volumes reconstruits.....	206
3.2 L'internalisation des NM dans les racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	207
3.3 Hypothèses sur les mécanismes d'internalisation et de transfert des	

nanomatériaux d'or dans les racines.....	210
3.4 Tester les limites de résolution spatiale de la nanotomographie aux rayons X en imageant les cellules de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	212
4 Conclusion du chapitre	214
Références bibliographiques.....	216

Chapitre VII : Conclusions générales et perspectives223

1 La synthèse de Ge-imogolites à caractéristiques contrôlées.....223

1.1 Variation de la longueur, du nombre de parois et de la cristallinité.....	223
1.1 Synthèse de tubes micrométriques et réduction du temps de croissance	224
1.1 L'incorporation de Fe dans la structure.....	225
1.2 Perspectives	225

2 Les interactions NM/cellules.....225

2.1 La modification des effets toxiques des Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques contrôlées.....	225
2.1.1 La morphologie	226
2.1.2 Les défauts structuraux.....	227
2.1.3 Le dopage en fer	227
2.2 Les mécanismes d'internalisations des NM dans les organismes	228
2.3 Perspectives	229

Références bibliographiques.....232

Liste des Figures et des Tableaux235

**Chapitre I : Comprendre la toxicité des
nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles.
Etat de l'art et Objectifs.**

SOMMAIRE

Chapitre I : Comprendre la toxicité des nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles. Etat de l'art et Objectifs.	7
1 Apparition des matériaux à l'échelle du nanomètre.	7
1.1 Historique.	7
1.2 Définitions	8
1.3 Législation relative aux nanomatériaux.....	9
2 Les nanomatériaux présentent-ils un risque pour l'environnement ?.....	10
2.1 La notion de risque	10
2.2 Exposition aux nanomatériaux	11
2.2.1 Scénarios de relargage de nanomatériaux	11
2.2.2 Le devenir des nanomatériaux dans l'environnement.....	12
2.3 Les événements toxiques que peuvent induire les nanomatériaux.....	13
2.3.1 Les mécanismes de toxicité.....	13
2.3.1.1 La génération d'espèces réactives de l'oxygène	14
2.3.1.2 Les mécanismes résultants de l'interaction nanomatériaux/bactéries...	16
2.3.2 Les caractéristiques physico-chimiques pouvant moduler ces toxicités	18
3 La nécessité d'un nanomatériau modèle, les nanotubes imogolites	22
3.1 Historique : les imogolites Al/Si	22
3.2 Une structure analogue aux imogolites : les Ge-imogolites.....	23
3.2.1 Les protocoles de synthèse	24
3.2.1.1 Etape 1 : obtention des précurseurs (proto-imogolites)	24
3.2.1.2 Etape 2 : formation et croissance des tubes.....	25
3.2.1.3 Etape 3 : désalinisation de la solution	25
3.2.2 La modification des caractéristiques physico-chimiques.....	25
3.2.2.1 Variation du nombre de parois	26
3.2.2.2 Variation de la cristallinité :	27
3.2.2.3 Variation de la taille	27
3.2.3 Utiliser les imogolites comme modèle.....	28
3.2.3.1 Les études de toxicité existantes	29
3.2.3.2 Les limites à leur utilisation	29
4 Le choix du modèle bactérien, <i>Pseudomonas brassicacearum</i> et des marqueurs de toxicité.....	31

4.1	Les bactéries comme modèle.....	31
4.2	Notre bactérie modèle, <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	32
4.2.1	Description du genre <i>Pseudomonas</i> et de l'espèce <i>P. brassicacearum</i>	32
4.2.2	Adaptation de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> à son environnement	33
4.2.2.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> et la rhizosphère.....	33
4.2.2.2	Variation phénotypique de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	34
4.3	La régulation génotypique en réponse à un stress	34
4.3.1	Les ARN non codants (ARNnc) régulateurs de l'expression génique.....	34
4.3.2	Les stratégies pour la régulation de l'homéostasie du fer	36
4.3.2.1	La chélation du Fe(III)	37
4.3.2.2	La régulation génique.....	39
5	Objectifs et organisation de la thèse.....	42
	Références bibliographiques	44

Chapitre I : Comprendre la toxicité des nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles. Etat de l'art et Objectifs.

1 Apparition des matériaux à l'échelle du nanomètre.

1.1 Historique.

Le préfixe « nano » est issu du grec ancien « nânos » signifiant « nain ». Il a été choisi en 1956 par le Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) pour nommer le nanomètre comme sous-unité du mètre ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). Cette échelle est utilisée pour exprimer des dimensions proches de l'échelle atomique. Par exemple, l'atome d'Hélium (le plus petit des atomes) présente un rayon atomique calculé d'environ $0,03\text{nm}$ [1] et le diamètre de la double hélice de l'ADN mesure environ $2,0\text{nm}$ [2]. Pour continuer dans les notions d'échelle, le diamètre d'un virus est d'environ 70nm et celui d'une bactérie de l'ordre de 1000nm .

Le terme « nano-technology » a été utilisé dès 1974 par le professeur Norio Taniguchi lors d'une conférence pour décrire la capacité à créer des matériaux de taille nanométrique [3]. Un autre repère temporel intéressant est, par exemple, l'obtention du prix Nobel de chimie par H.W. Kroto, R.F. Curl et R.E. Smalley en 1996 pour leur découverte des nanosphères de carbone C_{60} en 1985 [4]. Cependant, si ces notions et ces découvertes sont récentes, les nanomatériaux sont utilisés depuis des siècles. L'une des plus anciennes traces répertoriée de l'utilisation de matériaux nanométriques date du IV^{ème} siècle. Aussi, le vase de Lycurgus (Figure 1) contient des nanoparticules d'or, ce qui lui confère des propriétés optiques différentes selon l'éclairage du vase [5].



Figure 1 : Coupe romaine de Lycurgus datant du IV^e siècle avant J.C.

Photographie © British museum.

Du fait des nanoparticules d'or et d'argent qu'il contient, ce vase apparaît verdâtre à la lumière du jour (à gauche) et rougeâtre (à droite) lorsqu'il est éclairé de l'intérieur.

1.2 Définitions

Le terme « nanomatériau » a une définition en évolution.

A l'international, la norme ISO/TS 27687 :2008 définit les **nanomatériaux** comme « un matériau comportant au moins une dimension externe de taille inférieure à 100nm [6]. Les termes nanoparticules (NP), nanotube (NT) ou nanoplaque (NPI) désignent des nanomatériaux avec un nombre défini de dimensions inférieures au seuil de 100nm (respectivement, 3, 2 ou 1).

En Europe, la Commission Européenne a voulu prendre en compte le fait que les nanomatériaux sont souvent assemblés entre eux, et rarement à l'état individuel. Aussi elle a publié en 2011 ses « Recommandations relative à la définition des nanomatériaux » [7], les définissant comme (i) un matériel naturel, formé accidentellement, ou manufacturé, (ii) comportant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats et dont (iii) au moins 50% du nombre de particules présentent une ou plusieurs dimension externe comprises entre 1 à 100nm.

C'est sur cette base qu'en 2009 Auffan et coll. proposent que les critères définissant un nanomatériau soit défini non pas par sa taille, mais par le fait qu'il ait des propriétés différentes de ses analogues plus grands. Aussi, en faisant l'étude de la littérature portant sur la propriété de matériaux inorganiques ces auteurs ont montré que certaines particules inorganiques d'une taille supérieure à 30nm ne possédaient pas de propriétés physico-chimique particulières [8]. La Figure 2 illustre ces études bibliographiques et essais en laboratoires. L'exemple de modification de la réactivité des nanoparticules d'oxydes de fer vis-à-vis de l'arsenic du fait d'un réarrangement atomique qu'illustre cette étude montre bien que la taille seule n'est pas suffisante pour définir des propriétés physico-chimiques particulière des nanomatériaux.

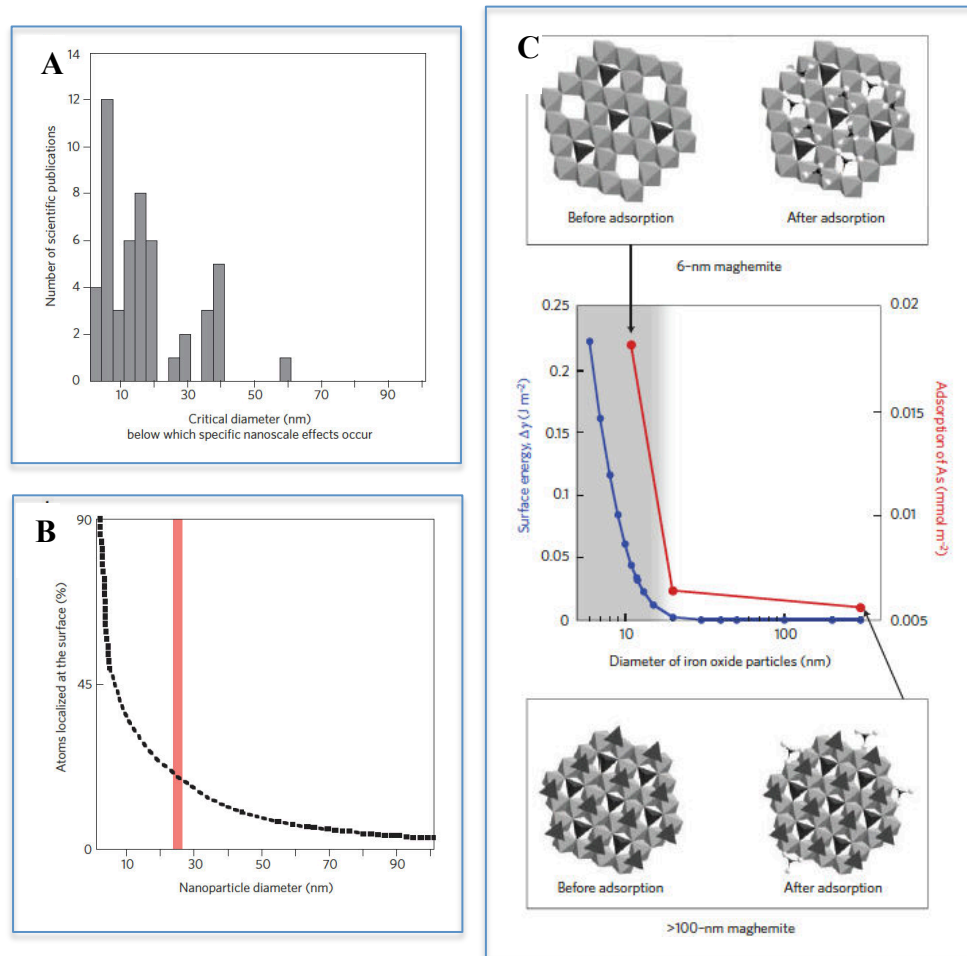


Figure 2 : Vers une nouvelle définition des nanomatériaux inorganiques? Il semble qu'il y ait une limite de taille de 30nm montrant (A) que la plupart des études identifient un effet nano spécifique pour des tailles inférieures à 30nm. (B) à ce seuil de taille, environ 20% des atomes à minima se trouvent être en surface. (C) dans le cas particulier de nanoparticules d'oxydes de fer, leur réarrangement atomique et leur réactivité vis-à-vis de l'arsenic est différent pour des nanoparticules de 6nm en comparaison à des tailles supérieures à 100nm. Figure adaptée de Auffan et coll. 2009 [8].

1.3 Législation relative aux nanomatériaux.

En France, depuis 2013 et l'article L.523-4 du code de l'environnement, il est devenu une « obligation de déclarer les quantités et les usages de **substances à l'état nanoparticulaire** produites, distribuées ou importées en France » dès qu'elles dépassent 100mg par an. Ces « substances à l'état nanoparticulaire » ont la même définition que celle allouée aux nanomatériaux par la Commission Européenne, décrite au dessus.

Le fondement scientifique de la limite de taille fixée à 100nm pour définir un nanomatériau est cependant peu fondé. Comme énoncé par les recommandations de la commission européenne de 2011, cette limite supérieure est basée sur un **consensus**, sans preuve scientifique que cette valeur soit la plus adéquate.

2 Les nanomatériaux présentent-ils un risque pour l'environnement ?

2.1 La notion de risque

Aujourd'hui, les nanotechnologies (i.e. l'utilisation de nanomatériaux dans des objets ou des processus) représentent un secteur en pleine expansion. Un inventaire de produits commerciaux dérivés des nanotechnologies, accessible à tous via internet est mis en ligne par le Woodrow Wilson International Center (www.nanotechproject.org). L'inventaire est basé sur les déclarations volontaires des fabricants. Ainsi, ils dénombrent 1800 produits contenant des nanomatériaux en vente libre à l'international en 2015 (contre 50 en 2005). De plus, l'US National Science Foundation (www.nsf.gov/nano) estime l'impact économique des nanotechnologies à travers le monde à plus de mille milliards de dollars et générerait plus de deux millions d'emplois. La plupart (60%) de la production mondiale de nanomatériaux est utilisée pour la production de produits de soins à la personne (textiles, crèmes solaires et cosmétiques). Certaines études ont estimé (en se basant sur les données accessibles) le tonnage de production des nanomatériaux par an, en fonction de leur nature chimique. Comme l'illustre la Figure 3, les quantités de nanomatériaux produites dans le monde et en Europe sont assez importantes et représentent plusieurs milliers de tonnes par an.

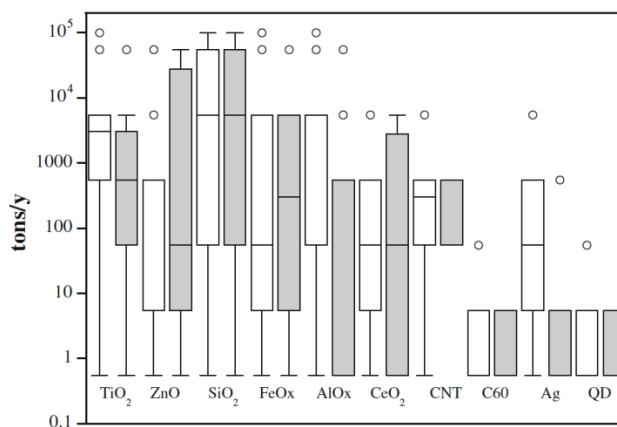


Figure 3 : Production annuelle (en tonnes/an) de différents nanomatériaux dans le monde (boîtes blanches) et en Europe (boîtes grises) d'après les données collectées par Piccinno et coll. en 2012[9]. La valeur médiane et les quantiles 25/75 sont représentés.

Il est ainsi indispensable de se poser la question : quels sont les **risques** associés à l'utilisation des nanomatériaux pour les nanotechnologies ? Le risque concernant l'utilisation d'un polluant est couramment défini comme la combinaison de deux facteurs : (i) **l'exposition** des organismes qui est fonction de **l'émission** des matériaux dans l'environnement ainsi que de

leur **devenir** (persistance, transport, dégradation) et (ii) leur **potentiel toxique**. Dans une optique de prévention des risques liés à l'utilisation des NM, il est important d'avoir les outils pour prédire ces événements.

2.2 Exposition aux nanomatériaux

L'exposition des organismes aux nanomatériaux va être dépendante de la quantité de nanomatériaux émis dans l'environnement ainsi que de leur persistance et de leur transport dans les différents compartiments environnementaux.

2.2.1 Scénarios de relargage de nanomatériaux

Un objet qui contient des nanomatériaux (NM) va subir tout le long de son cycle de vie (de l'extraction de ses matières premières à sa fin de vie) des procédés, des altérations ou des utilisations qui pourront mener au relargage des nanomatériaux dans les différents compartiments environnementaux (air, eau, sol). L'étude de tous les facteurs pouvant mener à ces relargages est basée sur l'Analyse du Cycle de Vie (ACV) d'un matériau. L'exemple de l'ACV d'un matériau de construction contenant du nano-TiO₂ est représenté en Figure 4. A chaque étape de son cycle de vie, de l'extraction de ses matières premières à sa fin de vie, en passant par son utilisation, plusieurs événements peuvent mener à l'émission de NMs dans les différents compartiments environnementaux (aérien, terrestre, aquatique ou sédimentaire).

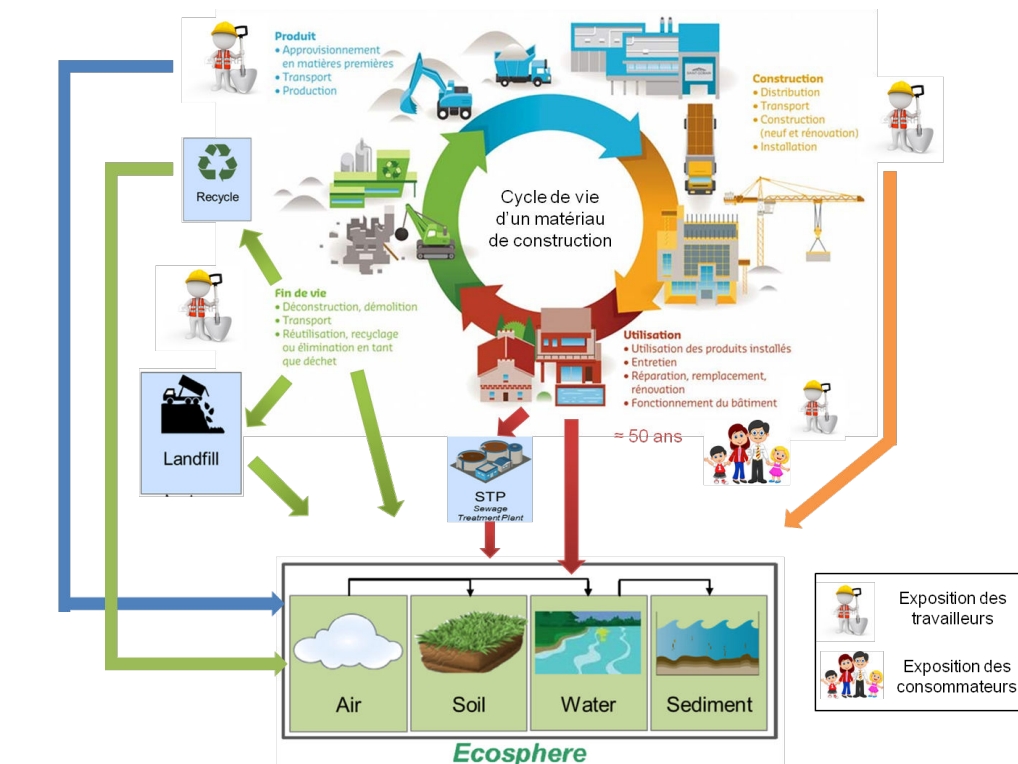


Figure 4 : Etapes du cycle de vie d'un produit de construction contenant du nano-TiO₂ et cibles exposées d'après Sun et coll. [10], <https://www.saint-gobain.com> et <http://fr.123rf.com>

Depuis plusieurs années, les efforts vont grandissant pour essayer de détecter et de quantifier la quantité et la nature de NMs émis dans différents compartiments environnementaux lors de l'utilisation des objets qui les contiennent.

Par exemple dans le cas du TiO_2 , Kaegi et coll. mettent en évidence l'émission dans les eaux de ruissellement de pluies des nanoparticules de dioxyde de titane ou d'argent issus de la lixiviation de ciments utilisés en construction. Ils retrouvent du nano- TiO_2 à des concentrations pouvant atteindre la centaine de mg.l^{-1} (selon l'âge des ciments et la quantité de pluies) [11], [12]. Kiser et coll. mettent en évidence la présence de nanoparticules de TiO_2 dans des boues de stations d'épuration américaine, sans toutefois pouvoir les quantifier [13]. Une étude plus récente, réalisée pendant la thèse de Nathan Bossa [14] vise à identifier les mécanismes de relargages des nanomatériaux issus de la dégradation de ciments photocatalytiques.

Quelques auteurs traitent également du relargage de nano-argent issu de vêtements. Il a été observé un relargage de nanoparticules d'argent (utilisées pour leurs propriétés antibactérienne) issues des chaussettes dans de l'eau distillée atteignant $1360 \mu\text{g}$ de nano-argent émis dans l'eau par gramme de chaussette [15]. Des t-shirts, contenant des nanos-argent, agités dans de l'eau de machine à laver (les auteurs ont mimé un protocole de lavage! relarguaient $46 \mu\text{g}$ de nano-argent par gramme de produit [16].

Les futurs challenges dans ce domaine consistent à développer des outils permettant de détecter et de caractériser les NMs dans les matrices complexes que sont les compartiments environnementaux ou les déchets. En 2014, avec l'équipe Hennebert, Avellan et nos collaborateurs nous avons détecté, grâce à plusieurs techniques de séparation et de détection, des nanomatériaux manufacturés dans des déchets industriels et ménagers [17].

Si la quantification de l'émission des nanomatériaux dans l'environnement est nécessaire, il est également indispensable de connaître et de prévoir leur devenir.

2.2.2 Le devenir des nanomatériaux dans l'environnement

Plusieurs facteurs peuvent influencer le devenir des nanomatériaux dans l'environnement : leurs **caractéristiques intrinsèques**, les **paramètres physico-chimiques** environnementaux dans lesquelles ils se trouvent, les **transformations** qu'ils pourront y subir et les objets avec lesquels ils pourront **interagir**.

Les principales modifications physico-chimiques qui peuvent modifier le devenir des NMs sont les suivantes :

La transformation chimique des nanomatériaux, qui peut induire plusieurs modifications physico-chimiques. **La dissolution** des nanomatériaux induit le relargage d'espèces ioniques ainsi que de leur diffusion. Le taux de dissolution des NMs peut être influencé par leur taille [18], ou la composition ionique du milieu [19]. Par exemple les NM d'Ag peuvent subir une sulfuration dans certaines conditions physico-chimiques, qui diminue leur solubilité [20]. Le relargage d'ions issus de ces dissolutions peut également induire un effet toxique [19].

Les phénomènes **d'agglomération**, qui résultent de la liaison de particules *via* des liaisons faibles (Van der Waals par exemple). La liaison entre des particules identiques (homo-agglomération) ou différentes (hétéro-agglomération), dictée par l'affinité qu'elles ont entre elles, pourra induire une **sédimentation** ou une **dispersion** des NMs. L'agglomération est réversible et peut induire une modification de la réactivité de surface des NM ainsi qu'une augmentation de leur taille [21]. **L'agrégation**, à l'opposé est un phénomène irréversible de liaison fortes (de type covalentes) de particules entre elles. **L'adsorption** à la surface des NM de molécules (macromolécules, ligands organiques ou inorganiques) peut amener à des phénomènes d'agrégation puis à leur sédimentation. Par exemple, l'adsorption de macromolécules comme de la matière organique, des polysaccharides, des protéines à la surface des NM peuvent modifier la charge de surface, le taux d'agglomération [22] et/ou la toxicité des NM [23]. Ces phénomènes sont fortement influencés par le pH, la composition ionique et/ou organique des eaux dans lesquels se trouvent les NM [24] et peuvent fortement modifier leur biodisponibilité, leur transport ainsi leur mobilité [25].

2.3 Les événements toxiques que peuvent induire les nanomatériaux.

De même que pour leur devenir dans l'environnement, les effets toxiques des nanomatériaux sont une thématique complexe.

2.3.1 Les mécanismes de toxicité

Comme vu précédemment, différents compartiment environnementaux, et donc différentes cibles peuvent être exposées aux nanomatériaux. Pour essayer de relier des événements toxiques ou des stress liés à des propriétés physico-chimiques particulières, il est plus judicieux de choisir des organismes assez simples, connus et abondants dans les différents compartiments environnementaux [26]. Aussi, les études bibliographiques suivantes ne ciblent que celles réalisées sur les bactéries. Les exemples cités ensuite ne sont pas une liste exhaustive de ce qui a été traité dans la littérature.

Plusieurs études bibliographiques récentes regardent les effets d'un nanomatériau ou d'un groupe de nanomatériaux particulier(s) sur les bactéries, comme par exemple les graphènes

[27], les nanomatériaux inorganiques [28] comme les ZnO [29], les CuO [30] ou TiO₂ [31], ou encore les nanomatériaux métalliques [32] comme l'or [33] ou l'argent [34].

Dans ces études, les réponses biologiques à l'exposition des bactéries aux nanomatériaux sont le plus souvent dues à la génération **d'espèces réactives de l'oxygène** (ROS pour l'acronyme Anglais Reactive Oxygen Species), l'accumulation de NM à la surface ou leur internalisation dans les cellules [35].

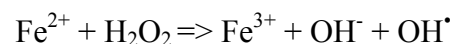
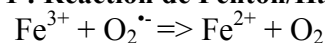
2.3.1.1 La génération d'espèces réactives de l'oxygène

La génération de ROS est très souvent identifiée comme étant l'un des mécanismes de toxicité principal induit par la présence de nanomatériaux [28]. Les ROS le plus souvent cités dans les études d'exposition des bactéries aux NM sont

- les radicaux libres primaire : anion superoxyde O₂^{•-}, le radical hydroxyle OH[•]
- Les espèces non radicalaires : le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Notons que le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre, il est très réactif et peut produire des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (étape du cycle de Haber-Weiss) décrite en Équation 1 qui, en présence de Fe (III) va mener à la formation de superoxydes, très toxiques pour les cellules.

Équation 1 : Réaction de Fenton/Haber-Weiss



La présence de ROS n'est toxique que si elle induit un stress oxydant. Ce stress oxydant apparaît lorsqu'il existe un déséquilibre entre la présence de ROS dans les cellules, et les réponses mises en places pour y faire face (réponse enzymatiques par exemple). Dans le cas d'un stress oxydant, les ROS pourront altérer les membranes plasmiques, les protéines ou l'ADN de la cellule [28].

Si les ROS dans les cellules sont utilisées dans certaines fonctions métaboliques comme la chaîne respiratoire, **les NM peuvent induire la génération** de ROS à l'intérieur de la cellule *via* différents mécanismes (comme illustré en Figure 5) et potentiellement induire un stress oxydant.

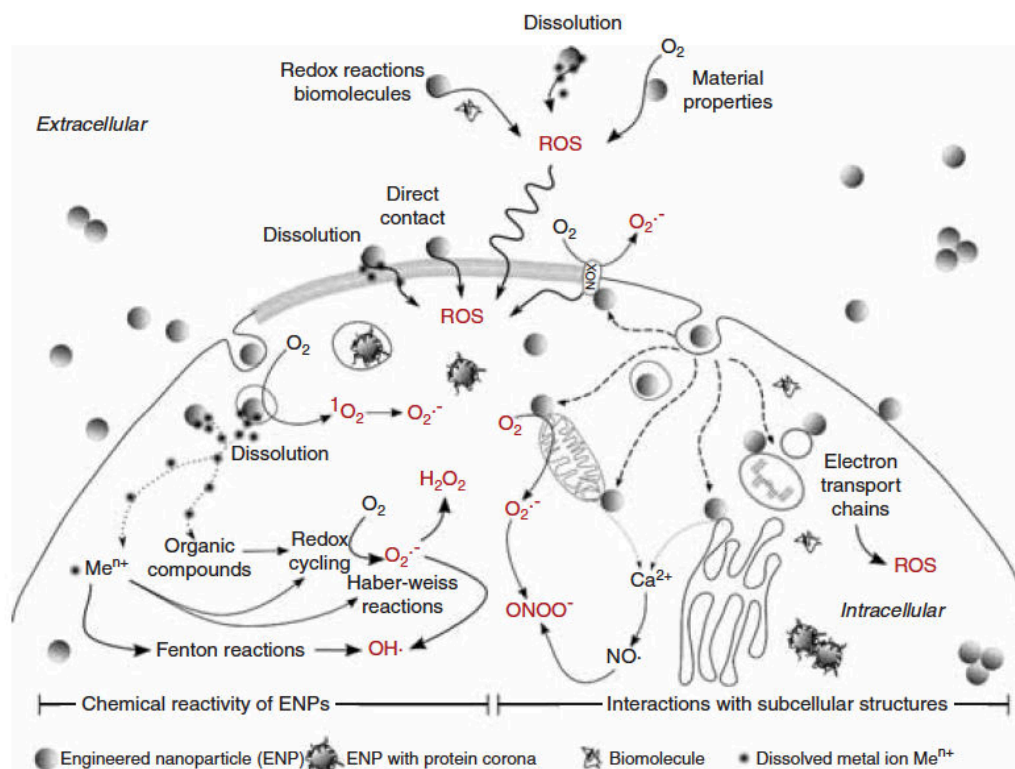


Figure 5 : Illustration des mécanismes de génération de ROS par les NM dans les cellules. Figure issue de Moos et Slaveykova, 2014 [28].

L'adsorption de polluants et de métaux lourds sur les NM pourront créer des ROS en cas d'adsorption à la surface de la cellule [36], ou d'internalisation dans la cellule (effet cheval de Troie) [37].

La **dissolution** des NM est un événement récurrent dans la toxicité des nanomatériaux. Une étude réalisée sur 19 nanoparticules inorganiques montre que le relargage d'ions métalliques est l'un des facteurs les plus importants déterminant les toxicités [38]. Le relargage et la diffusion dans la cellule bactérienne de ces ions sont très souvent générateurs de stress oxydant [39].

Des **réactions redox** entre les NM et les molécules présents dans le milieu peuvent survenir, induisant la génération de ROS [40] (capables de diffuser à travers les membranes cellulaires). On pourrait citer par exemple l'oxydation du cérium III en cérium IV qui augmente l'effet toxique des CeO_2 [41], ou encore l'activité photocatalytique des nano TiO_2 induisant des ROS et du stress oxydant [42].

L'émission de ROS semble également être induite par certaines caractéristiques physico-chimiques de NMs comme la présence de **sites lacunaires, ou d'impuretés métalliques**, même si les mécanismes de ces liens ne sont pas élucidés [28].

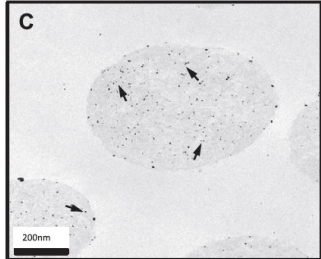
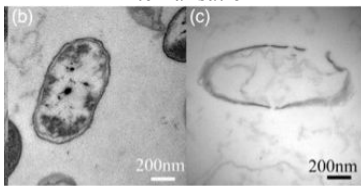
2.3.1.2 Les mécanismes résultants de l'interaction nanomatériaux/bactéries

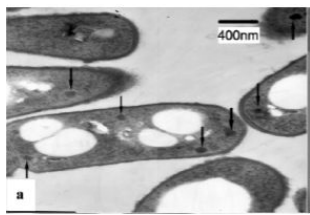
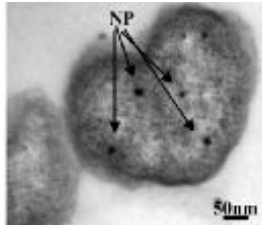
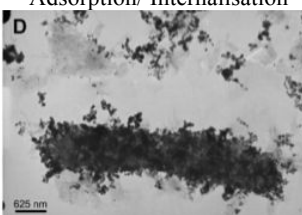
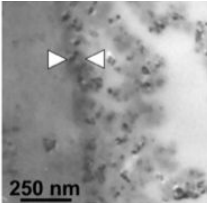
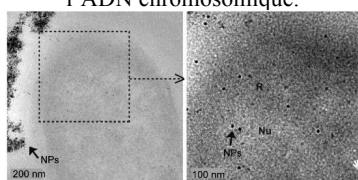
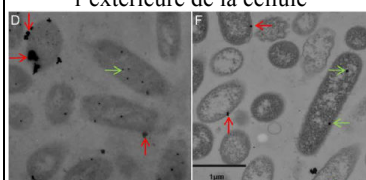
Plusieurs études ont montré que la toxicité directe des nanomatériaux (non dues à des phénomènes de dissolution, par exemple), nécessitait un **contact direct** entre les bactéries et les NM [35], [41], [43]–[45]. Ces interactions peuvent résulter en une adsorption ou une internalisation dans les cellules.

L'adsorption des NM en surface des cellules peut changer la perméabilité de la membrane cellulaire et ainsi perturber les échanges ioniques qui ont lieu à travers elle [35], causer la mort de la cellule [44] ou l'arrêt de sa division cellulaire.

L'internalisation des NM peut induire leur dissolution dans les cellules et une toxicité due aux ions métalliques relargués dans la cellule [35]. De plus, certaines études ont mis en évidence l'interaction des NM avec les métabolites présents dans le cytoplasme ainsi qu'avec l'ADN bactérien pouvant induire des phénomènes génotoxiques. [46]. Cependant, l'internalisation de NM dans les enveloppes cellulaire bactériennes est un sujet à débat. Si nombre d'articles concluent à une internalisation des nanomatériaux dans les bactéries (Tableau 1), les techniques utilisées sont systématiquement réalisées après une étape de section ultrafine des cellules, le plus souvent suivie d'une analyse au Microscope Electronique à Transmission (TEM) couplée à une caractérisation élémentaire. Ainsi, il persiste un doute quant aux artefacts d'observations du fait des méthodes de préparation des échantillons [47].

Tableau 1 : exemple d'études observant une internalisation de nanomatériaux, et les techniques utilisées.

Auteur et année	NM	Bactéries	Observation de l'internalisation	Exemple de résultats et conclusion des auteurs
Kumar et coll. ; 2011 [46]	ZnO and TiO ₂	<i>Salmonella typhimurium</i>	MET Cytométrie de flux	Internalisation 
Tam et coll., 2008 [48]	ZnO nanorods	<i>Escherichia Coli</i> <i>Bacillus atrophaeus</i>	MET	Internalisation 
Huang et coll., 2008 [49]	ZnO	<i>Salmonella agalactiae</i> <i>Salmonella aureu</i>	MET	Internalisation

				
Brayner et coll., 2006 [50]	ZnO	<i>Escherichia coli</i>	MET	Internalisation 
Jiang et coll., 2009 [51]	Al ₂ O ₃ SiO ₂ TiO ₂ ZnO	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	MET	Adsorption/ Internalisation 
Sondi & Salopek-Sondi, 2004 [52]	Ag	<i>Escherichia Coli</i>	MET	Internalisation 
Zhao et coll., 2010 [53]	Au avec différents coatings	<i>Escherichia Coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MET	Internalisation dans la bactérie. Interaction avec les ribosomes et l'ADN chromosomique. 
Ravindranath et coll., 2011 [54]	Cr-Au (3,5 et 13nm et 40nm) Chromate (K ₂ CrO ₄)	<i>Shewanella oneidensis</i>	MET et RAMAN	Si chrome est vert (Cr(III) réduit lors de l'internalisation. Si rouge (Cr(VI) à l'extérieure de la cellule 

L'information obtenue par ces auteurs est alors une image en 2D, où subsiste toujours le doute : les NM observés sont-ils dans les cellules, où ont-ils été déplacés lors de la préparation des coupes ? Aujourd'hui encore, les débats vont bon train ; l'internalisation de NM dans les bactéries est-elle un réel mécanisme, ou est-ce le résultat d'artéfacts de préparation ?

Nous nous sommes durant cette thèse posés la question suivante

Question 1 ; Pouvons nous mettre au point des outils nous permettant l'étude d'une cellule bactérienne en 3D afin d'être convaincus (ou non) de l'internalisation de NM ?

2.3.2 Les caractéristiques physico-chimiques pouvant moduler ces toxicités

Comprendre et prévoir les effets des nanomatériaux est un challenge scientifique.

Si aujourd'hui un nombre assez important d'études portent sur la toxicité des NMs, la littérature ne permet pas toujours de faire des recoupements entre études du fait de la non caractérisation des nanomatériaux, ce qui freine la compréhension de l'apparition des mécanismes de toxicité.

Par exemple, les différences observées durant les dernières années concernant les effets biologiques des nanoparticules de carbone (C_{60}) [55]–[58] peuvent être expliquées en partie par la présence de résidus issus de leur synthèse et des solvants organiques utilisés pour les disperser [59]. De la même façon, une étude regardant l'impact de nano-Ag synthétisés avec différentes méthodes suggère que les nano-Ag mal lavées de leurs solvant induit une toxicité, même pour les souches d'*Escherichia coli* résistantes à l'argent. C'était le formaldéhyde utilisé en solvant qui était (au moins en partie) responsable de la toxicité [60].

Enfin, les nanotubes de carbone (NTC) sont un très bon exemple de matériaux peu caractérisés lors des tests de toxicité. La synthèse des NTC nécessite des précurseurs métalliques. Il est fréquemment utilisé du ferrocène ($C_5H_{10}-Fe-C_5H_{10}$) et parfois du nickelocène ($C_5H_{10}-Ni-C_5H_{10}$). Cette étape mène à la présence d'**impuretés métalliques** de Fe et de Ni, récemment identifiés (en 2012) comme étant responsables d'événements toxiques (l'induction de stress oxydants notamment) [61] et il est nécessaire de faire des étapes de post-purification pour pouvoir étudier la toxicité intrinsèque des NTC. De plus le caractère hydrophobe des NTC induit leur organisation en fagots dans les milieux utilisés pour les tests de toxicité, nécessitant l'utilisation de tensio-actifs qui modifient les réponses cellulaires lors de l'exposition aux NTC [62]. Enfin, **la dispersité** des caractéristiques morphologiques au sein d'un même échantillon NTC (disparité en diamètre, en longueurs, dégradation du tube lors des études de toxicité) rend compliqué le lien entre leurs caractéristiques et les toxicités qu'ils induisent [63].

Ces quelques exemples montrent bien que les NM doivent être caractérisés **avant**, **pendant** (pour connaître les transformations des NM qui peuvent modifier leurs propriétés et leurs interactions avec le vivant) mais également **à la fin** des tests de toxicités pour réellement comprendre les mécanismes qu'ils induisent.

En réalité, comme illustré en Figure 6, un nanomatériau peut être défini par plusieurs caractéristiques physico-chimiques différentes qui peuvent moduler leurs propriétés et leurs effets toxiques. Pour pouvoir prévoir les effets toxiques des NM, il est nécessaire de comprendre comment ces paramètres physico-chimiques vont influencer les réponses toxiques des organismes ou des cellules exposées. Ce constat avait déjà été fait il y a quelques années par Auffan et coll. en 2009 qui avaient essayé d'établir une liste des événements physico-chimiques pouvant apparaître à la surface des nanomatériaux (en Figure 6) et ainsi modifier leurs effets sur le vivant.

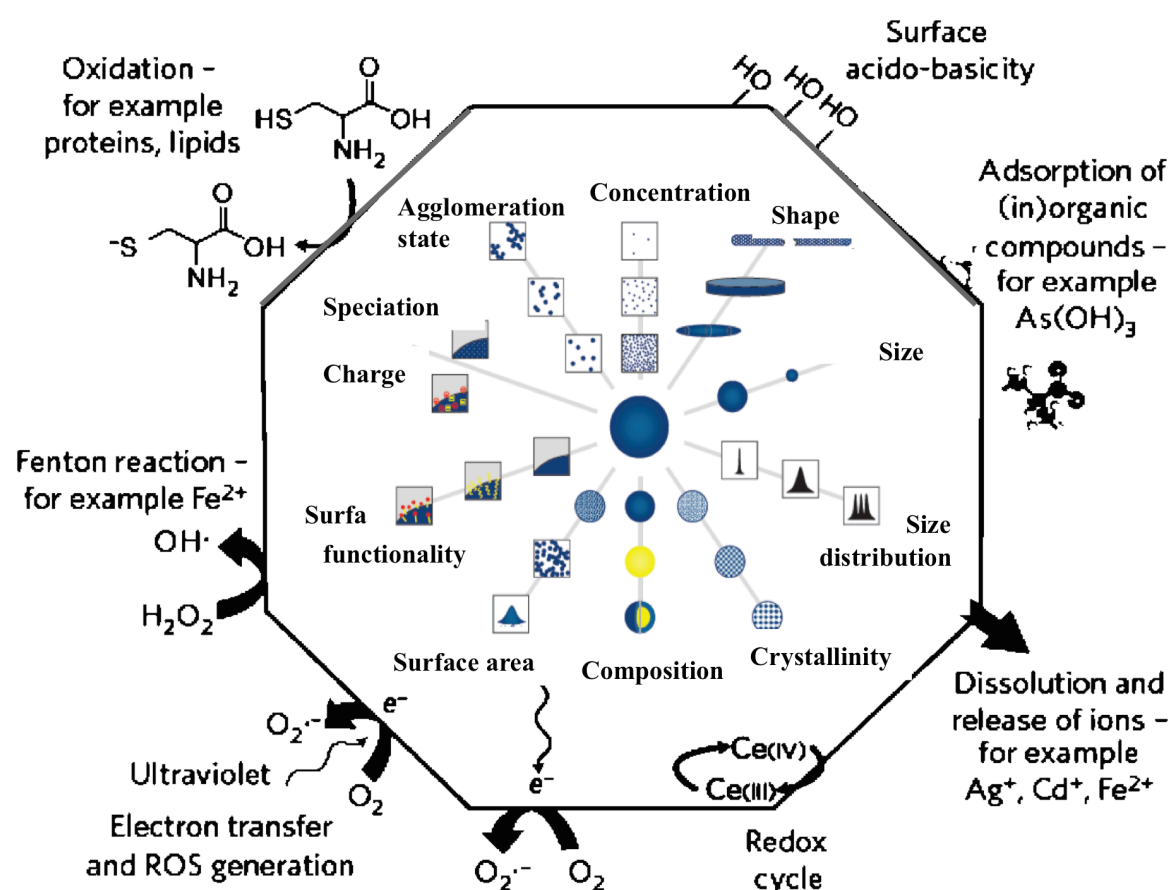


Figure 6 : Propriétés des nanomatériaux pouvant induire différents mécanismes physico-chimiques à la surface des nanomatériaux impliqués dans les mécanismes de toxicité (figure adaptée de Hassellöv et coll. 2008 [64] et Auffan et coll. 2009[8]). Chacune de ces propriétés physico-chimiques intrinsèques aux nanomatériaux peut influencer leur devenir dans l'environnement et les réponses toxiques qu'ils induisent.

Quelques reviews plus récentes réalisées par Suresh et coll. (2012) [65] ou encore Djuricic et coll. 2015 [35] recensent les études de toxicité réalisées sur des bactéries en essayant de relier les propriétés physico-chimiques et les mécanismes de toxicité microbienne. Voici des exemples de paramètres physico-chimiques identifiés dans ces articles comme étant les modulateurs principaux de l'(éco)toxicité des NM.

Les charges de surface semblent déterminant dans les processus d'interactions (adsorption ou internalisation) des NM dans les bactéries [41], [66]–[68]. Les NM chargés positivement sont électrostatiquement attirés par les membranes négatives des bactéries. Par exemple, une étude a investigué la toxicité de nanoparticules d'argent avec différents enrobages présentant différentes charges de surface [69]. Les auteurs ont montré que la toxicité envers les bactéries diminuait avec la charge. Cependant, l'interaction des nanoparticules avec le milieu ou les cellules n'a pas été monitoré, et les mécanismes de toxicité restent inconnus.

La morphologie des NM: La taille d'un NM peut influencer sa solubilité et sa cinétique de dissolution. En effet, les petites tailles, et donc les **grandes surfaces spécifiques** de NM peuvent induire une plus grande dissolution [70]. Comme vu plus haut, le relargage d'ions peut être toxique pour les cellules, la taille étant donc indirectement liée à une augmentation de la toxicité. Il est important d'insister sur le fait que lors de l'étude de la toxicité des NM, si l'expression des résultats en concentrations peut évoquer un effet toxique plus important, la normalisation des résultats par un nombre de NM ou en **surface spécifique** par cellule peut gommer cette différence [71]. **Les états d'agglomération** (et donc la modification des répartitions de tailles) des nanoparticules en solution sont étroitement liés avec les conditions physico-chimiques du milieu utilisé (pH, force ionique) et nécessite une caractérisation systématique. D'ailleurs, à taille de nanoparticules de dioxyde de cérium égale, une étude montre qu'en fonction du milieu utilisé, les événements toxiques étaient modifiés, certainement du fait de leur état d'agglomération [72]. L'agglomération est un phénomène réversible et les NM agglomérés dans un média pourront également être redispersés en la présence d'agents stabilisants (comme des protéines par exemple). Cependant, si les événements d'agglomération des nanomatériaux peuvent effectivement affecter leur mobilité, les propriétés intrinsèques des nanomatériaux qui le composent ne sont pas nécessairement modifiées. D'ailleurs dans l'étude de Auffan et coll. l'adsorption de l'arsenic sur les maghemite étudiées n'était pas modifiée par leur état d'agglomération [73].

La composition et la pureté chimique sont également déterminantes. Par exemple, l'insertion de **dopants** (i.e. l'addition dans la structure de faibles concentration d'un élément) peut modifier la solubilité des nanoparticules de zinc dopées au fer et modifier leurs toxicités

[74]. Un autre exemple serait l'adsorption d'arsenic sur des oxydes de fer dont la co-contamination est plus toxique que l'un ou l'autre des matériaux [37].

A ce point de l'étude, un paradoxe intéressant à souligner est que les inquiétudes en termes de toxicité concernent les mêmes propriétés que celles que les chercheurs et les industriels s'efforcent d'exploiter (grande surface réactionnelle, réactivité accrue, nouvelles propriétés...). Il est donc extrêmement important de comprendre si ces matériaux comportent des potentiels de toxicité et de définir quelles sont les caractéristiques physico-chimiques qui déterminent, le cas échéant, cette toxicité. Il est en effet illusoire d'imaginer tester systématiquement la toxicité de la myriade de nanomatériaux existants, en développement ou en devenir ; la tâche est gigantesque et les moyens disponibles limités. Il est donc nécessaire de développer des approches génériques, basées notamment sur la compréhension des mécanismes de toxicité. Maîtriser les paramètres de toxicité devrait également permettre aux industriels de développer des matériaux moins dangereux, lorsque cela est possible ou envisageable.

Nous avons montré ici que certains paramètres physico-chimiques montraient des tendances communes à la modulation des événements de toxicité. Cependant les études sont trop disparates et les caractérisations de la physico-chimie des NMs trop peu complètes pour pouvoir faire un lien étroit entre les caractéristiques physico-chimiques des NMs et les toxicités qu'ils induisent.

3 La nécessité d'un nanomatériau modèle, les nanotubes imogolites

Le bilan de la littérature montre donc qu'un des verrous pour une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité concerne la **difficulté à contrôler finement l'ensemble des paramètres physico-chimiques des nanotubes**. L'utilisation de nanotubes dont les synthèses seraient mieux contrôlées et les paramètres physico-chimiques modulés finement permettraient de réduire les incertitudes quant aux mécanismes à l'origine de la toxicité. Nous avons choisi d'utiliser dans cette étude des **nanotubes inorganiques, les imogolites**.

Avec leur grand **rapport d'aspect** (rapport longueur/hauteur), les nanotubes forment une classe de nanomatériaux particulière. Du fait de leur forme fibreuse, cette classe de nanomatériaux évoque les dangers de l'amiante et l'on craint une toxicité comparable.

3.1 Historique : les imogolites Al/Si

Les imogolites peuvent se former naturellement dans les sols volcaniques et sont issus de l'altération de matériaux volcaniques (pierres ponce, cendres volcaniques). Elles ont été découvertes pour la première fois au Japon par Yoshinaga qui les nomme Imogolite (pour « glassy volcanic ash soil » (Imogo en japonais)) [75]. Elles sont décrites initialement sous **forme tubulaire**.

La première étude analysant la chimie d'imogolite naturelles quasiment pures, a été réalisée en 1969 par Wada et Yoshinaga décrivant leur composition chimique comme $1,1\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2,3\text{-}2,8\text{H}_2\text{O}$ [76]. Plus tard, en 1972, Cradwick et ses collaborateurs [77], se basant sur les premières études de la caractérisation structurale de l'imogolite, éditent une nouvelle formule : $\text{Al}_2\text{SiO}_3(\text{OH})_4$. C'est celle ci qui est aujourd'hui retenue et qui est utilisée pour décrire ce composé.

La découverte de la forme tubulaire de ces aluminosilicates a été observée pour la première fois par microscopie électronique et diffraction électronique. La taille du diamètre des tubes est alors mesuré finement (17-22Å) [78]. Pour ce qui est de la connaissance de l'arrangement chimique local, Cradwick et ses collaborateurs ont proposé un model de structure de l'imogolite sous forme de cylindre creux de 2nm de diamètre et de plusieurs nanomètres de long. La surface externe est composée d'octaèdres d'aluminium arrangés selon un feuillet de type gibbsite et la couche interne de tétraèdres de silicium greffés sur les lacunes de la couche dioctaédrique (Figure 7) [77].

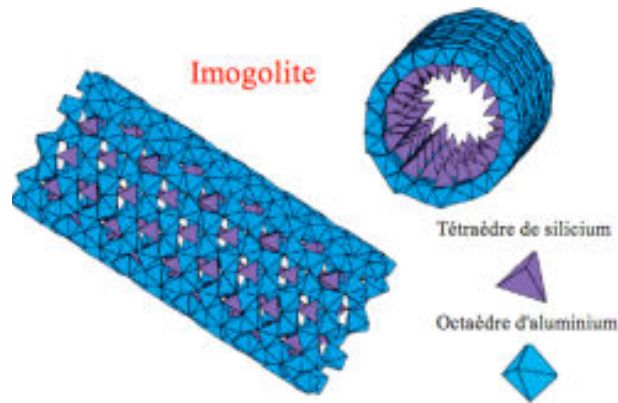


Figure 7: Structure de l'imogolite proposée par Cradwick et coll. en 1972 [77].

Des études plus récentes ont montré que les imogolites étaient impliquées dans plusieurs processus environnementaux, comme par exemple dans l'adsorption d'éléments trace métalliques [79], ou pour leur rôle sur le cycle du carbone. [80]

Le premier article traitant de la synthèse d'imogolites et a été réalisée par Farmer et ses collaborateurs en 1977 [81] (bien avant la synthèse nanotubes de carbones en 1991 [82]).

La première synthèse d'imogolites consistait donc en **une co-hydrolyse** de l'aluminium et du silicium sous forme inorganique ou alkoxide à température ambiante qui résultent en la formation des précurseurs des imogolites : les **proto-imogolites**. Les proto-imogolites sont décrits comme des aluminosilicates peu ordonnés avec un ordre local proche de celui des imogolites, en forme de tuile. [83] S'en suit une **phase de croissance** de 5 jours à 95°C durant laquelle les proto-imogolites se réarrangent en imogolites. Le temps de croissance influera sur la longueur des nanotubes. Il en résulte une suspension colloïdale ou un gel. Ce protocole a été par la suite amélioré. En 1979, Farmer et Fraser ont montré que la nature du contre ion des sels d'Al influe sur la croissance de l'imogolite : moins l'anion est complexant, meilleur sera le rendement de la réaction ($\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$) [84].

Cette synthèse d'imogolites permet donc d'obtenir des composés représentatifs chimiquement et structurellement de ceux que l'on retrouve dans les sols. Le problème majeur de ces synthèses est qu'elles ne fonctionnent que pour des concentrations initiales en réactifs très faibles (de l'ordre du millimolaire), et 5L de solution sont nécessaires pour obtenir 1g de produit.

3.2 Une structure analogue aux imogolites : les Ge-imogolites.

La découverte des analogues d'imogolites constituées de Al et de Ge a permis de faire des synthèses à grandes concentrations (le germanium étant plus stable sous forme dissoute dans

les conditions physico-chimiques des premières étapes de synthèse que le Si). Ces solutions concentrées ont permis de faciliter les caractérisations de ces matériaux, ouvrant la porte à divers projets de modifications des propriétés physico-chimique, d'études (éco)toxicologiques, et de compréhension des mécanismes de formation des imogolites.

3.2.1 Les protocoles de synthèse

En 1982, Wada et Wada ont substitué les atomes de silicium dans la structure de l'imogolite par des atomes de germanium à différents taux de substitution [85], résultant en un nouveau nanotube analogues aux imogolites ; les **Ge-imogolites** ($\text{Al}_2\text{GeO}_7\text{H}_4$). Beaucoup plus récemment, Levard et coll. ont mis au point un protocole permettant de synthétiser des Ge-imogolites en concentration molaires [86].

Le protocole utilisé par Levard et coll. en 2008 que l'on utilisera durant cette étude est décrit en Figure 8 :

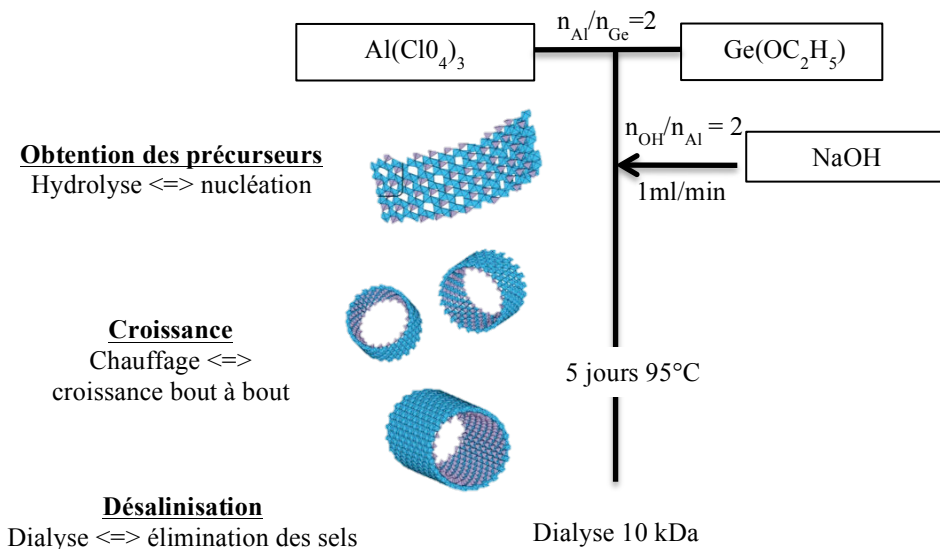


Figure 8 : Protocole et description des étapes de synthèse des Ge-imogolite comme décrit par Levard et coll. 2008 [86].

3.2.1.1 Etape 1 : obtention des précurseurs (proto-imogolites)

Les réactifs tétraéthoxygermanium ($\text{Ge}(\text{OEt})_4$) (TEOG) et perchlorate d'aluminium hydraté ($\text{Al}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) sont mélangés de façon à obtenir un rapport molaire $n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}}$ donné (de 2 le plus souvent). Ce mélange de réactifs est ensuite lentement hydrolysé (1ml/min) en ajoutant une solution de soude NaOH de concentration C_{OH} ($C_{\text{OH}}=C_{\text{Al}}$) jusqu'à ce que le **rapport d'hydrolyse R** ($n_{\text{OH}}/n_{\text{Al}}$) atteigne 2, résultant en une solution de proto-imogolites

Durant cette étape, comme nous le décrirons plus tard, il est possible de modifier la structure des objets résultants en modifiant les concentrations initiales en réactifs.

Ces proto-imogolites sont des particules en forme de tuiles, composées d'une couche externe d'aluminium octaédrique (type gibbsite) et d'une couche interne de tétraèdres de germanium. De même que pour les imogolites Al/Si les atomes de germanium se placent dans les lacunes de la couche de gibbsite induisant sa courbure en raccourcissant les liaisons O-O autour du site vaquant d'aluminium afin qu'elles correspondent à la distance de la liaison O-O du tétraèdre de Ge.

3.2.1.2 Etape 2 : formation et croissance des tubes

La solution de proto-imogolite est mise à chauffer en étuve à 95°C, pendant un minimum de 5 jours dans un pot en téflon empêchant l'évaporation de la solution. Cette étape permet la fermeture des proto-imogolite en tubes via un mécanisme que l'on pense être : fermeture des proto-imogolites en anneaux, puis auto-assemblage en tubes grâce à une croissance de type **collision bout-à-bout** entre anneaux/tubes [87]. Pendant une étude de 5 jours à 90°C regardant la cinétique de fermeture des proto-imogolites en tubes, Maillet et coll. ont montré qu'il persistait des proto-imogolites en solutions pendant plusieurs jours avant de ne voir plus que des tubes [87]. De plus, les distances Ge-O du tétraèdre de Ge étant plus longues que les distances Si-O du tétraèdre de Si, la courbure induite dans les tubes Ge est plus faible que dans le cas du Si. Ainsi le diamètre des Ge-imogolites est plus important que celui des Si.

3.2.1.3 Etape 3 : désalinisation de la solution

La solution de nanotubes est ensuite placée dans une membrane de dialyse de porosité 10kDa (environ 4 à 5m), immergée dans de l'eau milliQ. L'eau sera changée jusqu'à ce que sa conductivité atteigne $5\mu\text{S.cm}^{-1}$. Cette étape permet d'éliminer les sels résiduels.

Ce protocole permet d'obtenir des solutions de Ge-imogolites à **concentrations molaires** lorsque les synthèses des imogolites Al/Si étaient limitées à des concentrations millimolaires.

3.2.2 **La modification des caractéristiques physico-chimiques**

L'avantage d'utiliser ces Ge-imogolites, en plus de pouvoir les synthétiser en grandes quantités, est la possibilité de faire varier leurs caractéristiques physico-chimiques une par une en variant légèrement les conditions de synthèse.

3.2.2.1 Variation du nombre de parois

L'existence des nanotubes doubles parois (DW pour Doubled-Walled en Anglais) et de nanotubes simple parois (SW pour Singled-Walled en Anglais) a récemment été mise en évidence par Maillat et coll. [87]. Ils ont été obtenus en modifiant le protocole de Levard et coll. [86] décrit ci-avant. L'utilisation de concentrations initiales en aluminium (C_{Al}) de 0,25 ou 0,5 mol.L⁻¹ permet d'obtenir respectivement des DW ou des SW. Ces structures ont été caractérisées au Microscope Electronique à Transmission (MET) et en diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), montrant que leurs diamètres étaient très bien monodispersés puisque les SW présentent un diamètre externe de $3,5 \pm 0,2$ nm et les DW un diamètre externe de $4,1 \pm 0,1$ nm et un diamètre interne de $2,1 \pm 0,1$ nm [87].

Par la suite, Thill et collaborateurs [88] ont synthétisé des structures identiques en gardant C_{Al} constant, mais on faisant varier le **rapport d'hydrolyse (R)**. Ils en ont conclu que le mécanisme permettant de contrôler la formation de SW ou de DW correspond à une compétition entre l'élasticité de la paroi du proto-imogolite due à sa courbure et l'attraction électrostatique entre les faces externes et internes des proto-imogolites (comme illustré en Figure 9).

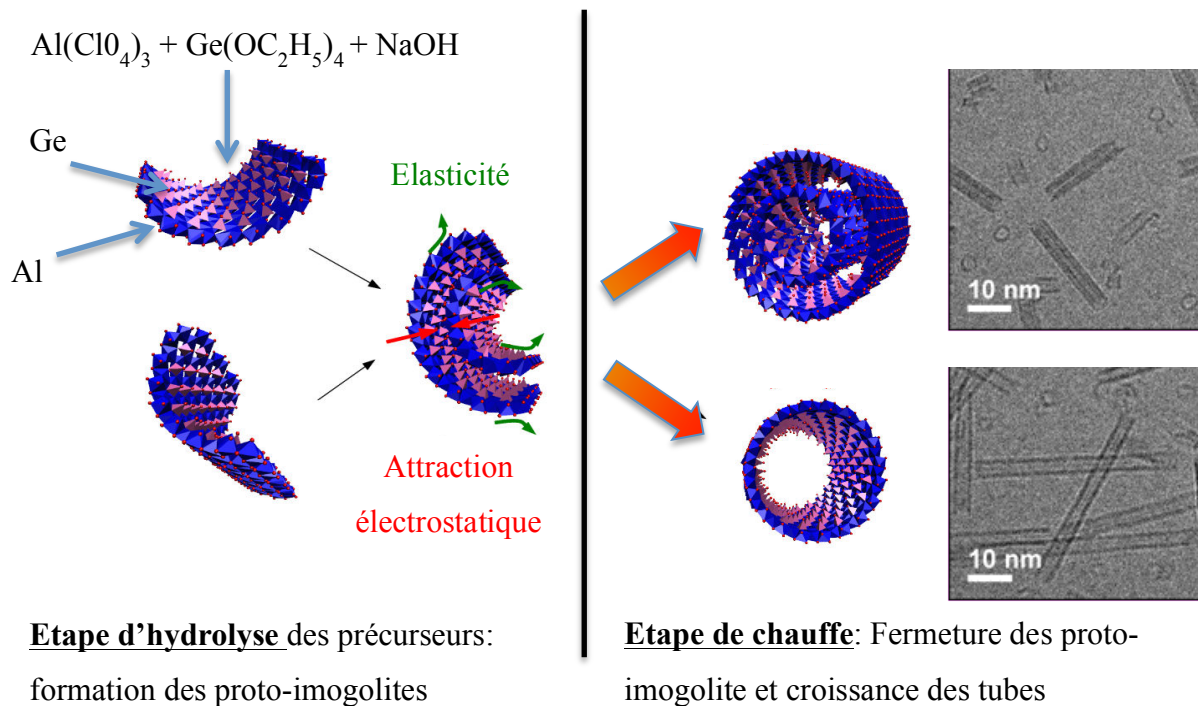


Figure 9 : Etapes de synthèses et mécanismes d'obtention préférentielle de SW ou de DW imogolites. Adapté de Thill et collaborateurs [88]. Après le mélange et l'hydrolyse des précurseurs sont formés les proto-imogolites. En fonction des concentrations initiales en réactif, ces proto-imogolites vont s'organiser en doubles tuiles ou rester isolée. Ce sont ces (non)-assemblage qui mèneront à la formation de SW ou DW. Image obtenue avec un Microscope électronique à transmission par Maillat et collaborateurs [87]

3.2.2.2 Variation de la cristallinité :

Levard et coll. ont étudié l'impact du rapport d'hydrolyse (R) sur la synthèse d'imogolite [89]. L'étude en spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) au seuil K du germanium qu'ils ont réalisé sur les poudres obtenues permet de caractériser l'environnement local (i.e. la nature et la distance des atomes voisins) d'un atome d'intérêt (ici le germanium). Ils ont ainsi montré que pour des rapports d'hydrolyse de 2 à 2,5 des nanotubes Ge-imogolites bien cristallisés étaient obtenus, avec environ 4,4 atomes d'oxygènes et 6 atomes d'aluminium liés au germanium. A l'inverse, pour des ratios d'hydrolyse plus bas (1,5 à 1,75) les imogolites étaient moins bien cristallisées et les atomes de germanium n'étaient liés plus qu'à environ 4,5 octaèdres d'aluminium (Figure 10), mettant en évidence la présence de lacunes dans la couche dioctaédrique d'aluminium.

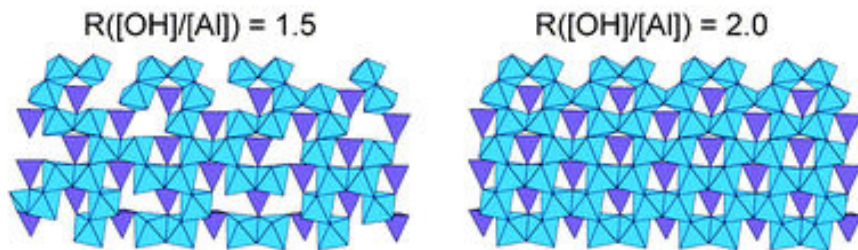


Figure 10 : Modèle structural d'une Ge-imogolite mal cristallisée (à gauche) ou bien cristallisée (à droite). Bleu : octaèdres d'aluminium ; violet : tétraèdres de silicium issu de Levard et collaborateurs [89]. Ces modèles structuraux sont basés sur résultats des spectres d'absorption des rayons X (EXAFS) au seuil du germanium.

3.2.2.3 Variation de la taille

Dans tous ces protocoles, si la structure locale est bien maîtrisée, il reste un verrou : la longueur des tubes. En effet, les Ge-imogolites issues de toutes les synthèses décrites avant sont courtes (quelques dizaines de nanomètres, comme le montre la Figure 9). Un récent protocole a été réalisé par Amara et coll. [90] permet d'obtenir des tubes plus longs (Figure 11).

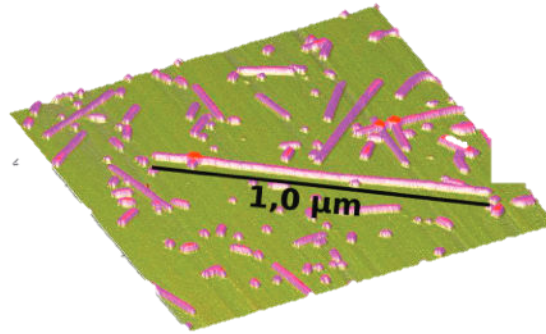


Figure 11 : Image AFM des Ge-imogolites micrométriquement longues, obtenues grâce au nouveau protocole de Amara et collaborateurs [90]. Utiliser de l'urée comme source d'hydroxyles et chauffer la solution à 140°C pendant 4 jours permet d'obtenir des tubes micrométriquement longs.

Ce protocole consiste à mélanger les réactifs d'aluminium et de germanium, puis de réaliser l'hydrolyse de ces réactifs avec de l'urée (rapport d'hydrolyse $n_{\text{urée}}/n_{\text{Al}} = 1$). Puis ce mélange est directement placé dans une autoclave à 140°C pendant 5 jours. L'urée se dégrade ensuite lentement sous l'effet de la chaleur, relargant des OH^- ce qui permet une hydrolyse lente des réactifs. Ce nouveau protocole a permis, pour la première fois, d'obtenir des Ge-imogolites de longueurs micrométriques. Cependant, la longueur de ces tubes reste très polydispersée. Les auteurs pensent que la composition de l'urée modifie les charges des bouts de tubes, induisant une plus grande probabilité de collision efficace entre tubes courts ou proto-imogolite, et donc des tubes plus longs.

1.3.1 Utiliser les imogolites comme modèle.

Les Ge-imogolites sont, comme nous venons de le voir, un très bon modèle pour les études de toxicités en maîtrisant bien les paramètres physico-chimiques que l'on veut observer. En effet, ces nanotubes inorganiques

- sont synthétisables en grandes quantités (concentrations molaires) dans des conditions de synthèses simples et peu coûteuses (milieu aqueux, phase de croissances à températures modérées, pas d'utilisation de solvants toxiques)
- sont hydrophiles (bien dispersés en solution) et purs en solutions (pas de sous-produits en solution)
- il est possible en modifiant simplement les conditions de synthèses de faire varier leur longueur, le nombre de parois (en gardant des diamètres très monodispersés), la cristallinité (en synthétisant des structures lacunaires)

A notre connaissance, seules quelques études utilisent les Ge-imogolites comme nanoparticules modèles pour des tests de toxicité.

3.2.2.4 Les études de toxicité existantes

Wei et coll. en 2012 ont utilisé des DW de différentes longueurs (10 vs 50nm) ainsi que leurs proto-imogolites pour regarder les effets du paramètre longueur de tubes sur les mécanismes de cytotoxicité et génotoxicité qu'ils induisent dans cellules épidermiques. [91]. Ils ont observé

- une internalisation des protos et des tubes courts dans les cellules.
- pas de cytotoxicité pour des concentrations inférieures à 10g.L^{-1} .
- une génotoxicité (lésions de l'ADN) des protos et des tubes courts due à un stress oxydant
- une faible génotoxicité générée par les tubes longs, induits par un autre mécanisme qu'un stress oxydant (non identifié) des tubes longs.

Dans l'étude réalisée lors d'une collaboration avec Brule et coll. en 2014, nous avons regardé le caractère inflammatoire de DW vs SW, tous deux d'environ 60-70nm) sur des fibroblastes de rats *in vivo* [92]. Nous avons montré

- une persistance des Ge-imogolites dans les poumons
- l'induction de génotoxicité et d'inflammation des fibroblastes
- une toxicité accrue des SW du fait de leur plus grand rapport d'aspect et/ou d'un plus grand nombre de tube/g de Ge-imogolites

Pour l'instant, à notre connaissance, aucune autre étude n'utilise les Ge-imogolites comme modèle pour relier des propriétés physico-chimiques à des mécanismes de toxicité chez les bactéries.

3.2.2.5 Les limites à leur utilisation

Pour les études de toxicité, mais également dans une thématique plus large d'études mécanistiques ou d'utilisation industrielle, le verrou majeur persistant à l'utilisation des Ge-imogolites et le **temps nécessaire à la phase de croissance** qui est classiquement, comme vu précédemment, de 4 à 6 jours à température modérée (90 à 140°C)[86]–[90].

Nous avons voulu explorer cette faille dans les protocoles de synthèse pour essayer de réduire ce temps de synthèse.

Question 2 ; Peut on réduire le temps de synthèse des Ge-imogolites ?

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de faire varier des paramètres physico-chimiques de Ge-imogolites un par un : **le diamètre** (SW vs DW), **la cristallinité** (lacunaires vs cristallisés) et **la longueur** (longueurs nanométriques vs longueurs micrométriques). Ces paramètres ont été identifiés plus haut comme pouvant être étroitement impliqués dans l'(éco)toxicité des nanomatériaux pour les cellules. Ils est donc particulièrement intéressant pour nous d'utiliser **ces Ge-imogolites comme nanomatériau modèle**.

Cependant, d'autres paramètres physico-chimiques semblent déterminant dans les mécanismes de toxicité comme la **pureté du NM étudié**, notamment en ce qui concerne la présence d'élément traces métalliques. Comme vu plus haut, Un élément particulier est fortement impliqué dans la génération de ROS au sein d'une cellule ; le fer (III). La présence de fer semble déterminante dans les tests de toxicité pour son rôle dans la génération de stress oxydant. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, il peut se produire une réaction, dite de Fenton/Haber-Weiss (Équation 1 : Réaction de Fenton/Haber-Weiss p 14) qui, en présence de Fe (III) et de ROS comme des hydroxydes radicaux et du peroxyde d'hydrogène va mener à la formation de superoxyde, très toxique pour les cellules. Aussi, la régulation du fer dans les cellules va être déterminant dans la survie des bactéries exposée aux nanomatériaux.

Il pourrait donc être intéressant d'observer comment l'apport de fer (via du Fer(III) déjà présent dans le milieu, ou apporté via les NMs) dans un système NM/bactérie pourrait influencer la biodisponibilité du fer, la gestion des ROS et la régulation du taux de fer dans les cellules.

Aussi il pourrait être très intéressant d'essayer d'apporter du fer via l'ajout de Ge-imogolites dans les tests d'écotoxicité.

Question 3 ; Est-il possible d'ajouter du fer dans la structure des Ge-imogolites ?

4 Le choix du modèle bactérien, *Pseudomonas brassicacearum* et des marqueurs de toxicité.

4.1 Les bactéries comme modèle

Comme rapidement évoqué en début du paragraphe 2.3.1 (Les mécanismes de toxicité) (page 13), l'utilisation de bactéries est plus adéquate dans notre modèle d'étude que des organismes plus complexes. Puisque nous souhaitons relier des mécanismes de toxicité à des caractéristiques physico-chimiques particulières des imogolites, il est judicieux de choisir un modèle bactérien qui sont (i) des organismes assez simples, connus et dans lesquels les réponses biologiques sont connues et (ii) abondants dans différents compartiments environnementaux [26]. De plus les bactéries sont très certainement fortement impliquées dans le transfert et les effets des NM dans les écosystèmes puisque les NM peuvent

- réduire / modifier la diversité des communautés bactériennes en sélectionnant par exemple des souches plus résistantes aux métaux [93].
- Altérer la physiologie des bactéries et donc le cycle des nutriments. Par exemple, plusieurs types de NM affectent la dépollution en nutriment par les bactéries dans le traitement des eaux usées [94]. Il a été montré également que le cycle de l'azote peut être inhibé lors de la présence d'Ag [95] ou peut être stimulé lors d'une réponse à un stress, par exemple lors de l'exposition aux CdSe [96].
- Etre modifiées par les bactéries via une adsorption forte à leur surface pouvant modifier leur transport dans l'environnement [97]. Les bactéries peuvent également dégrader les NMs, comme par exemple les NTC qui sont adsorbé en surface des bactéries puis dégradés par des oxydases extracellulaires [98]. Enfin l'adsorption ou l'internalisation de NM à la surface des bactéries peut modifier leur transfert dans la chaîne trophique [99], [100].

Il est donc nécessaire de bien comprendre les mécanismes de toxicités et de biodégradation dus aux interaction NM/Bactéries afin d'avoir une vue d'ensemble du transfert des NMs dans des écosystèmes plus complexes.

de 1,5 à 2 μm de long pour 0,5 μm de diamètre. Cette bactérie est aérobie/anaérobie facultatif. Enfin, son génome est entièrement séquencé depuis 2011 par Ortet et coll. [102].

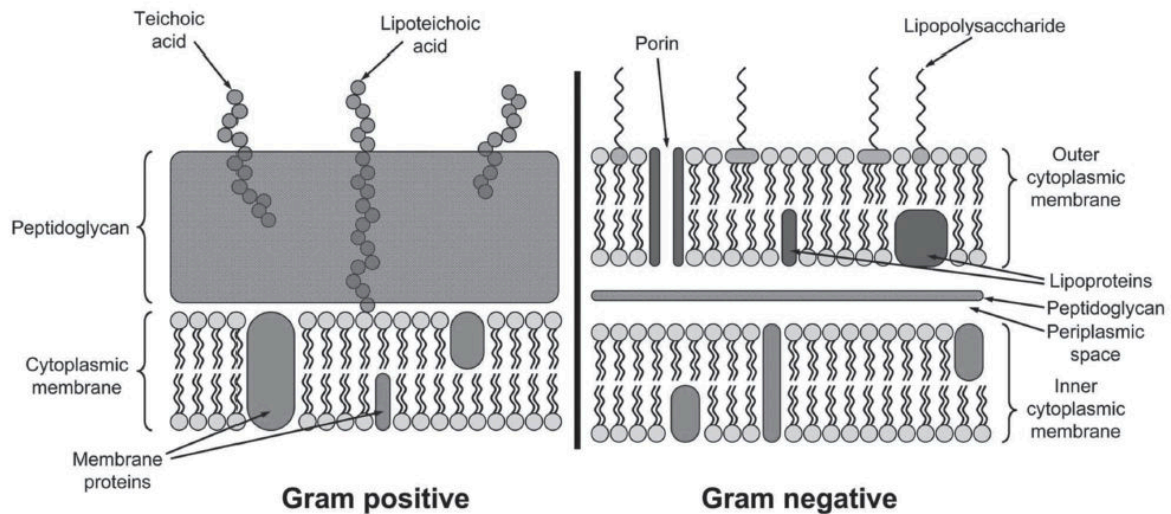


Figure 13: Illustration des différences de membranes externes d'une bactérie gram + ou gram (image issues de Djurisic et coll., 2015 [35]).

1.3.2 Adaptation de *Pseudomonas brassicacearum* à son environnement

4.2.1.1 *Pseudomonas brassicacearum* et la rhizosphère

L'espèce *Pseudomonas brassicacearum* est une bactérie colonisatrice, qui a été décrite pour la première fois en 2000 par Achouak et coll., et qui se trouvait être majoritaire dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus* [103]. Cette bactérie représente plus de 10% des bactéries cultivables associées à la rhizosphère d'*A. thaliana* et jusqu'à 60% de celle de *B. napus*.

Pseudomonas brassicacearum a une place importante dans ces rhizosphères. La rhizosphère est définie comme le sol immédiatement influencé physiquement et biologiquement par les racines de plantes [104]. Cette niche écologique est riche en ressources mais la compétition pour les nutriments et les sites de colonisation y est importante.

Au niveau de la rhizosphère d'*A. thaliana*, *P. brassicacearum* est essentiellement localisée à la partie basale des racines. Si elle vit en partie grâce aux exsudats racinaires que biosynthétise la plante, elle va également établir une protection à la plante via la synthèse de cyanides et de DAPG (antifongiques), de biofilm, ou encore de sidérophores (chélateurs du fer).

4.2.1.2 Variation phénotypique de *Pseudomonas brassicacearum*

Après quelques jours de croissance sur milieu riche, ou après 4 à 5 semaine de germination des graines *in planta*, des variants dit de « phase II » apparaissent, morphologiquement différents [105]. La souche sauvage (WT) forme des colonies petites, muqueuses et non-fluorescentes alors que celles des variants sont plus larges, translucides et fluorescentes. Les variants diffèrent également par leurs caractéristiques biochimiques. Par exemple la souche sauvage produit des lipase et protéases, des phytohormones (auxine), des métabolites antifongiques (DAPG par exemple), qui ne sont plus synthétisés par le variant.

Cette variation phénotypique permet une meilleure colonisation de la rhizosphère ainsi qu'une meilleure adaptation aux fluctuations de l'environnement. Plus mobiles, ces variants iront coloniser d'autres sites des racines de la plante, notamment la partie apicale, zone d'élongation de la racine ou la sécrétion d'exsudats racinaire est maximale. Cette migration serait due à la surproduction de flageline [105]. Ces variants ont également la capacité de participer aux processus de dénitrification (utilisation de nitrates comme accepteur final d'électron plutôt que l'oxygène) dans les milieux pauvres en oxygène.

Ces deux souches synthétisent des sidérophores (chélateurs du fer) et présentent également des adaptations aux stress environnementaux différentes. Par exemple la présence de cadmium (hautement toxique), met en évidence des stratégies d'adaptation différentes. Quand la souche sauvage modifie sa membrane pour empêcher l'entrée du Cd et surexprime des transporteurs pour l'évacuer, les variants recrutent des gènes pour répondre au stress osmotique et oxydant engendré par la présence du métal [106]. Des études transcriptomiques, en présence de divers stress ont permis de mettre en évidence l'augmentation de **l'expression d'ARN régulateurs** chez la souche sauvage par rapport aux variants.

4.3 La régulation génotypique en réponse à un stress

4.3.1 Les ARN non codants (ARNnc) régulateurs de l'expression génique

Historiquement, les acides ribonucléiques (ARN) ont été associés dans les années 1960 aux ARN messagers (ARNm), transcrits à partir des gènes puis traduits en protéines [107]. Par la suite, ce dogme central de la biologie moléculaire a été remis en question suite à la découverte dans les années 1980 d'ARN non codants (ARNnc) impliqués dans la régulation de la réplication des plasmides [108], [109]. D'autres ARNnc ont ensuite été identifiés au sein du chromosome bactérien d'*Escherichia coli* en 1999 [110]. Les différents types d'ARN existant chez les procaryotes sont résumés en Figure 14. Ainsi, les ARN interférant (ARNi) qui

constituent la classe des ARNnc chez les procaryotes permettent d'interférer avec les ARNm et conduisent à leur dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine.

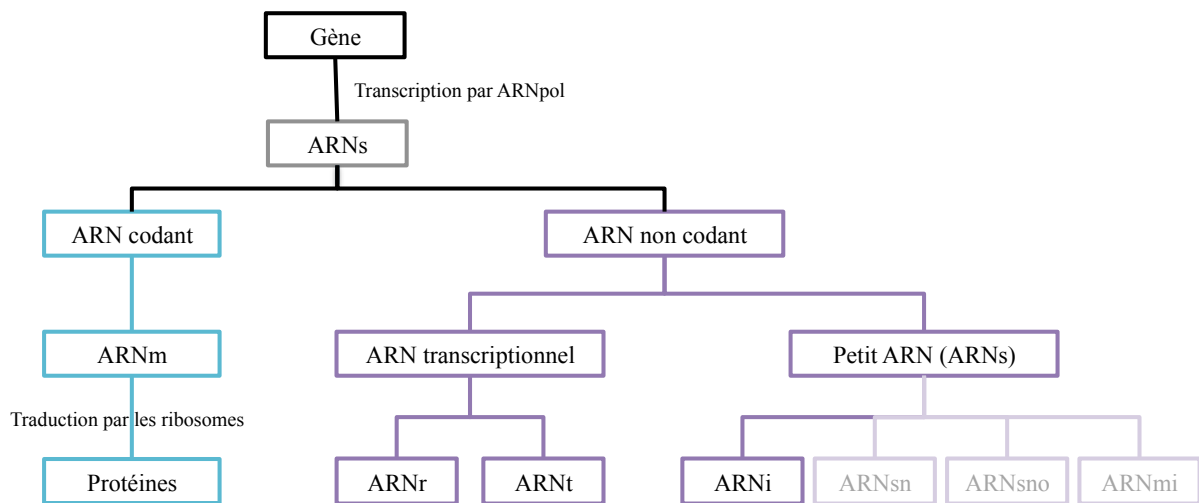


Figure 14 : Schéma illustrant les différents types d'ARNs impliqués dans la transcription puis la traduction des gènes en protéines chez les procaryotes. ARNpol = ARN polymérase, complexe enzymatique responsable de la synthèse des ARNs. ARNm= ARN messenger traduit en protéine via les ribosomes. ARNr= ARN ribosomique qui constitue, avec d'autres protéines, une partie des ribosomes. ARNt = ARN de transfert qui est un intermédiaire à la traduction, apportant les acides aminés aux ribosomes. ARNi = ARN interférant qui régule l'expression des gènes en bloquant la transcription ou en neutralisant les ARNm an s'appariant avec eux. Les ARNsn (petit ARN nucléaire), ARNsno (petit ARN nucléolaire) et ARNmi (petit ARN temporaire) n'existent que dans les cellules eucaryotes.

Nous savons aujourd'hui que certains ARN participent à la régulation de la traduction des protéines, comme les ARNs ribosomiques (ARNr) ou les ARNs de transfert (ARNt) et que d'autres sont responsables de la régulation de l'expression des gènes comme les ARNs interférant (ARNi).

Les ARNnc sont des molécules d'ARN dans la cellule, qui ne codent pas pour des protéines (à quelques exceptions près), mesurant entre 50 et 550 nucléotides. Elles permettent la régulation des gènes via la modulation de la traduction de leurs ARN messagers (ARNm). Il existe ainsi plusieurs mécanismes d'action:

Les Riborégulateurs : Ce ne sont pas des ARNnc en soi, mais une partie de l'ARNm autorégulate. Présente dans la partie non traduite en aval de l'ARNm, cette zone subit des modifications structurales en réponse à la fixation d'un ligand ou de paramètre physico-chimiques tels que la température ou le pH afin d'induire soit une activation soit une répression de la traduction de l'ARNm adjacent [111].

Les ARNnc **antisens cis- ou trans- régulateurs** : agissant par complémentarité de séquence avec un ou plusieurs ARNm cible. Aussi les ARNnc antisens agissent par complémentarité de

séquence au niveau de la région 5'UTR (région non codante en amont du codon d'initiation de la traduction), 3'UTR (région en aval du codon stop) ou dans la région codante de l'ARNm [112], [113]. Cette liaison à l'ARNm peut déclencher plusieurs réactions : Activer ou inhiber sa traduction [114], augmenter sa stabilité [115] ou entraîner sa dégradation [116]. Ces ARNnc interviennent dans de nombreuses voies métaboliques et dans diverses fonctions régulatrices. Ils sont impliqués (entre autre) dans le métabolisme du carbone [117] ou l'homéostasie du fer [118].

Comparé à un système protéique, l'utilisation d'un système de régulation à ARNnc comporte plusieurs avantages pour la cellule, en particulier **son coût énergétique réduit et sa rapidité de réponse**. La transcription d'un ARN, qui plus est de petite taille, permet à la cellule d'économiser une étape de traduction. De plus, leur rapidité de réponse aux stimuli intra- et/ou extra- cellulaires et la facilité à moduler leur stabilité permettent aux ARNnc d'exercer une régulation fine de l'expression des gènes. Enfin, un seul ARNnc peut réguler plusieurs gènes cibles [119]. De même, plusieurs ARNnc peuvent influencer la traduction d'un seul ARNm [120].

Le suivi de la transcription des ARNnc peut être un **puissant outil de suivi de la réponse d'une cellule à un stress**, comme dans notre cas à l'exposition des NM.

4.3.2 Les stratégies pour la régulation de l'homéostasie du fer

Le fer est l'un des métaux le plus important dans le métabolisme de nombreux organismes, y compris pour celui des bactéries [118]. Il s'agit du 4^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre après l'oxygène, le silicium et l'aluminium. Cependant il peut être difficile à acquérir pour les bactéries au vue de sa faible solubilité en conditions aérobies et à pH neutre (Figure 15)

Or la plupart des bactéries nécessitent une concentration en fer dans le milieu de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} mol/L pour se développer. Pour pouvoir diffuser passivement au sein d'une cellule, le fer doit être sous forme monomérique (Fe(II)) alors que la concentration en Fe(II) disponible dans l'environnement oxique est très faible, à l'état de traces. Il est donc nécessaire pour les bactéries d'acquérir des stratégies pour pouvoir récupérer le fer non dissous.

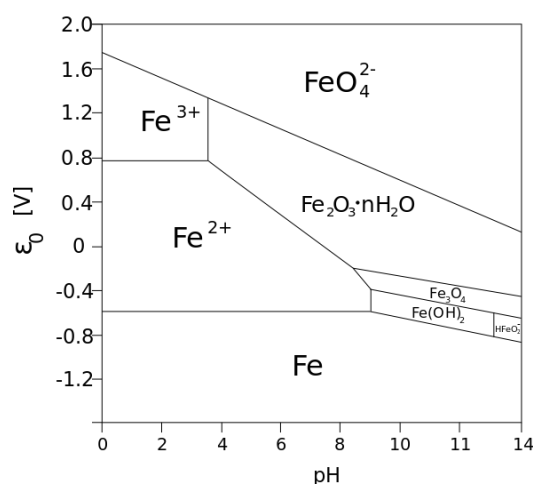


Figure 15: Diagramme de Pourbais du fer (1 mol.L⁻¹, 25°C). La spéciation du fer (ion, complexe, précipité, métal) préférentielle est fonction du potentiel d'oxydo-réduction (V) et du pH du milieu dans lequel il se trouve. Typiquement, on retrouvera dans les eaux naturelles un pH autour de 7 et un potentiel redox autour de 1,5 V pour les eaux aérées [121].

De plus, si le taux de fer dans la cellule doit être suffisant pour permettre les fonctions cellulaires, si il est trop concentré, la réaction dite de Fenton/Haber-Weiss (Équation 1) peut se produire, produisant de superoxydes, hautement toxiques pour la cellule (pour plus d'informations se référer à la partie 2.3.1.1 La génération d'espèces réactives de l'oxygène page 14). Ces radicaux libres réagissent avec les acides nucléiques, les protéines et la membrane cellulaire causant des dégradations à la cellule.

La bactérie doit donc contrôler finement l'acquisition et le stockage du fer (on parle d'**homéostasie du fer**) pour permettre un bon fonctionnement de la cellule, et éviter une trop grande concentration induisant du stress oxydant en cas d'apparition exogène de ROS. Le suivi de la régulation de l'homéostasie du fer va ainsi être cruciale dans notre étude, puisqu'il semble que la génération de ROS soit l'un des mécanismes de toxicité prépondérant lors de l'exposition à des NM.

Cette régulation du taux de fer et de sa spéciation dans la cellule peut être faite de différentes façons.

4.3.2.1 La chélation du Fe(III)

Une des stratégies de récupération du fer dans l'environnement est sa chélation *via* l'utilisation de **sidérophores**. Les sidérophores sont des polypeptides de masses moléculaires faibles (<1000Da) qui ont la spécificité d'avoir une très haute affinité pour le Fe(III) ($K_{aff} > 10^{30}$) [122]. Les étapes de la régulation de l'apport du fer dans les cellules par les sidérophores sont résumées avec la Figure 16.

Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme [123] puis sont exportés vers le milieu extracellulaire, probablement grâce à une pompe à efflux. Les sidérophores complexent alors le fer du milieu extracellulaire et forment un complexe octaédrique hexadenté avec le Fe(III). Le complexe ferrisidérophore ainsi formé est reconnu par un récepteur spécifique de la membrane externe de la bactérie. Le ferrisidérophore est ensuite pris en charge par la protéine périplasmique d'un transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette). Une fois dans la cellule, le fer est ensuite libéré soit par une digestion partielle du sidérophore [124] et/ou par un processus de réduction permettant la transition $\text{Fe(III)} \Rightarrow \text{Fe(II)}$ [125] via des mécanismes encore peu connus [126]. L'affinité des sidérophores pour les ions Fe(II) étant faible, le sidérophore n'est plus lié au fer. Dans ce deuxième cas, le ligand intact pourra être recyclé en étant excrété hors de la cellule de nouveau.

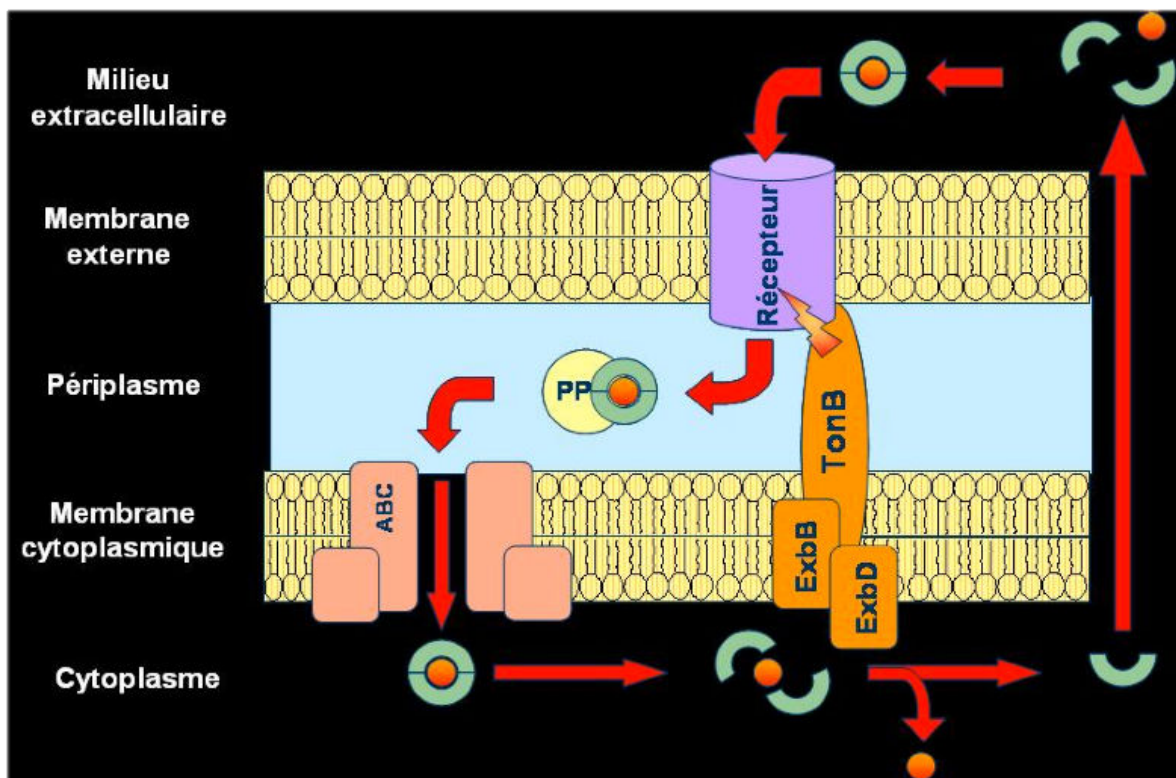


Figure 16 : Diagramme illustrant le transport du fer dans une bactérie à Gram négatif par un sidérophore. L'ion Fe^{3+} (espère orange) est chélaté par le sidérophore puis reconnu par un récepteur spécifique. Une fois dans le cytoplasme le complexe est dissocié et le sidérophore est ainsi réutilisé (issu de Noel et coll. 2011 [127]).

4.3.2.2 La régulation génique

Le contrôle de l'expression des gènes par le fer via la protéine Fur permettra d'adapter les stratégies d'acquisition du fer des bactéries.

Cette régulation passe souvent par un régulateur global protéique nommé Fur pour « Ferric uptake regulator » qui a été identifié dans plusieurs modèles bactériens, comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que des bactéries à Gram + comme *Bacillus subtilis*. Il a ainsi été démontré que Fur régulait négativement de nombreux gènes en présence de fer (Figure 17). Selon le modèle prévalent aujourd'hui, les ions Fe(II) présent dans la cellule se fixent sur un dimère de Fur, induisant un changement conformationnels qui améliore sa capacité à se lier à l'ADN. Une fois liée à l'ADN, le complexe Fe(II) -Fur réprimera l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage de fer [128].

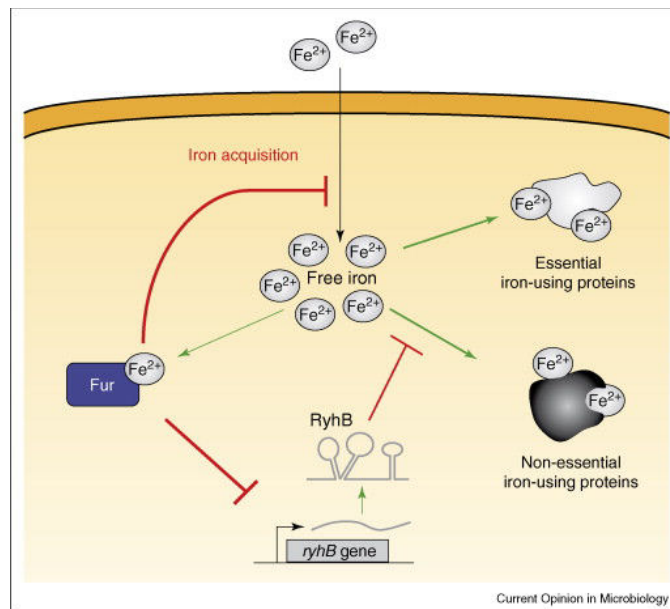


Figure 17: Régulation de l'homéostasie du fer par la protéine Fur et l'ARNnc RyhB dans *Escherichia coli* (issus de Massé et coll. 2007) [118]. Lorsque le Fe(II) est abondant dans la cellule, Fur réprime les gènes impliqués dans l'apport du fer et active indirectement le stockage du fer via l'inhibition de la transcription de RyhB. Lorsque la cellule est en carence de fer, RyhB réprime le stockage du fer et son utilisation par des protéines non essentielles.

L'ARNnc RyhB semble être déterminant dans la chaîne de régulation de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. Cet ARNnc contrôlerait chez *E. coli* une vingtaine de gènes pour une cinquantaine de protéines, faisant de cet ARNnc l'un de ceux aillant le plus de cibles [119], permettant notamment la régulation de la traduction de protéine non essentielles riches en fer [118], ainsi que la synthèse de sidérophores [129]. Si cet ARNnc RyhB a été identifié dans plusieurs souches bactériennes comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* et plusieurs cyanobactéries, aucune séquence homologue

n'a été identifiée dans *Pseudomonas brassicacearum* [118]. Cependant, deux ARNnc nommés **PrrF1** et **PrrF2**, dont les gènes sont localisés en tandem sur le chromosome, semblent remplir la fonction de RyhB [130] et sont fortement impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer. Les mécanismes de cette régulation sont schématisés en Figure 18.

- (i) si la concentration intracellulaire en Fe(II) intracellulaire est faible, les ARNnc PrrF1 et PrrF2 s'apparient aux bases de la région de fixation des ribosomes, empêchant leur fixation. Ils répriment ainsi la traduction d'ARNm codant pour des protéines non essentielles, qui requièrent le fer comme cofacteur. C'est le cas de la superoxyde dismutase ainsi que des protéines impliquées dans le stockage et l'utilisation du Fe(II). Ce processus permet à la bactérie d'épargner le fer et de l'utiliser uniquement pour des fonctions essentielles à sa survie.
- (ii) à l'inverse, si la concentration en Fe(II) intracellulaire est élevée, la protéine Fur se complexe avec le Fe(II), change de conformation, et réprime la transcription des gènes *prrF1* et *prrF2*, levant ainsi la répression de transcription des gènes par les PrrF.

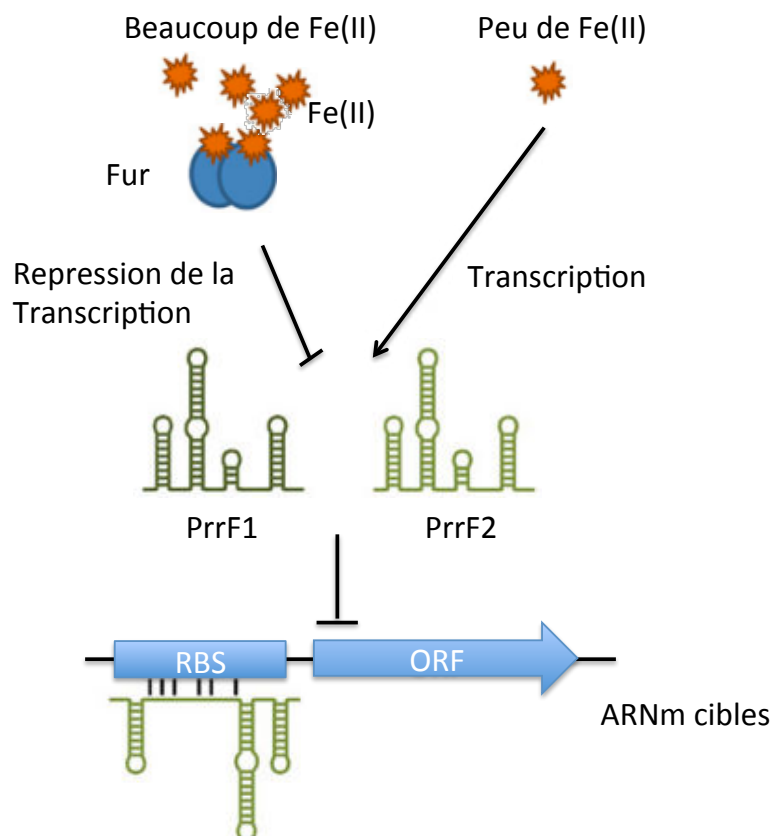


Figure 18 : Schéma des mécanismes de régulation de la traduction des ARNm impliqués dans l'homéostasie du fer via les ARNnc PrrF1 et PrrF2. RBS : site de fixation des ribosomes pour la traduction de l'ARNm en protéine. Les PrrF, en s'appariant aux bases de ce site, répriment la traduction des ARNm. ORF : Région codante de l'ARNm.

Les ARNnc PrrF1 et PrrF2 peuvent ainsi être de très bons indicateurs indirects de l'état de l'homéostasie du fer dans les bactéries, et du même coup de la réponse à la génération de ROS dans les cellules.

Les mécanismes de régulation du métabolisme présentés juste avant seront donc clefs dans la réponse de *P. brassicacearum* à une exposition aux nanomatériaux.

Question 4 ; Quels sont les bons marqueurs d'un stress ou d'une toxicité lors de l'exposition de *Pseudomonas brassicacearum* aux NM ?

5 Objectifs et organisation de la thèse

Nous avons abordé lors de cette introduction plusieurs grandes notions ; et plusieurs questions ont été soulevées.

Les nanomatériaux sont de plus en plus utilisés dans un nombre croissant de secteurs, nécessitant de prévoir **l'émission**, le **devenir** et la **toxicité** de ces nanomatériaux afin de prévenir **les risques** liés à leur utilisation. Devant la variété structurale et chimique des nanomatériaux existants, il n'est pas envisageable d'évaluer expérimentalement le risque associé à chacun des nanomatériaux. Il est donc nécessaire de pouvoir identifier les paramètres physico-chimiques qui induisent une toxicité pour prévenir leurs effets.

Le mécanisme de toxicité le plus souvent identifié lors de l'exposition aux NM est **la génération d'un stress oxydant**. Ce phénomène peut être principalement induit par (i) une interaction forte des NM avec les cellules (adsorption/internalisation) (ii) la dissolution des NM (iii) des réactions redox en surface des NM. Ces mécanismes semblent être principalement modulés par (i) **la morphologie de la particule**, (ii) **leur charge** et (iii) **leur composition chimique**, mais les liens entre ces paramètres et les effets toxiques des NM sont rarement identifiés. En partant de ce constat, l'objectif général de la thèse tente de répondre à cette question :

Peut-on relier certaines propriétés physico-chimiques des NMs à des effets biologiques spécifiques ?

Afin d'y répondre, nous avons choisi un **système d'étude modèle** avec (i) les **Ge-imogolites comme nanomatériau modèle**, dont on maîtrise bien la synthèse qui peut être facilement adaptée afin de faire varier les paramètres pouvant moduler la toxicité et (ii) ***Pseudomonas brassicacearum* comme bactérie modèle** qui est une bactérie vivant dans la rhizosphère de brassicacées, représentative de compartiments environnementaux, et dont les réponses aux stress environnementaux qui nous intéressent sont identifiables.

Cette étude a ainsi été divisée en deux sous objectifs.

La synthèse de Ge-imogolite à paramètres physico-chimiques variables

Le premier des sous objectifs est la synthèse contrôlée d'échantillons de Ge-imogolites afin de faire varier les paramètres physico-chimiques susceptibles de contrôler leur toxicité. Des

protocoles existant ont été utilisés pour faire varier le nombre de parois (simple paroi vs doubles parois) et la présence de lacunes (défauts structuraux). Les produits résultants ont été séparés en taille pour l'obtention de fractions de longueurs courtes ou longues.

Il est nécessaire d'élaborer de nouveaux protocoles pour

- Synthétiser des Ge-imogolites de taille micrométrique.
- Incorporer du Fe dans la structure des Ge-imogolites, afin de pouvoir étudier l'impact de la modification de leur chimie. Ce dopant, *a priori* nécessaire à la croissance des bactéries, pourrait également être source de production de ROS.

Afin de déterminer si les morphologies, les cristallinités des Ge-imogolites ainsi que l'incorporation de dopants étaient bien contrôlées, une caractérisation multi-échelle des composés a été réalisée.

L'étude des effets toxiques

Le deuxième sous-objectif est de déterminer les effets toxiques et les réponses biologiques de *Pseudomonas brassicacearum* après expositions aux NMs synthétisés et finement caractérisés dans le cadre du premier sous-objectif. En particulier, **l'objectif est de relier certaines propriétés physico-chimiques des Ge-imogolites à des effets biologiques spécifiques**. De plus, l'interaction et la transformation des Ge-imogolites en contact avec le milieu de culture et/ou les cellules bactériennes ont été monitorées.

La manuscrit sera organisé comme suit

Le **CHAPITRE III** présente les travaux effectués pour la recherche d'un nouveau protocole de synthèse de Ge-imogolite afin d'obtenir des nanotubes micrométriques mais également de **réduire le temps de la phase de croissance**.

Les **CHAPITRES IV et V** traitent de l'influence de la variation des paramètres physico-chimiques des Ge-imogolites sur leur toxicité envers *Pseudomonas brassicacearum*.

Le **CHAPITRE VI** présente des travaux préliminaires pour le test de nouveaux outils permettant le suivi des interactions (adsorption vs internalisation) des NM avec le vivant

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. C. Slater, « Atomic Radii in Crystals », *The Journal of Chemical Physics*, vol. 41, n° 10, p. 3199–3204, nov. 1964.
- [2] J. D. Watson et F. H. C. Crick, « Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid », *Nature*, vol. 171, n° 4356, p. 737–738, avr. 1953.
- [3] N. Taniguchi, « On the basic concept of nanotechnology », in *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering*, 1974, p. 18–23.
- [4] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, et R. E. Smalley, « C60: Buckminsterfullerene », *Nature*, vol. 318, n° 6042, p. 162–163, nov. 1985.
- [5] U. Leonhardt, « Optical metamaterials: Invisibility cup », *Nature Photonics*, vol. 1, n° 4, p. 207–208, avr. 2007.
- [6] « ISO - International Organization for Standardization - ISO/TS 27687:2008; "Nanotechnologies Terminologie et définitions relatives aux nano-objets" », 2008. [En ligne]. Disponible sur: http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail?csnumber=44278.
- [7] Commission Européenne, « Recommandation n° 2011/696/UE du 18/10/11 relative à la définition des nanomatériaux ». [En ligne]. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu>.
- [8] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, et M. R. Wiesner, « Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective », *Nature Nanotechnology*, vol. 4, n° 10, p. 634–641, oct. 2009.
- [9] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, et B. Nowack, « Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world », *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, n° 9, p. 1–11, août 2012.
- [10] T. Y. Sun, F. Gottschalk, K. Hungerbühler, et B. Nowack, « Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials », *Environmental Pollution*, vol. 185, p. 69–76, févr. 2014.
- [11] R. Kaegi, A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt, et M. Boller, « Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment », *Environmental Pollution*, vol. 156, n° 2, p. 233–239, nov. 2008.
- [12] R. Kaegi, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagedorfer, E. Mueller, R. Vonbank, M. Boller, et M. Burkhardt, « Release of silver nanoparticles from outdoor facades », *Environmental Pollution*, vol. 158, n° 9, p. 2900–2905, sept. 2010.
- [13] M. A. Kiser, P. Westerhoff, T. Benn, Y. Wang, J. Pérez-Rivera, et K. Hristovski, « Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants », *Environmental Science & Technology*, vol. 43, n° 17, p. 6757–6763, sept. 2009.
- [14] N. Bossa, « Nanotechnologies et matériaux de construction : mécanismes de relargage des nanomatériaux durant l'utilisation et la dégradation des ciments photocatalytiques. », 2015.
- [15] T. M. Benn et P. Westerhoff, « Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics », *Environmental Science & Technology*, vol. 42, n° 11, p. 4133–4139, juin 2008.
- [16] T. Benn, B. Cavanagh, K. Hristovski, J. D. Posner, et P. Westerhoff, « The Release of

- Nanosilver from Consumer Products Used in the Home », *Journal of Environment Quality*, vol. 39, n° 6, p. 1875, 2010.
- [17] P. Hennebert, A. Avellan, J. Yan, et O. Aguerre-Chariol, « Experimental evidence of colloids and nanoparticles presence from 25 waste leachates », *Waste Management*.
- [18] J. Sun, F. Wang, Y. Sui, Z. She, W. Zhai, C. Wang, et Y. Deng, « Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, p. 5733–5744, 2012.
- [19] C. Levard, S. Mitra, T. Yang, A. D. Jew, A. R. Badireddy, G. V. Lowry, et G. E. Brown, « Effect of Chloride on the Dissolution Rate of Silver Nanoparticles and Toxicity to *E. coli* », *Environmental Science & Technology*, vol. 47, n° 11, p. 5738–5745, juin 2013.
- [20] C. Levard, F. M. Michel, Y. Wang, Y. Choi, P. Eng, et G. E. Brown, « Probing Ag nanoparticle surface oxidation in contact with (in)organics: an X-ray scattering and fluorescence yield approach », *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 18, n° Pt 6, p. 871–878, nov. 2011.
- [21] E. M. Hotze, J.-Y. Bottero, et M. R. Wiesner, « Theoretical Framework for Nanoparticle Reactivity as a Function of Aggregation State », *Langmuir*, vol. 26, n° 13, p. 11170–11175, juill. 2010.
- [22] F. Loosli, P. Le Coustumer, et S. Stoll, « Effect of natural organic matter on the disagglomeration of manufactured TiO₂ nanoparticles », *Environmental Science-Nano*, vol. 1, n° 2, p. 154–160, avr. 2014.
- [23] B. Collin, E. Oostveen, O. V. Tsyusko, et J. M. Unrine, « Influence of natural organic matter and surface charge on the toxicity and bioaccumulation of functionalized ceria nanoparticles in *Caenorhabditis elegans* », *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 2, p. 1280–1289, janv. 2014.
- [24] A. A. Keller, H. Wang, D. Zhou, H. S. Lenihan, G. Cherr, B. J. Cardinale, R. Miller, et Z. Ji, « Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices », *Environmental Science & Technology*, vol. 44, n° 6, p. 1962–1967, mars 2010.
- [25] A. Praetorius, M. Scheringer, et K. Hungerbühler, « Development of Environmental Fate Models for Engineered Nanoparticles—A Case Study of TiO₂ Nanoparticles in the Rhine River », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 12, p. 6705–6713, juin 2012.
- [26] P. A. Holden, J. P. Schimel, et H. A. Godwin, « Five reasons to use bacteria when assessing manufactured nanomaterial environmental hazards and fates », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 27, p. 73–78, juin 2014.
- [27] X. Guo et N. Mei, « Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials », *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 22, n° 1, p. 105–115, mars 2014.
- [28] N. von Moos et V. I. Slaveykova, « Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps », *Nanotoxicology*, vol. 8, n° 6, p. 605–630, sept. 2014.
- [29] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, et D. Mohamad, « Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism », *Nano-Micro Letters*, vol. 7, n° 3, p. 219–242, avr. 2015.
- [30] A. P. Ingle, N. Duran, et M. Rai, « Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review », *Applied Microbiology and Biotechnology*,

- vol. 98, n° 3, p. 1001–1009, déc. 2013.
- [31] D. Minetto, G. Libralato, et A. Volpi Ghirardini, « Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: An overview », *Environment International*, vol. 66, p. 18–27, mai 2014.
 - [32] F. N. Oktar, M. Yetmez, D. Fikai, A. Fikai, F. Dumitru, et A. Pica, « Molecular Mechanism and Targets of the Antimicrobial Activity of Metal Nanoparticles », *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 15, n° 16, p. 1583–1588, août 2015.
 - [33] M. Shah, V. Badwaik, K. Y. W. Hk, M. T. A. Zp, R. H. H. W, M. T. W. C, L. Mb, et D. R, « Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. », *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, vol. 19, p. 1320–1344, déc. 2013.
 - [34] J. Pulit-Prociak, K. Stokłosa, et M. Banach, « Nanosilver products and toxicity », *Environmental Chemistry Letters*, vol. 13, n° 1, p. 59–68, déc. 2014.
 - [35] A. B. Djurišić, Y. H. Leung, A. M. C. Ng, X. Y. Xu, P. K. H. Lee, N. Degger, et R. S. S. Wu, « Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts », *Small*, vol. 11, n° 1, p. 26–44, janv. 2015.
 - [36] A. Kahru, H.-C. Dubourguier, I. Blinova, A. Ivask, et K. Kasemets, « Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview », *Sensors*, vol. 8, n° 8, p. 5153–5170, août 2008.
 - [37] M. Auffan, J. Rose, O. Proux, A. Masion, W. Liu, L. Benameur, F. Ziarelli, A. Botta, C. Chaneac, et J.-Y. Bottero, « Is There a Trojan-Horse Effect during Magnetic Nanoparticles and Metalloid Cocontamination of Human Dermal Fibroblasts? », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 19, p. 10789–10796, oct. 2012.
 - [38] M. Horie, K. Fujita, H. Kato, S. Endoh, K. Nishio, L. K. Komaba, A. Nakamura, A. Miyauchi, S. Kinugasa, Y. Hagihara, E. Niki, Y. Yoshida, et H. Iwahashi, « Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area », *Metallomics*, vol. 4, n° 4, p. 350–360, mars 2012.
 - [39] S. K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S. N. Luoma, et E. Valsami-Jones, « The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies », *Science of The Total Environment*, vol. 438, p. 225–232, nov. 2012.
 - [40] A. Luna-Velasco, J. A. Field, A. Cobo-Curiel, et R. Sierra-Alvarez, « Inorganic nanoparticles enhance the production of reactive oxygen species (ROS) during the autoxidation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) », *Chemosphere*, vol. 85, n° 1, p. 19–25, sept. 2011.
 - [41] A. Thill, O. Zeyons, O. Spalla, F. Chauvat, J. Rose, M. Auffan, et A. M. Flank, « Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism », *Environmental Science & Technology*, vol. 40, n° 19, p. 6151–6156, oct. 2006.
 - [42] T. Tong, A. Shereef, J. Wu, C. T. T. Binh, J. J. Kelly, J.-F. Gaillard, et K. A. Gray, « Effects of Material Morphology on the Phototoxicity of Nano-TiO₂ to Bacteria », *Environmental Science & Technology*, vol. 47, n° 21, p. 12486–12495, nov. 2013.
 - [43] G. Applerot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkash, Y. Nitzan, R. Lubart, et A. Gedanken, « Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury », *Advanced Functional Materials*, vol. 19, n° 6, p. 842–852, mars 2009.
 - [44] G. Applerot, J. Lellouche, A. Lipovsky, Y. Nitzan, R. Lubart, A. Gedanken, et E. Banin, « Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing

- the Route of Induced Oxidative Stress », *Small*, vol. 8, n° 21, p. 3326–3337, nov. 2012.
- [45] W. Jiang, K. Yang, R. W. Vachet, et B. Xing, « Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy », *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 26, n° 23, p. 18071–18077, déc. 2010.
- [46] A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker, et A. Dhawan, « Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells », *Chemosphere*, vol. 83, n° 8, p. 1124–1132, mai 2011.
- [47] A. L. Neal, « What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? », *Ecotoxicology*, vol. 17, n° 5, p. 362–371, juill. 2008.
- [48] K. H. Tam, A. B. Djurišić, C. M. N. Chan, Y. Y. Xi, C. W. Tse, Y. H. Leung, W. K. Chan, F. C. C. Leung, et D. W. T. Au, « Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method », *Thin Solid Films*, vol. 516, n° 18, p. 6167–6174, juill. 2008.
- [49] Z. Huang, X. Zheng, D. Yan, G. Yin, X. Liao, Y. Kang, Y. Yao, D. Huang, et B. Hao, « Toxicological Effect of ZnO Nanoparticles Based on Bacteria », *Langmuir*, vol. 24, n° 8, p. 4140–4144, avr. 2008.
- [50] R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, et F. Fiévet, « Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium », *Nano Letters*, vol. 6, n° 4, p. 866–870, avr. 2006.
- [51] W. Jiang, H. Mashayekhi, et B. Xing, « Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles », *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, vol. 157, n° 5, p. 1619–1625, mai 2009.
- [52] I. Sondi et B. Salopek-Sondi, « Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria », *Journal of colloid and interface science*, vol. 275, n° 1, p. 177–182, 2004.
- [53] Y. Zhao, Y. Tian, Y. Cui, W. Liu, W. Ma, et X. Jiang, « Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-Negative Bacteria », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 35, p. 12349–12356, sept. 2010.
- [54] S. P. Ravindranath, K. L. Henne, D. K. Thompson, et J. Irudayaraj, « Surface-Enhanced Raman Imaging of Intracellular Bioreduction of Chromate in *Shewanella oneidensis* », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 2, p. e16634, févr. 2011.
- [55] C. M. Sayes, J. D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A. M. Boyd, K. D. Ausman, Y. J. Tao, B. Sitharaman, L. J. Wilson, J. B. Hughes, J. L. West, et V. L. Colvin, « The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes », *Nano Letters*, vol. 4, n° 10, p. 1881–1887, oct. 2004.
- [56] E. Oberdörster, « Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass », *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, n° 10, p. 1058–1062, juill. 2004.
- [57] G. Andrievsky, V. Klovkov, et L. Derevyanchenko, « Is the C60 Fullerene Molecule Toxic?! », *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, vol. 13, n° 4, p. 363–376, juill. 2005.
- [58] E. Oberdörster, S. Zhu, T. M. Blickley, P. McClellan-Green, et M. L. Haasch, « Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms », *Carbon*, vol. 44, n° 6, p. 1112–1120, mai 2006.
- [59] T. B. Henry, F.-M. Menn, J. T. Fleming, J. Wilgus, R. N. Compton, et G. S. Sayler,

- « Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression », *Environmental health perspectives*, vol. 115, n° 7, p. 1059–1065, juill. 2007.
- [60] M. E. Samberg, P. E. Orndorff, et N. A. Monteiro-Riviere, « Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods », *Nanotoxicology*, vol. 5, n° 2, p. 244–253, juin 2011.
- [61] C. Ge, Y. Li, J.-J. Yin, Y. Liu, L. Wang, Y. Zhao, et C. Chen, « The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials », *NPG Asia Materials*, vol. 4, n° 12, p. e32, déc. 2012.
- [62] H. Chen, J. Shen, G. Longhua, Y. Chen, et D.-H. Kim, « Cellular response of RAW 264.7 to spray-coated multi-walled carbon nanotube films with various surfactants », *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, vol. 96, n° 2, p. 413–421, févr. 2011.
- [63] S. Kang, M. Herzberg, D. F. Rodrigues, et M. Elimelech, « Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! », *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 24, n° 13, p. 6409–6413, juin 2008.
- [64] M. Hassellöv, J. W. Readman, J. F. Ranville, et K. Tiede, « Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles », *Ecotoxicology*, vol. 17, n° 5, p. 344–361, mai 2008.
- [65] A. K. Suresh, D. A. Pelletier, et M. J. Doktycz, « Relating nanomaterial properties and microbial toxicity », *Nanoscale*, vol. 5, n° 2, p. 463–474, janv. 2013.
- [66] C. Pagnout, S. Jomini, M. Dadhwal, C. Caillet, F. Thomas, et P. Bauda, « Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli* », *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 92, p. 315–321, avr. 2012.
- [67] K. Feris, C. Otto, J. Tinker, D. Wingett, A. Punnoose, A. Thurber, M. Kongara, M. Sabetian, B. Quinn, C. Hanna, et D. Pink, « Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 », *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 26, n° 6, p. 4429–4436, mars 2010.
- [68] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, et K. J. Klabunde, « Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents », *Langmuir*, vol. 18, n° 17, p. 6679–6686, août 2002.
- [69] A. M. El Badawy, R. G. Silva, B. Morris, K. G. Scheckel, M. T. Suidan, et T. M. Tolaymat, « Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles », *Environmental Science & Technology*, vol. 45, n° 1, p. 283–287, janv. 2011.
- [70] G. A. Sotiriou et S. E. Pratsinis, « Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles », *Environmental Science & Technology*, vol. 44, n° 14, p. 5649–5654, juill. 2010.
- [71] M. Auffan, J.-Y. Bottero, C. Chanéac, et J. Rose, « Inorganic manufactured nanoparticles, how their physicochemical properties influence their biological effects in aqueous environments », *Nanomedicine*, vol. 5, n° 6, p. 999–1007, 2010.
- [72] D. A. Pelletier, A. K. Suresh, G. A. Holton, C. K. McKeown, W. Wang, B. Gu, N. P. Mortensen, D. P. Allison, D. C. Joy, M. R. Allison, S. D. Brown, T. J. Phelps, et M. J. Doktycz, « Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 24, p. 7981–7989, déc. 2010.
- [73] M. Auffan, J. Rose, O. Proux, D. Borschneck, A. Masion, P. Chaurand, J.-L.

- Hazemann, C. Chaneac, J.-P. Jolivet, M. R. Wiesner, A. Van Geen, et J.-Y. Bottero, « Enhanced Adsorption of Arsenic onto Maghemite Nanoparticles: As(III) as a Probe of the Surface Structure and Heterogeneity », *Langmuir*, vol. 24, n° 7, p. 3215–3222, 2008.
- [74] M. Li, S. Pokhrel, X. Jin, L. Mädler, R. Damoiseaux, et E. M. V. Hoek, « Stability, Bioavailability, and Bacterial Toxicity of ZnO and Iron-Doped ZnO Nanoparticles in Aquatic Media », *Environmental Science & Technology*, vol. 45, n° 2, p. 755–761, janv. 2011.
- [75] N. Yoshinaga et S. Aomine, « Imogolite in some ando soils », *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 8, n° 3, p. 22–29, 1962.
- [76] K. Wada et N. Yoshinaga, « The structure of imogolite », *The american mineralogist*, vol. 54, p. 50–70, 1969.
- [77] P. D. G. Cradwick, V. C. Farmer, J. D. Russell, C. R. Masson, K. Wada, et N. Yoshinaga, « Imogolite, a Hydrated Aluminium Silicate of Tubular Structure », *Nature*, vol. 240, n° 104, p. 187–189, pubmonth 1972.
- [78] K. Wada, N. Yoshinaga, et H. Yotsumoto, « High Resolution Electron Micrographs of Imogolite », *Clay Minerals*, vol. 8, n° 4, p. 487–489, 1970.
- [79] C. Levard, E. Doelsch, J. Rose, A. Masion, I. Basile Doelsch, O. Proux, J. L. Hazemann, D. Borschneck, et J.-Y. Bottero, « Role of natural nanoparticles on the speciation of Ni in andosols of la Reunion », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 73, n° 16, p. 4750–4760, 2009.
- [80] I. Basile-Doelsch, R. Amundson, W. E. E. Stone, C. A. Masiello, J. Y. Bottero, F. Colin, F. Masin, D. Borschneck, et J. D. Meunier, « Mineralogical control of organic carbon dynamics in a volcanic ash soil on La Réunion », *European Journal of Soil Science*, vol. 56, n° 6, p. 689–703, 2005.
- [81] V. C. Farmer, A. R. Fraser, et J. M. Tait, « Synthesis of imogolite: a tubular aluminium silicate polymer », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 13, p. 462–463, janv. 1977.
- [82] S. Iijima, « Helical microtubules of graphitic carbon », *Nature*, vol. 354, p. 56–58, nov. 1991.
- [83] C. Levard, J. Rose, A. Thill, A. Masion, E. Doelsch, P. Maillet, O. Spalla, L. Olivi, A. Cognigni, F. Ziarelli, et J.-Y. Bottero, « Formation and Growth Mechanisms of Imogolite-Like Aluminogermanate Nanotubes », *Chemistry of Materials*, vol. 22, n° 8, p. 2466–2473, avr. 2010.
- [84] V. C. Farmer et A. R. Fraser, « Synthetic Imogolite, A Tubular Hydroxyaluminium Silicate », in *Developments in Sedimentology*, vol. Volume 27, M.M. Mortland and V.C. Farmer, Éd. Elsevier, 1979, p. 547–553.
- [85] S. Wada et K. Wada, « Effects on substitution of germanium for silicon in imogolite », *Clays and Clay Minerals*, vol. 30, n° 2, p. 123–128, janv. 1982.
- [86] C. Levard, J. Rose, A. Masion, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, C. Dominici, O. Grauby, J. C. Woicik, et J.-Y. Bottero, « Synthesis of Large Quantities of Single-Walled Aluminogermanate Nanotube », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n° 18, p. 5862–5863, mai 2008.
- [87] P. Maillet, C. Levard, O. Spalla, A. Masion, J. Rose, et A. Thill, « Growth kinetic of single and double-walled aluminogermanate imogolite-like nanotubes: an experimental and modeling approach », *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, vol. 13, n° 7, p. 2682–2689, févr. 2011.
- [88] A. Thill, P. Maillet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi,

- et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780–3786, févr. 2012.
- [89] C. Levard, A. Masion, J. Rose, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, P. Chaurand, C. Dominici, F. Ziarelli, A. Thill, P. Maillet, et J. Y. Bottero, « Synthesis of Ge-imogolite: influence of the hydrolysis ratio on the structure of the nanotubes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, n° 32, p. 14516–14522, août 2011.
- [90] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)₃Al₂O₃Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284–11286, déc. 2013.
- [91] W. Liu, P. Chaurand, C. di-giorgio, M. De Meo, A. Thill, M. Auffan, A. Masion, D. Borschneck, F. Chaspoul, philippe Gallice, A. Botta, J.-Y. Bottero, et J. C. Rose, « Influence of the length of imogolite-like nanotubes on their cytotoxicity and genotoxicity towards human dermal cells », *Chemical Research in Toxicology*, sept. 2012.
- [92] S. van den Brule, E. Beckers, P. Chaurand, W. Liu, S. Ibouaaden, M. Palmai-Pallag, F. Uwambayinema, Y. Yakoub, A. Avellan, C. Levard, V. Haufroid, E. Marbaix, A. Thill, D. Lison, et J. Rose, « Nanometer-long Ge-imogolite nanotubes cause sustained lung inflammation and fibrosis in rats », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 11, n° 1, p. 67, déc. 2014.
- [93] J. A. Lemire, J. J. Harrison, et R. J. Turner, « Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, n° 6, p. 371–384, juin 2013.
- [94] A. García, L. Delgado, J. A. Torà, E. Casals, E. González, V. Puentes, X. Font, J. Carrera, et A. Sánchez, « Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment », *Journal of Hazardous Materials*, vol. 199–200, p. 64–72, janv. 2012.
- [95] Y. Yang, J. Wang, Z. Xiu, et P. J. J. Alvarez, « Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria », *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, vol. 32, n° 7, p. 1488–1494, juill. 2013.
- [96] Y. Yang, J. Wang, H. Zhu, V. L. Colvin, et P. J. Alvarez, « Relative Susceptibility and Transcriptional Response of Nitrogen Cycling Bacteria to Quantum Dots », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 6, p. 3433–3441, mars 2012.
- [97] S. Tripathi, D. Champagne, et N. Tufenkji, « Transport Behavior of Selected Nanoparticles with different Surface Coatings in Granular Porous Media coated with *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 13, p. 6942–6949, juill. 2012.
- [98] G. P. Kotchey, S. A. Hasan, A. A. Kapralov, S. H. Ha, K. Kim, A. A. Shvedova, V. E. Kagan, et A. Star, « A natural vanishing act: the enzyme-catalyzed degradation of carbon nanomaterials », *Accounts of Chemical Research*, vol. 45, n° 10, p. 1770–1781, oct. 2012.
- [99] R. E. Mielke, J. H. Priester, R. A. Werlin, J. Gelb, A. M. Horst, E. Orias, et P. A. Holden, « Differential growth of and nanoscale TiO₂ accumulation in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding versus trophic transfer from *Pseudomonas aeruginosa* », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, n° 18, p. 5616–5624, sept. 2013.
- [100] R. Werlin, J. H. Priester, R. E. Mielke, S. Krämer, S. Jackson, P. K. Stoimenov, G. D. Stucky, G. N. Cherr, E. Orias, et P. A. Holden, « Biomagnification of cadmium

- selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain », *Nature Nanotechnology*, vol. 6, n° 1, p. 65–71, janv. 2011.
- [101] M. W. Silby, C. Winstanley, S. A. C. Godfrey, S. B. Levy, et R. W. Jackson, « *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable », *FEMS microbiology reviews*, vol. 35, n° 4, p. 652–680, juill. 2011.
- [102] P. Ortet, M. Barakat, D. Lalaoua, S. Fochesato, V. Barbe, B. Vacherie, C. Santaella, T. Heulin, et W. Achouak, « Complete Genome Sequence of a Beneficial Plant Root-Associated Bacterium, *Pseudomonas brassicacearum* ▽ », *Journal of Bacteriology*, vol. 193, n° 12, p. 3146, juin 2011.
- [103] W. Achouak, L. Sutra, T. Heulin, J. M. Meyer, N. Fromin, S. Degraeve, R. Christen, et L. Gardan, « *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 9–18, janv. 2000.
- [104] L. Hiltner, « Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache », *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, vol. 98, p. 59–78, 1904.
- [105] W. Achouak, S. Conrod, V. Cohen, et T. Heulin, « Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy », *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 17, n° 8, p. 872–879, août 2004.
- [106] D. Pages, L. Sanchez, S. Conrod, X. Gidrol, A. Fekete, P. Schmitt-Kopplin, T. Heulin, et W. Achouak, « Exploration of intracolonial adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity », *Environmental Microbiology*, vol. 9, n° 11, p. 2820–2835, nov. 2007.
- [107] F. Gros, W. Gilbert, H. H. Hiatt, G. Attardi, P. F. Spahr, et J. D. Watson, « Molecular and Biological Characterization of Messenger RNA », *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 26, p. 111–132, janv. 1961.
- [108] P. Stougaard, S. Molin, et K. Nordström, « RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, n° 10, p. 6008–6012, oct. 1981.
- [109] R. W. Simons et N. Kleckner, « Translational control of IS10 transposition », *Cell*, vol. 34, n° 2, p. 683–691, sept. 1983.
- [110] K. M. Wassarman, A. Zhang, et G. Storz, « Small RNAs in *Escherichia coli* », *Trends in Microbiology*, vol. 7, n° 1, p. 37–45, janv. 1999.
- [111] T. E. Edwards, D. J. Klein, et A. R. Ferré-D'Amaré, « Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs », *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 17, n° 3, p. 273–279, juin 2007.
- [112] V. Pfeiffer, K. Papenfort, S. Lucchini, J. C. D. Hinton, et J. Vogel, « Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation », *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 16, n° 8, p. 840–846, août 2009.
- [113] J. M. Liu et A. Camilli, « A broadening world of bacterial small RNAs », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, n° 1, p. 18–23, févr. 2010.
- [114] A. Toledo-Arana, F. Repoila, et P. Cossart, « Small noncoding RNAs controlling pathogenesis », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, n° 2, p. 182–188, avr. 2007.
- [115] J. A. Opdyke, J.-G. Kang, et G. Storz, « GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli* », *Journal of Bacteriology*, vol. 186, n° 20, p. 6698–6705,

- oct. 2004.
- [116] E. Massé, F. E. Escorcia, et S. Gottesman, « Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli* », *Genes & Development*, vol. 17, n° 19, p. 2374–2383, oct. 2003.
 - [117] E. Sonnleitner et D. Haas, « Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species », *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 91, n° 1, p. 63–79, juill. 2011.
 - [118] E. Massé, H. Salvail, G. Desnoyers, et M. Arguin, « Small RNAs controlling iron metabolism », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, n° 2, p. 140–145, avr. 2007.
 - [119] E. Massé, C. K. Vanderpool, et S. Gottesman, « Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli* », *Journal of Bacteriology*, vol. 187, n° 20, p. 6962–6971, oct. 2005.
 - [120] S. Gottesman, « The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms* », *Annual Review of Microbiology*, vol. 58, p. 303–328, 2004.
 - [121] G. Michard, « Signification du potentiel redox dans les eaux naturelles », *Mineralium Deposita*, vol. 2, n° 1, p. 34–37, juin 1967.
 - [122] B. R. Byers et J. E. Arceneaux, « Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms », *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 35, p. 37–66, 1998.
 - [123] C. Georges et J.-M. Meyer, « High-molecular-mass, iron-repressed cytoplasmic proteins in fluorescent *Pseudomonas*: potential peptide-synthetases for pyoverdine biosynthesis », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 132, n° 1–2, p. 9–15, oct. 1995.
 - [124] H. Lin, M. A. Fischbach, D. R. Liu, et C. T. Walsh, « In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, n° 31, p. 11075–11084, août 2005.
 - [125] K. A. Mies, J. I. Wirgau, et A. L. Crumbliss, « Ternary complex formation facilitates a redox mechanism for iron release from a siderophore », *Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, vol. 19, n° 2, p. 115–126, avr. 2006.
 - [126] S. C. Andrews, A. K. Robinson, et F. Rodríguez-Quinones, « Bacterial iron homeostasis », *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, n° 2–3, p. 215–237, juin 2003.
 - [127] S. Noel, F. Rivault, I. J. Shalk, et G. L. A. Mislin, « Chimie des sidérophores : vers de nouvelles molécules pour une santé de fer? Partie I. Stratégies innovantes pour la conception d'antibiotiques », *Archive des Sciences Naturelles, physiques et mathématiques*, vol. 46, p. 121–134, 2011.
 - [128] J. Yang, I. Sangwan, et M. R. O'Brian, « The *Bradyrhizobium japonicum* Fur protein is an iron-responsive regulator in vivo », *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 276, n° 6, p. 555–564, déc. 2006.
 - [129] G. R. Richards et C. K. Vanderpool, « Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs », *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1809, n° 10, p. 525–531, oct. 2011.
 - [130] P. J. Wilderman, N. A. Sowa, D. J. FitzGerald, P. C. FitzGerald, S. Gottesman, U. A. Ochsner, et M. L. Vasil, « Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n° 26, p. 9792–9797, juin 2004.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

SOMMAIRE

Chapitre II : Matériels et Méthodes	57
1 Matériels	57
1.1 Les nanomatériaux	57
1.1.1 Les protocoles pour le contrôle des caractéristiques des Ge-imogolites.....	57
1.1.1.1 L'optimisation du temps de croissance.	57
1.1.1.2 Les modifications morphologiques.	58
1.1.1.3 Les Ge-imogolites à défauts structuraux.	58
1.1.1.4 L'ajout de fer dans la structure.....	59
1.1.1.5 La séparation de taille.	59
1.1.1.6 Bilan des échantillons de Ge-imogolites obtenus	60
1.1.2 Les nanoparticules d'or	61
1.2 Les modèles biologiques et leur exposition aux nanomatériaux	62
1.2.1 La plante <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
1.2.2 La bactérie <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	62
1.2.2.1 Souches.....	62
1.2.2.2 Cultures et exposition aux nanomatériaux	63
1.3 Le suivi des réponses biologiques	64
1.3.1 Le suivi de croissance	64
1.3.2 Les tests de toxicités.....	64
1.3.3 La génération d'espèces réactives de l'oxygène	65
1.3.4 L'état de l'homéostasie du fer	66
2 Méthodes de caractérisations.....	67
2.1 Caractérisation physico-chimique	67
2.1.1 ICP (-MS et -AES)	67
2.1.2 Granulométrie.....	68
2.1.3 Zétamétrie.....	69
2.1.4 AFM	70
2.1.4.1 Principe.....	70
2.1.4.2 Protocoles et traitement de données	71
2.1.5 DRX	72
2.1.6 Spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX).....	73
2.1.6.1 Principe.....	73

2.1.6.2	Formalisme EXAFS	76
2.1.6.3	Analyse des données XAS	77
2.1.6.4	Mise en œuvre expérimentale	79
2.2	Les outils pour le suivi des interactions nanomatériaux/organismes	80
2.2.1	Microscope à champs sombre couplé à de l'imagerie hyperspectrale	80
2.2.1.1	Principe et acquisition des données.....	80
2.2.1.2	Traitement des données	82
2.2.1.2.1	La construction de la librairie hyperspectrale	82
2.2.1.2.2	L'identification des pixels d'intérêts.....	83
2.1	Nanotomographie aux rayons X.....	85
2.1.1	Principe de mesure	85
2.1.2	Préparation des échantillons et conditions de mesures	86
2.1.3	Traitement des données.....	87
2.1.3.1	Reconstruction 3D.....	87
2.1.3.1	Isolement et mesure des particules d'intérêts.....	87
3	Bilan du chapitre.....	88
	Références Bibliographiques.....	90

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1 Matériels

1.1 Les nanomatériaux

En fonction des études réalisées, deux types de nanomatériaux ont été utilisés, des Ge-imogolites ou des nanoparticules d'or.

1.1.1 Les protocoles pour le contrôle des caractéristiques des Ge-imogolites

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction en chapitre I, les conditions de synthèse des Ge-imogolites sont bien connues grâce à plusieurs études récentes. [1]–[7].

Les protocoles utilisés lors de cette thèse sont tous basés sur les étapes de synthèses décrites dans le travail de Levard et coll. en 2008. [1] Ce protocole consiste en l'ajout d'ethoxide de germanium (TEOG) à une solution de perchlorate d'aluminium ($\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$) à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de manière à obtenir un rapport $n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}}=2$. L'hydrolyse de ces réactifs est effectuée en ajoutant de la soude à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à un débit de $1,5 \text{ ml.min}^{-1}$ jusqu'à ce qu'un rapport d'hydrolyse R ($n_{\text{OH}}/n_{\text{Al}}$) de 2 soit atteint. Après une étape de 12h sous agitation, l'étape de croissance des précurseurs est réalisée en l'étuve pendant 5 jours à 95°C . Enfin, les solutions sont dialysées (2 kDa) afin d'éliminer les sels résiduels.

En plus de sa simplicité, l'atout majeur de ce protocole réside dans le fait que varier les concentrations initiales en réactifs permet de modifier la structure des Ge-imogolites. Les paramètres de synthèses que nous avons fait varier pour obtenir des Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques variables sont illustrés en Figure 1. Les paramètres de synthèse modifiés pour chaque protocole sont détaillés dans les paragraphes suivants.

1.1.1.1 L'optimisation du temps de croissance.

L'obtention des précurseurs a été réalisée en utilisant une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à une concentration initiale $C_{\text{Al}}=0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ mélangée à du TEOG ($n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}} = 1,75$) puis hydrolysée avec un rapport d'hydrolyse (R) de 2.

Afin de réduire le temps de croissance des Ge-imogolites, nous avons apporté l'énergie nécessaire à la fermeture des proto-imogolites et à leur élongation avec une autre source que la diffusion de la chaleur en étuve. La solution de précurseurs a donc été divisée en deux aliquots. Le premier a été chauffé en étuve à 95°C ou en autoclave à 150°C ou 200°C pendant 1h, 2h ou 7 jours (**CH** pour l'acronyme anglais Conventional Heating). Le second a été irradié sous micro-ondes (**MW** pour MicroWaves) aux mêmes températures durant 1h ou 2h.

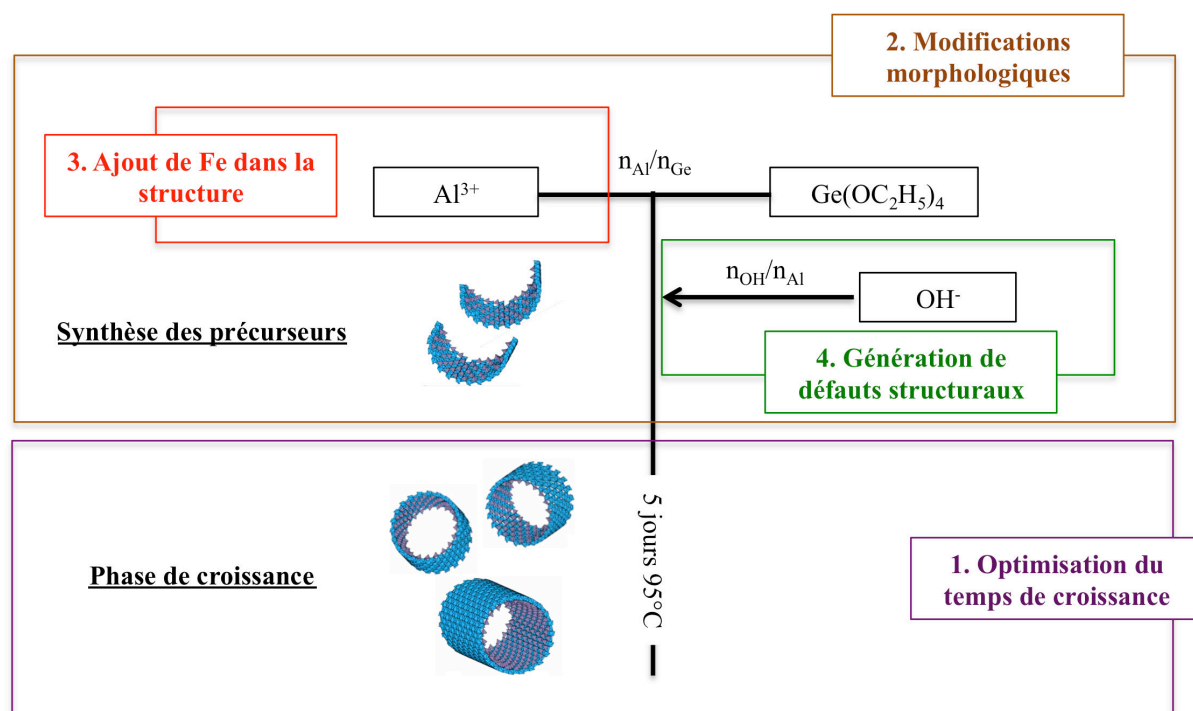


Figure 1 : Illustration des étapes du protocole de synthèse modifiées pour l'obtention de Ge-imogolites à paramètres physico-chimiques variables.

1.1.1.2 Les modifications morphologiques.

Deux types de modifications structurales ont été réalisées, à savoir (i) la variation du diamètre en synthétisant des Ge-imogolites simples parois (**SW** pour l'acronyme Anglais Single-Walled) ou doubles parois (**DW** pour Double-Walled) ou (ii) la variation de la longueur des Ge-imogolites en synthétisant des DW de longueurs micrométriques (**DW μ -long**).

Pour obtenir des SW ou des DW, il suffit de modifier la concentration initiale en perchlorate d'aluminium ($\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$). Aussi la C_{Al} est fixée à $0,75 \text{ mol.L}^{-1}$ pour l'obtention de SW et à $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pour la synthèse de DW.

La synthèse de DW μ -longs a été réalisée en modifiant les étapes d'hydrolyses et de croissance. En effet, l'hydrolyse a été réalisée grâce au relargage d'ions OH^- par l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) lors de sa décomposition sous l'effet de la chaleur. Les échantillons ont été ensuite placés pendant 5 jours à 140°C pour la phase de croissance.

1.1.1.3 Les Ge-imogolites à défauts structuraux.

Les défauts structuraux (i.e. la présence de lacunes dans la couche dioctaédrique d'aluminium) a été réalisée en modifiant le rapport d'hydrolyse R utilisé pour la synthèse des précurseurs. Aussi des SW lacunaires (**SW lac**) ont été synthétisées en utilisant de la soude comme source d'ions hydroxyles. Cependant, le rapport d'hydrolyse était de 1,5 (contre 2 pour l'obtention de structures sans lacunes)

1.1.1.4 L'ajout de fer dans la structure.

L'ajout de fer dans la structure a été réalisé en ajoutant du fer(II) monomérique aux réactifs initiaux afin de substituer des atomes d'Al par des atomes de Fe.

Aussi nous avons ajouté du perchlorate de Fe(II) ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$) à une solution de perchlorate d'aluminium à $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ à différents rapports $n_{\text{Fe}}/n_{\text{Al}}$ (0,02 ; 0,05 et 0,1). Le mélange, l'hydrolyse à la soude des réactifs et la mise en bouteille en téflon des précurseurs ont été réalisés en conditions anoxique, sous boîte à gant à atmosphère azotée. Les bouteilles, scellées, ont été sorties de l'atmosphère anoxique et placées en étuve à 95°C pendant 7 jours.

1.1.1.5 La séparation de taille.

Afin d'obtenir des échantillons d'imogolites de longueurs variables, nous avons séparé les tubes courts ($<200\text{nm}$) des tubes longs ($>200\text{nm}$) dans les solutions de SW, DW et SWlac. Pour se faire, nous avons utilisé la filtration tangentielle (Minikross Pilot TFF system, SpectrumLab). La filtration tangentielle permet de créer un flux d'échantillon parallèle à la membrane de filtration, ce qui évite de colmater la membrane lors de la filtration. Pour l'obtention de ces fractions de tailles, deux étapes ont été nécessaires

- **La séparation de taille:**

Un flux d'échantillon a été créé tangentiellement à la **membrane de filtration** en PolyEther Sulfone (PES) de porosité de 200 nm (**cut-off**). Le **perméat** contient des particules qui ont une taille leur permettant de traverser les pores de la membrane ($<200\text{nm}$). La fraction qui n'a pas traversée la membrane (**le retentât**) est constituée de particules **plus petites et plus grosses** que le cut-off. Ce retentât a été réinjecté sur la membrane 5 fois de façon à enrichir l'échantillon en particules de grandes tailles. Le débit calculé avec les volumes (V) tels que $\frac{V_{\text{retentât}}}{V_{\text{perméat}}}$ a été fixé à 10 de façon à éviter le colmatage de la membrane ou la perte de son intégrité du fait d'une pression transmembranaire trop élevée.

- **La concentration des solutions :**

Les échantillons retentât résultants étaient beaucoup plus dilués que les échantillons perméat. Afin de les reconcentrer, les mêmes étapes que pour la séparation de taille ont été réalisées, mais avec un cut-off de 2kDa (ne permettant le passage que des molécules d'eau et d'éventuels ions). L'échantillon a été filtré jusqu'à ce que $4/5$ de son volume soit passé par la membrane. Ce perméat (constitué d'eau) était éliminé et le retentât, constitué de la solution concentrée en imogolite courtes, conservé.

Grâce à cette technique de séparation nous avons obtenu trois fractions pour chaque échantillon : (i) fraction totale (nommé **NF** pour non filtré dans la suite du manuscrit) (ii) la fraction constituée de Ge-imogolites de tailles inférieures à 200nm (**<200nm**) et (iii) la fraction enrichie en particules de tailles supérieures à 200nm (**>200nm**).

1.1.1.6 Bilan des échantillons de Ge-imogolites obtenus

La totalité des échantillons synthétisés lors de ces travaux est listé en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Tableau 1 : Conditions de synthèses pour l'obtention de Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques variables et échantillons pour lesquelles des séparations de tailles ont été réalisées. TEOG : ethoxide de germanium. DW : Doubles parois ; μ -long : longueur micrométrique ; SW : simples parois ; lac : lacunaires ; CH : chauffe conventionnelle; MW : Micro-ondes. CH : Chauffe traditionnelle. NF : Non filtré

Type de Ge-imogolite	Référence	Réactifs		Germanium		Source d' OH		R	Croissance	Séparation de taille
		composition	$\square$ (mol.L ⁻¹)	composition	n_{Al}/n_{Ge}	type	$\square$ (mol.L ⁻¹)			
SW	Levard et coll., 2011[5]	Al(ClO ₄) ₃	0.75	TEOG	1.75	NaOH	0.75	2	5 jours 95°C	NF
										> 200nm
										< 200nm
DW	Maillet et coll., 2011 [4]	Al(ClO ₄) ₃	0.2	TEOG	1.75	NaOH	0.2	1.5	5 jours 95°C	NF
										> 200nm
										< 200nm
DW μ -long	Amara et coll., 2013 [7]	Al(ClO ₄) ₃	0.2	TEOG	2	Urée	0.2	2	5 jours 140°C en autoclave	NF
										> 200nm
										< 200nm
DW dopées en Fer	Cette étude [8]	Al(ClO ₄) ₃ + Fe(ClO ₄) ₂	0.2	TEOG	1.75	NaOH	0.2	2	7 jours 95°C	NF
DW MW	Cette étude	AlCl ₃	0.05	TEOG	1.75	NaOH	0.05	2	1h, 2h à 100, 150 ou 200°C. irradiation MW	NF
DW CH									1h, 2h ou 7jours à 100, 150 ou 200°C. CH	NF

1.1.2 Les nanoparticules d'or

Des nanoparticules d'or de 12nm enrobées avec différents agents (charges de surfaces positives coatées au bPEI vs négatives coatées au citrate). Vous trouverez en Tableau 2 le descriptif des nanoparticules d'or, caractérisées par le fournisseur (nanoComposix).

Tableau 2 : Caractéristiques des nanoparticules d'or utilisées données par le constructeur. NA : donnée absente. (-) : charge négative. (+) charge positive.

Taille (nm) Coating	12	
	Citrate (-)	bPEI (+)
Diamètre nm (TEM)	13,4±1,3	12,1±0,8
Potentiel zéta (mV)	-53,3	46,3
pH de la solution	6,6	7,7

1.2 Les modèles biologiques et leur exposition aux nanomatériaux

Deux modèles biologiques de rhizosphère ont été utilisés durant cette étude. La plante *Arabidopsis thaliana* et la bactérie des sols *Pseudomonas brassicacearum*.

1.2.1 La plante *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est une plante modèle utilisée dans de nombreuses études. Des graines d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Coloumbia ont été stérilisées en utilisant une solution d'hypochlorite de calcium, d'éthanol et de Tween 20. Les graines ont ensuite été rincées trois fois à l'éthanol. Ces graines stérilisées ont été déposées sur un gel stérile de solution nutritive nommée hoagland/2 [9] solidifié avec l'agent gélifiant Phytigel (Sigma, 7g.L⁻¹) dans des boîtes carrées. Le milieu avait été initialement mélangé avec des NM d'or de différentes propriétés à différentes concentrations. Ces boîtes ont été scellées avec du scotch micropore (3M, St Paul Minn. USA) et incubées verticalement avec des cycles de 16h sous lumière à 21°C (150 micromol m⁻².s⁻¹) et 8h dans le noir à 19°C pendant 10 jours.

1.2.2 La bactérie *Pseudomonas brassicacearum*

1.2.2.1 Souches

C'est la souche de bactéries *Pseudomonas brassicacearum* NFM412 (NF) qui a été utilisée lors de cette étude. Elle a été initialement isolée à partir de racines d'*Arabidopsis thaliana* [10].

Cette souche a été utilisée pour obtenir NFM421 taguée avec la red fluorescence protein (rfp). Une souche nommée NF ::*rfp* PrrF1 ::*gfp* (Tableau 3).a également été utilisée pour mettre en évidence la modulation de l'expression d'ARNnc PrrF1. Cette souche a été transformée *via*

l'électrolocation d'un plasmide (pOT1e) contenant une région codante pour la gfp (pour Green Fluorescent Protein) sous la régulation du promoteur de *prf1* [11]. Aussi quand la région promotrice de *prf1* est activée ou réprimée, la modulation de la traduction de gfp dans la cellule le sera de la même façon. [12] Le détail et les caractéristiques des souches et des plasmides utilisés se trouvent en Tableau 3.

Tableau 3 : Détails et caractéristiques des souches et des plasmides utilisées

Souches et plasmides	Phénotypes et Caractéristiques	Reference
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		
NFM421	WT	Achouak et coll. 2010 [10]
NFM421-I :: <i>rfp</i>	NFM421 with a mini-Tn5-Km-PA1/04/03-RBSII _{dsRed} -T0-T1 ; km ^r	Achouak et coll. 2014 [13]
NFM421 :: <i>rfp</i> PrrF1 :: <i>gfp</i>	NFM421-I :: <i>rfp</i> containing P0T1e plasmid ; km ^r	Cette étude
<i>plasmids</i>		
P0t1e	Transcriptional fusion of <i>gfp</i> under prrF promoter.	Allaway et coll. 2001 [11]

Ces souches sont stockées à -80°C dans du **TSB/10** (Tryptic Soy Broth, « Difco ») contenant du glycérol et de la kanamycine. Une goutte de ce stock a été étalée sur du **TSA/10** (TSB/10 + 15g.L⁻¹ agar) et la culture a été réalisée à 30°C pendant 15h. Une colonie a été inoculée dans le milieu TSB pour 12h à 30°C jusqu'à ce que le nombre de bactéries atteigne 10¹⁰ bactéries.mL⁻¹. Enfin, les bactéries ont été centrifugées à 5000g pendant 5min puis rincées trois fois avec le milieu de culture **CAA** (5g.l⁻¹ d'acides casaminés, 1.18g.l⁻¹ d'hydrogénophosphate de potassium et 0.25g.l⁻¹ de sulfate de magnésium). Ces bactéries ont ensuite été resuspendues dans du CAA pour l'obtention de la suspension de **pré-culture** à 10¹⁰ bactéries.mL⁻¹.

1.2.2.2 Cultures et exposition aux nanomatériaux

Les bactéries issues de la pré-culture ont été inoculées au CAA afin d'obtenir 10⁷ bactéries.mL⁻¹. L'exposition de *Pseudomonas brassicacearum* aux NM a été réalisée en utilisant deux *scenarii* :

Le contact direct

Les bactéries sont inoculées dans le milieu de culture qui contient différentes concentrations de nanomatériaux. Ces cultures ont été faites soit dans des erlenmeyers (150ml) pour **l'analyse chimique**, soit dans des microplaques 96 puits (Greiner 96 flat bottom black

polystyrene) pour les études nécessitant un **suivi de fluorescence, d'absorption de la lumière** ou de dilutions en cascades pour le décompte des **CFU**.

Le contact indirect

Dans ce scénario, les nanomatériaux ont été dilués dans 10ml du milieu de culture puis placés dans une membrane de dialyse de porosité 10kDa. Cette membrane de dialyse a ensuite été immergée dans un erlenmeyer contenant 140 ml de milieu de culture inoculé des bactéries (10^7 bactéries /mL). La concentration en nanomatériaux considérée est calculée en divisant la quantité de matériaux apportée par le **volume total** de solution (intérieur/extérieur de la membrane de dialyse).

Les cultures ont été réalisées en triplicats, cultivées à 28°C pendant 24h sous agitation (150rpm).

1.3 Le suivi des réponses biologiques

1.3.1 Le suivi de croissance

La croissance bactérienne a été mesurée par l'absorbance de la lumière à 600nm à intervalles réguliers lors de la phase de croissance des cultures. Après 24h d'exposition les cultures ont été diluées en séries dans du KCl à 10^{-3} mol.L⁻¹ puis étalées sur boîte de pétri (TSA/10). Après croissance pendant 24h à 30°C les colonies formées ont été comptées afin de déterminer le nombre de **CFU** (Colony Forming Unit) par millilitre de culture.

1.3.2 Les tests de toxicités

La souche NFM421 wt a été exposée aux NM à différentes concentrations dans de l'eau ultrapure pendant 15min, puis les CFU ont été comptés. Le pourcentage de bactéries viables après exposition a été calculé de la façon suivante : $100 \times \frac{CFU_{bactéries\ exposées\ aux\ NMs}}{CFU_{bactéries\ non\ exposées}}$

Afin de compléter cette donnée, le nombre de bactéries vivantes a été mesuré en utilisant le kit Live/Dead BacLight Bacterial viability test (Thermo Fisher). Après exposition aux NM, les bactéries ont été incubées avec deux sondes fluorescentes, le syto 9 (qui diffuse à travers les membranes bactérienne et qui fluoresce dans le vert) et l'iodure de propidium (qui ne traverse que les cellules endommagées et qui fluoresce dans le rouge).

Les bactéries étaient ensuite observées au microscope confocal à épifluorescence (Olympus Fluoview FV10i). Les signaux issus du Syto9 dans le vert correspondant aux bactéries vivantes ($\lambda_{ex}= 490$, $\lambda_{em}= 527$) et de l'iodure de Propidium rouge correspondant aux bactéries aux membranes endommagées ($\lambda_{ex}= 559$, $\lambda_{em}= 569$) ont été suivis. Le pourcentage

de bactéries mortes a été calculé en utilisant le logiciel ImageJ v 1.49 avec au moins 1000 bactéries issues de plusieurs images (au minimum 5) pour chaque condition.

1.3.3 La génération d'espèces réactives de l'oxygène

La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules a été déterminée en utilisant la sonde non-fluorescente **DCFDA** (2',7'-dichlorodihydrofluorescein d'acétate). En traversant les membranes cellulaires, le groupement acétate de la sonde est clivé du fait de l'activité des estérases intracellulaires. Si les cellules contiennent du **H₂O₂**, **OH[•]**, **ONOO⁻** ou **des hydroperoxides**, la sonde sera oxydée et prendra une conformation fluorescente (DCF).

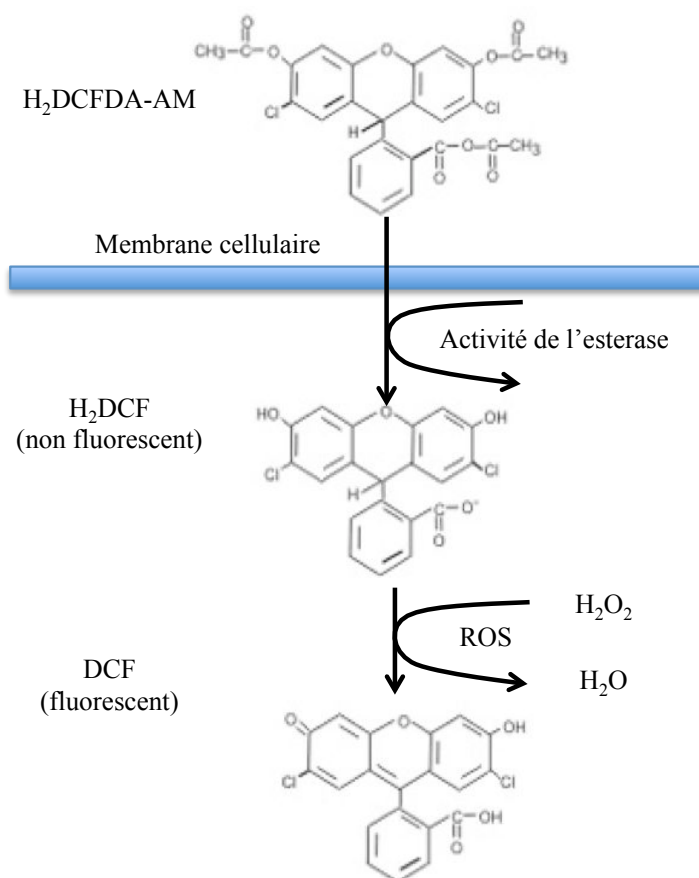


Figure 2: Changement de conformation de la sonde DCFDA. En traversant la membrane la sonde est clivée par les estérases intracellulaires. En présence de ROS, elle est oxydée et change de conformation pour devenir fluorescente.

Aussi, les cellules de la souche NFM421 *::rffp* cultivée dans CAA ont été centrifugées à 12000g pendant 2min et rincées trois fois avec le milieu de culture, pour être finalement resuspendues dans 500µl de CAA contenant 500µM de DCFDA. L'électroporation des bactéries pour introduire la sonde DCFDA dans les cellules a été réalisée dans des cuvette de 1mm à 25µF, 2,5kV et 200 ohm pour 5ms (Multiporator, Eppendorf, Germany) [14]. Les

cellules ont ensuite divisées en 5 fractions. Une a servi de témoin négatif (pas d'exposition), une a été incubée avec 25mM H₂O₂ (contrôle positif), et les 3 autres étaient exposées à des NM. Les bactéries ont ensuite été incubées à 37°C pour 15min.

La fluorescence des bactéries a été observée au microscope confocal à épifluorescence (Olympus Fluoview FV10i). Les fluorescences issues de la DCF dans le vert (λ_{ex} = 490, λ_{em} = 527) et des bactéries dans le rouge RFP (λ_{ex} = 559, λ_{em} = 569) ont été suivies. Le pourcentage de bactéries fluorescentes dans le vert a été calculé en utilisant le logiciel ImageJ v 1.49 avec *a minima* 1000 bactéries issues d'un minimum de 5 images par réplicat.

1.3.4 L'état de l'homéostasie du fer

L'homéostasie intracellulaire du fer a été indirectement suivie *via* les modifications de la transcription de l'ARNnc PrrF1 en utilisant la souche NFM421 ::*rfp* PrrF1 ::*gfp*. Cette souche a été transformée avec un plasmide contenant le gène codant pour la *gfp* sous la régulation du promoteur de PrrF1 (Figure 3). Ainsi, lorsque la transcription du gène PrrF1 sera régulée, la traduction de la *gfp* le sera de la façon identique. De cette manière, si l'expression des PrrFs est réprimée, la quantité de *gfp* traduite dans la cellule sera moindre.

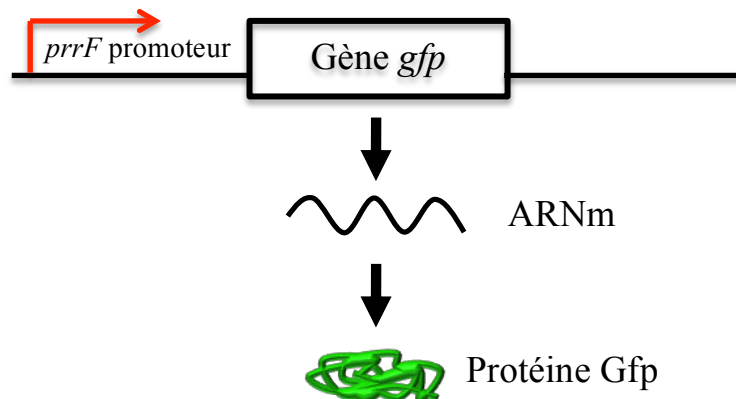


Figure 3 : Fusion transcriptionnelle du gène codant pour la *gfp* derrière le promoteur PrrF1 dans le plasmide poT1e

La croissance de la souche NFM421 ::*rfp* PrrF1 ::*gfp* a été réalisée en utilisant les scénarios de contact direct ou indirect avec les NM. La fluorescence émise par les bactéries dans le vert (λ_{ex} : 473nm; λ_{em} : 510nm) a été mesurée en utilisant le spectrophotomètre TECAN I-control, puis normalisée par le nombre de bactéries en suspensions (déterminé en décomptant les CFU) afin d'obtenir une intensité de *gfp* par cellule.

2 Méthodes de caractérisations

2.1 Caractérisation physico-chimique

Afin d'étudier finement les caractéristiques physico-chimiques des imogolites synthétisées avant et après les tests de toxicités, une large gamme de moyens analytiques a été utilisée (Figure 4). A l'échelle de la solution, les ICP-AES et –MS nous ont donné des informations sur la composition chimique des composés. L'analyse de la taille des nanomatériaux et de ses agrégats a été réalisée par DLS, et celle de leur potentiel zeta par mesure de leur mobilité électrophorétique. La forme des particules a été déterminée en microscope à force atomique (AFM), leur cristallinité en diffraction des rayons X (DRX). Enfin, des informations sur la spéciation des éléments à l'échelle de l'atome ont été obtenues grâce à la spectroscopie d'absorption des rayons X.

Les paragraphes suivants ont pour objet d'en présenter les différents outils.

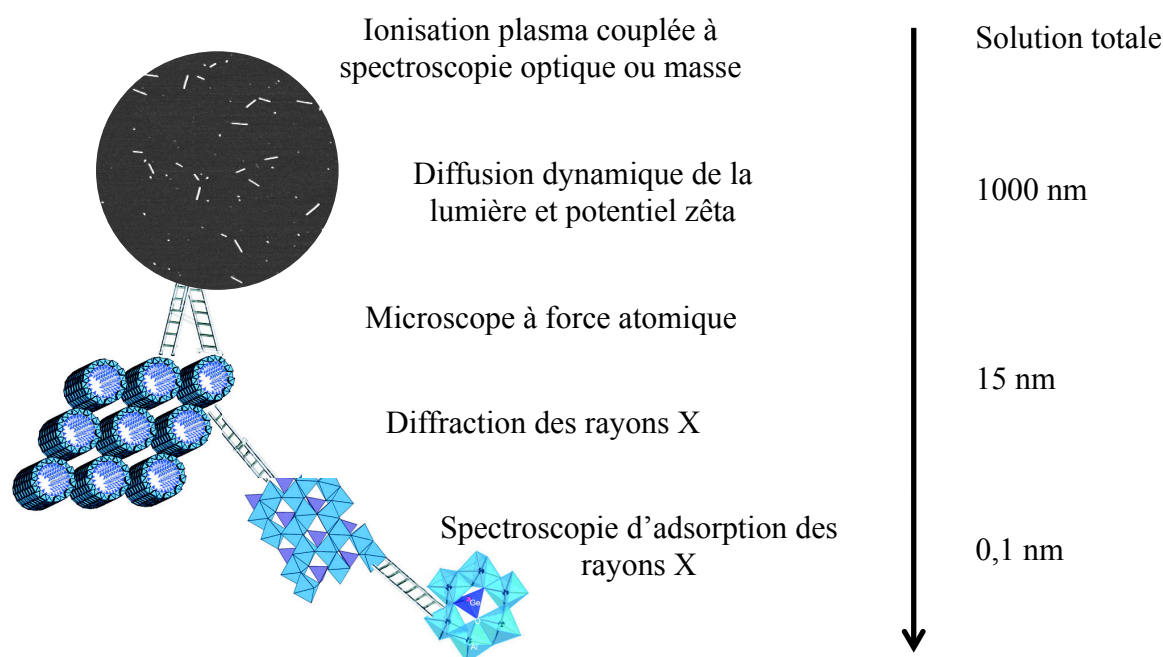


Figure 4 : Techniques de caractérisations structurales multi-échelles utilisées

2.1.1 ICP (-MS et -AES)

Les mesures d'ICP permettent de mesurer les concentrations en éléments présents dans des échantillons liquides.

L'ICP est basée sur la transformation de l'échantillon en aérosol liquide à l'aide d'argon gazeux. Cet aérosol est dirigé vers une torche à plasma (6000-8000 K), qui vaporise, dissocie, atomise et ionise les éléments.

L'**ICP-AES** (torche à plasma couplée à une spectroscopie d'émission atomique), plus rapide et multi-élémentaire, permet un screening efficace mais a une sensibilité moins élevée (dizaine de $\mu\text{g.l}^{-1}$) que l'ICP-MS ($< 1\mu\text{g.l}^{-1}$). La température élevée du plasma a pour effet d'exciter les atomes vers un niveau d'énergie supérieur. Lors de leur retour à l'état stable, les atomes émettent une série d'ondes électromagnétiques, dans une gamme de longueur d'onde spécifique à chaque élément. L'intensité de cette émission est proportionnelle à la concentration de l'élément, et est analysée par un spectromètre d'émission optique. Au CEREGE nous utilisons l'ICP-AES Horiba Ultima 2. L'ICP-AES nous a servie à mesurer les rapports $n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}}$ des solutions d'imogolites synthétisées.

Dans le cas de l'**ICP-MS**, la torche à plasma est couplée à un spectromètre de masse, qui classe les ions issus de l'ionisation des atomes dans la torche à plasma selon leur rapport masse/charge, spécifique à chaque élément. L'ICP-MS, d'une limite de détection plus basse que l'ICP-AES nous a permis de doser des éléments à l'état de traces dans les cultures de bactéries. Au CEREGE, nous avons utilisé le NexION 350X, Perkin Elmer

Du fait de la nature de la mesure, les échantillons doivent être dissous pour être analysés. Aussi, les échantillons ont été minéralisés en mélangeant l'échantillon à de l'acide nitrique ultra pur (75%) (1 : 3 v/v) pendant 12h. Puis les échantillons minéralisés ont été dilués avec de l'eau ultra pure. Les concentrations ont été déterminées par comparaison des intensités mesurées avec celles obtenues lors de l'établissement des courbes d'étalonnage. Des solutions standard ont été utilisées pour la droite de calibration. Pour chaque échantillon, trois répliques ont été préparés et trois mesures par réplique ont été effectuées.

2.1.2 Granulométrie

Les techniques de mesures granulométriques en solution donnent accès au diamètre hydrodynamique des nanoparticules et de leurs agrégats, c'est-à-dire le diamètre des particules et leur couche de solvation.

La **spectroscopie par corrélation de photons** (PCS), ou diffusion quasi-élastique de la lumière permet de mesurer le diamètre hydrodynamique de particules en suspensions de 1nm à $1\mu\text{m}$. Cette technique mesure les fluctuations de l'intensité du laser en fonction du temps lorsque les particules sont soumises au **mouvement brownien** (agitation des particules due à leur collision avec des molécules d'eau). L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet de déterminer une distribution du coefficient de diffusion des particules qui sont convertis en distribution de taille, à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein (Équation 1).

Équation 1 : Equation de Stokes-Einstein pour le calcul du rayon hydrodynamique d'une particule ou d'agrégats.

$$D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta R}$$

Avec D : le coefficient de diffusion
 R le rayon hydrodynamique
 κ la constante de Boltzmann
 T la température
 η la viscosité du milieu.

Les mesures de PCS ont été réalisées avec le granulomètre de Malvern nanoZ-S.

2.1.3 Zétamétrie

La zétamétrie est une technique qui permet la mesure du **potentiel zêta** de particules en solution, donnant ainsi une indication sur la stabilité des particules en suspension en fonction des paramètres physico-chimique des medias dans lesquelles elles se trouvent.

Le potentiel zêta représente la charge des ions qui entourent une particule en solution. Une particule chargée par exemple négativement, est entourée par une couche fine d'ions positifs appelée **couche de Stern** (Figure 5). Le long de la **couche diffuse**, le potentiel varie pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule, c'est à dire au niveau de son **plan de cisaillement** (limite entre la solution qui se déplace avec la particule et celle qui se déplace sans).

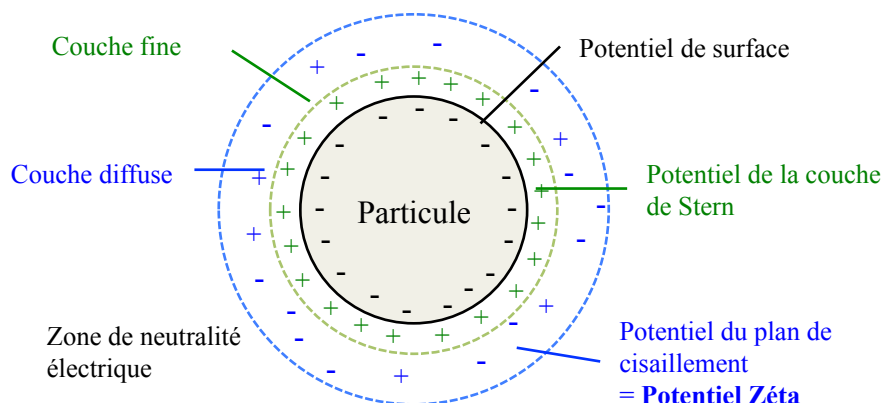


Figure 5 : Charge et potentiels électriques d'une particule, d'après Simon-Deckers, 2008 [15]. La charge d'une particule induit l'apparition de couches chargées s'organisant autour d'elle. Le potentiel zêta correspond au potentiel présent au point de cisaillement (qui est du même coup le diamètre hydrodynamique de la particule).

La mesure du potentiel zêta repose sur la technique de vélocimétrie laser Doppler qui mesure le décalage en fréquence de faisceaux laser éclairant des particules entraînées par un fluide. L'appareil applique un champ électrique dans la suspension contenant les particules chargées. Or les particules acquièrent leur mobilité en fonction de leur charge et de leur cortège ionique, et donc de leurs potentiel zêta. Ainsi la vitesse des particules est directement corrélée à leur potentiel zêta, qui peut être déterminé grâce à la formule de Henry.

Équation 2 : Formule de Henry pour le calcul du potentiel zêta d'une particule ou d'agrégats.

$$\mu_e = \frac{2}{3} \times \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} \times f_1(\kappa a)$$

Avec : μ_e la mobilité électrophorétique

ε_0 et ε_r respectivement la permittivité du vide et du milieu

ζ le potentiel zêta

η la viscosité du milieu

$f_1(\kappa a)$ une fonction dépendante de la taille de la particule (a) et de l'épaisseur (κ) de la double couche (fine + diffuse)

2.1.4 AFM

2.1.4.1 Principe

Cette technique de microscopie permet de caractériser la morphologie (hauteur/longueur) des particules après séchage de la solution.

La microscopie à force atomique est basée sur l'interaction d'une **pointe** de quelques nanomètres de largeur avec les atomes constituant les particules sur le support. Cette pointe est portée par un **cantilever** et sonde l'échantillon en balayant sa surface à l'horizontal et en oscillant à la verticale, sans être en contact permanent avec l'échantillon (Figure 6). Un laser, centré sur le cantilever est aligné sur un récepteur photodiode et suit les modifications d'oscillation de la pointe. L'image finale contient une information de longueur (résolution d'une vingtaine de nanomètres -environ 2 fois la largeur de la pointe) et de hauteur (résolution de l'ordre de 0,1nm). Ces images permettent de réaliser des répartitions de taille et de hauteur des particules. Les détails de la technique d'AFM et les traitements de données sont résumés en Figure 6.

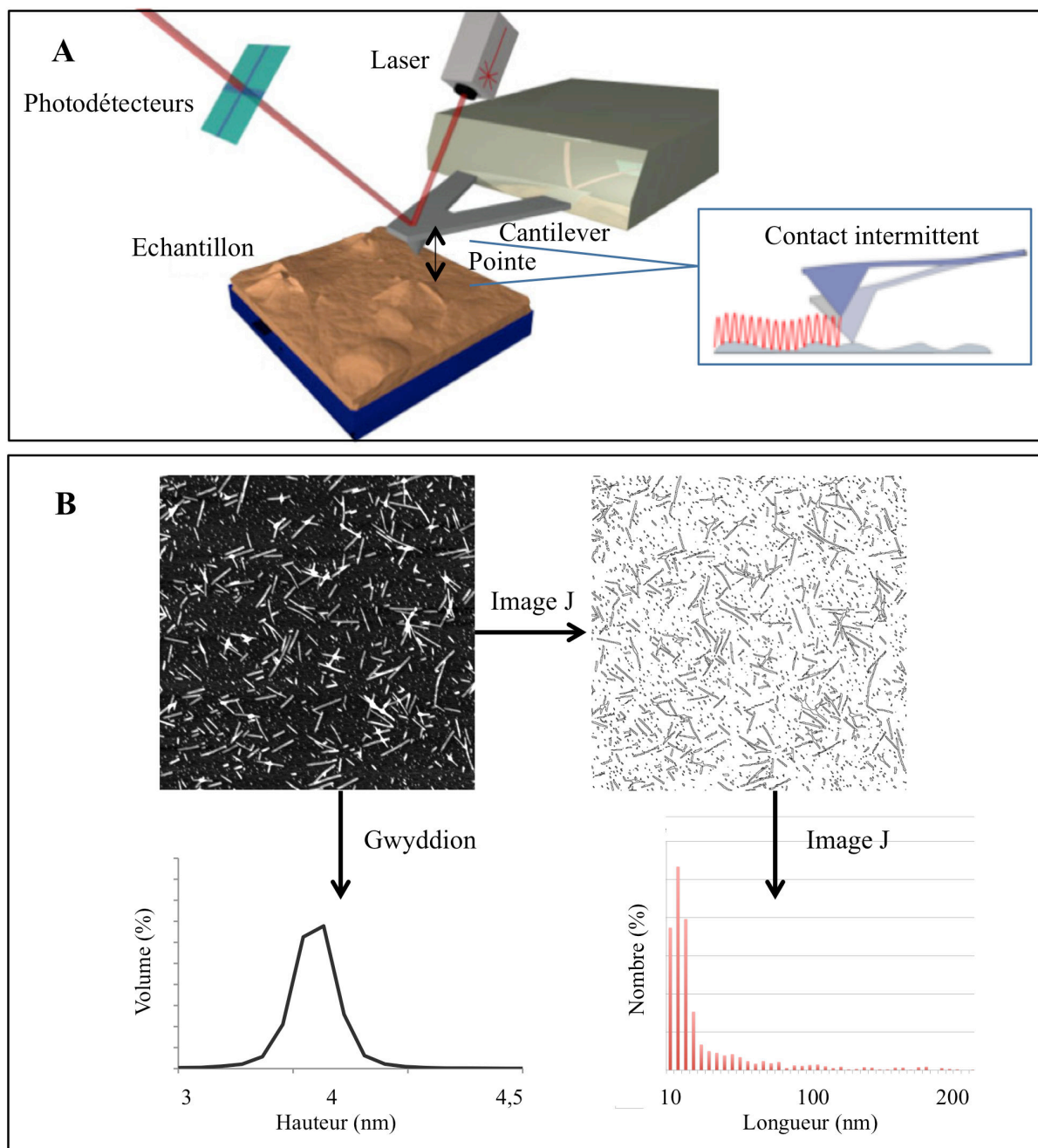


Figure 6 : Principe de fonctionnement de l'AFM et chaîne de traitement des données. (A) acquisition de l'image. Une pointe de 10nm de diamètre sonde la surface de l'échantillon en oscillant à sa surface. (B) Les images sont extraites avec le logiciel Gwyddion. Les profils de hauteur de chaque pixel d'intérêt sont extraits en utilisant le logiciel Gwyddion pour en dessiner les répartitions de hauteur. L'image est ensuite traitée *via* le plug-in « tubeness » d'ImageJ afin d'obtenir des tubes bien définis sur l'image avant d'utiliser la fonction « analyse particule » pour en extraire la répartition de longueur des tubes.

2.1.4.2 Protocoles et traitement de données

Les observations AFM de NM ont été réalisées avec un AFM Innova (Brucker). Les échantillons d'imogolites ont été dilués dans de l'eau ultra pure jusqu'à l'obtention d'une concentration de 1mg.L^{-1} . Une goutte ($7\mu\text{l}$) de cette solution a ensuite été déposée sur une

plaque de mica clivée (chargée négativement) et séchée à 40°C pendant plusieurs heures avant l'observation.

Les images obtenues permettent d'extraire les informations de longueurs des particules, mais également des informations de hauteurs. Les niveaux de gris des images sont fonction de la hauteur des particules. Il est ainsi possible d'extraire les histogrammes des images et de les seuiller pour sélectionner des particules de hauteurs différentes. Cette technique a été notamment utilisée pour comptabiliser les proto-imogolites (1nm de hauteur) et les tubes (4nm de hauteur) sur les mêmes images afin d'en calculer les proportions.

2.1.5 DRX

La diffraction des rayons X (DRX) sur poudre permet une estimation rapide de la cristallinité des matériaux synthétisés. La position, l'intensité et la forme des pics de DRX sont influencées par la structure atomique, la nature des atomes et les distances interatomiques.

Dans le cas d'une poudre à orientation supposée parfaitement statistique, il existe une famille de plan (hkl) présentant au faisceau de rayons X (RX) une incidence θ compatible avec la loi de Bragg (Équation 3)

Équation 3 : Loi de Bragg

$$\eta\lambda = 2d\sin\theta$$

Avec d la distance interréticulaire
 θ : Demi-angle de déviation
 η : l'ordre de diffraction
 λ : la longueur d'onde des rayons X

L'observation des raies de Bragg correspondant à ces incidences permet donc, en se reportant à une banque de données minéralogiques ou à la littérature, d'identifier précisément la nature des composés cristallisés constitutifs d'un échantillon.

Dans notre cas, les poudres d'imogolites étaient obtenues par lyophilisation, broyées puis placées dans un capillaire en borosilicate (0,3mm de diamètre). Les analyses ont ensuite été faites au CEREGE avec un diffractomètre X'Pert Pro (PANalytical) en utilisant une anti-cathode de cobalt ($\lambda_{K\alpha}=1,79\text{\AA}$) à 40 kV et 40mA. Les scans étaient réalisés entre 2 et $55^\circ 2\theta$ avec un pas de $0,05^\circ$ et un temps de comptage de 150s, pour un temps de scan total de 2h.

Dans la littérature, les plans de diffractions correspondants aux pics des diffractogrammes de Ge-imogolites n'ont jamais été identifiés à notre connaissance. Cependant, en réalisant les protocoles permettant de synthétiser des Ge-imogolites SW ou DW (Figure 7), nous avons

systématiquement observé des profils différents et discriminants entre SW et DW, nous permettant d'énoncer avec certitude de la nature (SW vs DW) des Ge-imogolites synthétisées.

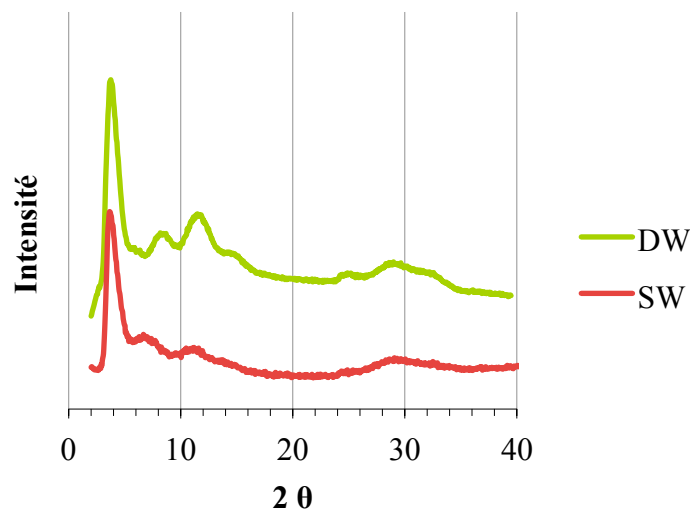


Figure 7 : Diffractogrammes d'un échantillon DW (en vert) et SW (en rouge).

2.1.6 Spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX)

Cette technique permet de déterminer la spéciation d'un élément (germanium, et fer) présent dans nos échantillons solides. Les spectres **EXAFS** (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) correspond à l'adsorption des rayons X à différentes énergies et renseigne sur l'environnement atomique de l'élément cible (i.e. distances, natures et nombre des atomes voisins présents sur un rayon de 4-5Å).

2.1.6.1 Principe

La XAS correspond à l'excitation des électrons de niveau de cœur provoqué par l'absorption d'un photon. La méthode consiste à mesurer le coefficient d'absorption des rayons X (μ) d'un échantillon en fonction de l'énergie du rayonnement incident (E). Cette absorbance est définie par la loi de Beer-Lambert (Équation 4)

Équation 4 : Loi de Beer Lambert

$$\mu(E)x = \ln(I_0/I_t)$$

Avec

- μ : le coefficient d'absorption des rayons X
- E : L'énergie du rayon incident
- x : l'épaisseur de l'échantillon
- I_0 : l'intensité du faisceau incident
- I_t : l'intensité du rayon transmis

Pour des systèmes où l'élément excité est majoritaire, le mode de détection utilisé est **la transmission**. Le coefficient d'absorption total de l'échantillon se calcule à l'aide de l'équation précédente. En revanche pour des systèmes où l'élément excité est minoritaire, le mode de détection utilisé est **la fluorescence X**, l'intensité d'un pic de référence étant directement proportionnelle à l'absorption de l'élément sélectionné au seuil considéré. Le coefficient d'absorption de cet élément est alors calculé par l'équation suivante.

Équation 5 : Calcul du coefficient d'adsorption d'un échantillon en détection de fluorescence.

$$\mu(E)x = \ln(I_f/I_0)$$

Avec I_f l'intensité de fluorescence

Selon l'énergie du photon incident, différents processus physiques conduisent à différentes structures sur le spectre d'absorption des rayons X. La Figure 8 représente un spectre d'absorption enregistré au seuil K du germanium et les différents processus mis en jeu. Un spectre d'absorption est généralement décrit en trois parties :

La région du préseuil. Dans cette zone, l'énergie du photon incident (E) est nettement inférieure à l'énergie d'ionisation (E_0 , niveau de Fermi) et ne permet pas l'excitation des électrons de l'élément étudié. En transmission, le coefficient d'absorption provient des autres éléments de l'échantillon et décroît de façon monotone. En fluorescence, le coefficient d'absorption de l'élément au seuil considéré est proche de 0. Cette région du préseuil, notée $\mu_0(E)$, correspond au fond continu et est considérée comme la ligne de base.

La région du seuil ou XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Cette zone s'étend jusqu'à 50 eV après le seuil et renseigne sur le degré d'oxydation et la symétrie de l'atome cible. Pour E inférieur mais proche de E_0 , l'électron passe de son état fondamental à un état électronique excité juste en dessous de l'énergie de Fermi. Cette énergie peut être suffisante pour qu'un électron transite vers les premiers niveaux vides ou partiellement remplis. Ce phénomène peut se traduire par l'apparition d'un prépic avant le seuil.

Pour $E_0 < E < E_0 + 50\text{eV}$, l'électron est éjecté vers le continuum avec une énergie cinétique faible et un **libre parcours moyen** (distance parcourue sans perte d'énergie) très grand. Le photoélectron est alors impliqué dans de nombreux phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Ces structures près du seuil renseignent sur la **coordination** de l'atome cible. Enfin la position du seuil peut être reliée au **degré d'oxydation** de l'atome absorbeur.

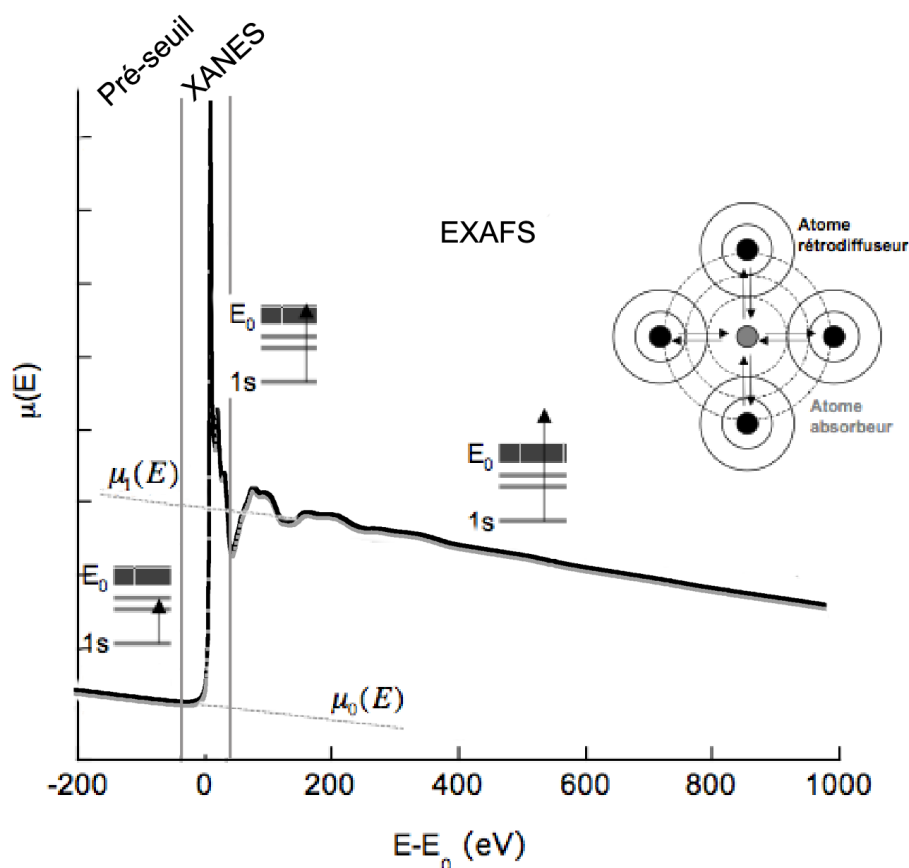


Figure 8. Spectre XAS de Ge-imogolite enregistré au seuil K du Ge.

La région EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). C'est la partie du spectre qui nous a intéressé durant cette thèse. Dans cette zone $E_0 + 50\text{eV} < E < E_0 + 1000\text{eV}$, l'électron de cœur est éjecté vers les états du continuum. L'énergie cinétique étant importante et le libre parcours moyen plus faible, le photoélectron est essentiellement impliqué dans des phénomènes de **diffusion simple** avec les atomes voisins. Le spectre d'absorption présente deux composantes : une fonction lentement décroissante notée et une fonction oscillante autour de $\mu_1(E)$. L'onde qui est associée à ces photoélectrons va être rétrodiffusée par les atomes de la sphère de coordination de l'atome central et interfère avec l'onde émergente. Cela donne lieu aux oscillations EXAFS dont l'étude permet de caractériser la **nature**, le **nombre** et les **distances** des voisins de l'atome cible, ainsi que le **désordre structural** au sein d'un échantillon.

2.1.6.2 Formalisme EXAFS

L'équation EXAFS (Équation 6) dans le formalisme d'onde sphérique de **diffusion simple** (i.e. seuls les trajets aller-retour de l'électron de l'atome absorbeur vers chacun de ses voisins sont pris en compte) s'écrit :

Équation 6 : Formule de l'EXAFS

$$\chi(k) = - \sum_{i=1}^N \frac{N_i S_0^2}{k R_i} |f_i(\theta, k, R_i)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{2R_i/\lambda(k)} \sin(2kR_i + \phi_i(k) + 2\delta_c(k))$$

Avec:

k : Module du vecteur d'onde du photoélectron défini par $k = \sqrt{(h\nu - E_0)^{2m_e}/h^2}$ avec la masse de l'électron, l'énergie du photon incident et l'énergie d'ionisation de l'élément absorbant.

$|f_i(\theta, k, R_i)|$: Fonction d'amplitude de rétrodiffusion de l'atome i selon l'angle par rapport à la direction de l'onde incidente.

N_i : Nombre de voisins de type i .

R_i : distance atome absorbeur – atome voisin.

$2\sigma_i$: Facteur Debye-Waller comprenant les termes de désordre structural (distribution des distance) et de désordre dynamique (agitation thermique).

$\lambda(k)$: Libre parcours moyen du photoélectron éjecté.

S_0^2 : Terme lié aux effets multi-électroniques.

$\delta_c(k)$: Fonction de déphasage induite par la traversée du potentiel de l'atome central.

$\phi_i(k)$: Fonction de déphasage de l'atome rétrodiffuseur.

Dans cette équation, la fonction sinus traduit l'interférence entre l'onde incidente et l'onde rétrodiffusée. Chaque paire atomique (ou chemin de diffusion simple) engendrant une sinusoïde intervient dans l'équation par l'intermédiaire du signe somme. **La fréquence** des oscillations dépend de la **distance interatomique** et de la **nature des voisins**. **L'amplitude** des oscillations est liée **au nombre de voisins**, à **leur distance** et à **leur nature** et à la **densité électronique** de l'élément rétrodiffuseur. Plus la densité électronique sera forte, plus son amplitude de rétrodiffusion sera grande.

2.1.6.3 Analyse des données XAS

L'enregistrement d'un signal en absorption des rayons X ne donne pas directement accès aux spectres XANES et EXAFS. Une étape préliminaire de normalisation (pour le XANES) et également d'extraction (pour l'EXAFS) est nécessaire. Ce traitement ainsi que l'affinement des spectres EXAFS a été réalisé à l'aide du logiciel « iXAFS » [16]. Ce logiciel permet de modéliser le signal obtenu en faisant varier des paramètres choisis (comme le type et le nombre de voisin, leur distance, et le désordre structural). Les modèles les plus proches du signal obtenus seront ceux avec les paramètres de structures les plus représentatifs de l'échantillon. La figure suivante (Figure 9) présente l'organigramme de la procédure de traitement et d'affinement des spectres XAS.

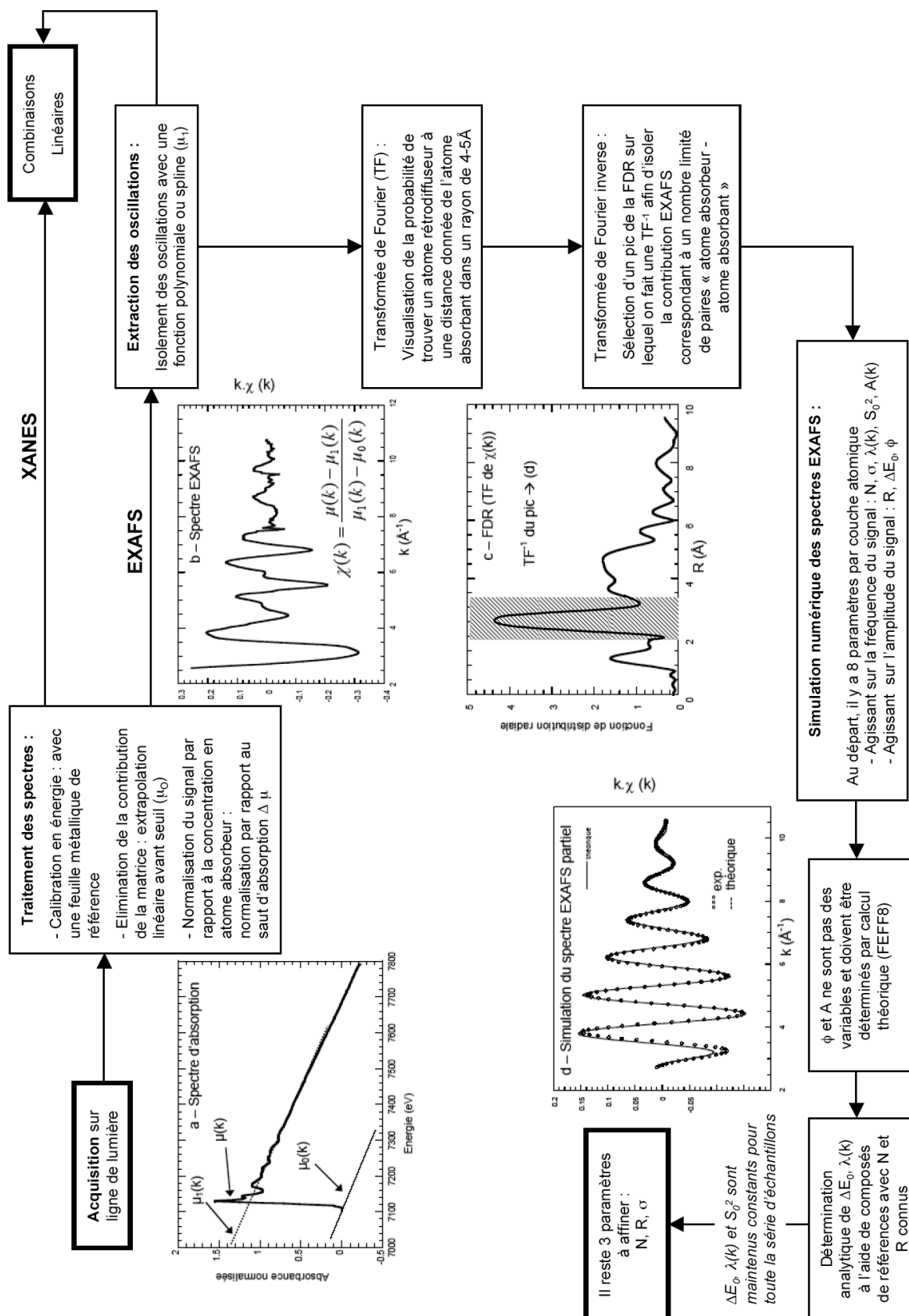


Figure 9. Organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS, d'après Auffan, 2007.

2.1.6.4 Mise en œuvre expérimentale

La mesure du coefficient d'absorption des rayons X est le plus souvent réalisée avec un **rayonnement synchrotron** car elle nécessite un flux de photon incident important, dont l'énergie peut varier de manière continue sur un large domaine énergétique. Le rayonnement synchrotron est la radiation électromagnétique émise par des électrons circulants à des vitesses quasi-relativistes (1 à 6 GeV). Les électrons circulent dans un anneau de stockage. Un rayonnement X très brillant est émis lorsque ces particules sont déviées sous l'influence d'un champ magnétique. Les propriétés du rayonnement synchrotron dépendent principalement du courant et de l'énergie du faisceau d'électrons dans l'anneau de stockage ainsi que des dispositifs d'insertion. Une **ligne de lumière** dédiée à l'absorption X est principalement composée d'un monochromateur (sélectionnant une longueur d'onde dans le spectre continu du rayonnement synchrotron selon la loi de Bragg), de miroirs (rejetant les longueurs d'onde harmoniques), de fentes (limitant la taille du faisceau) et des détecteurs (mesurant les intensités I_0 , et I_f) (Figure 10).

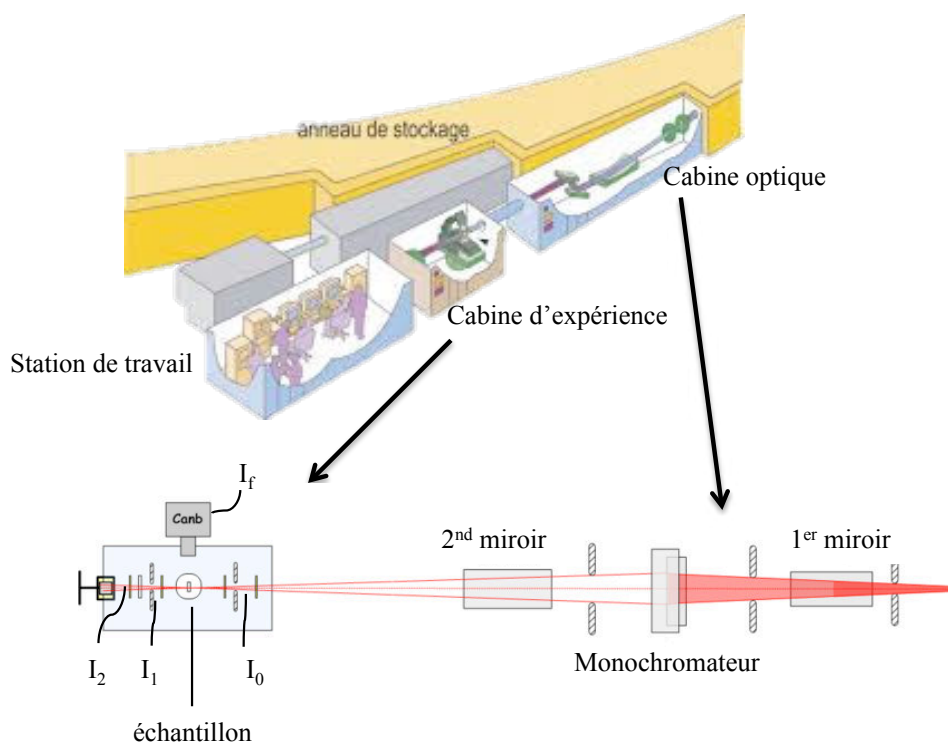


Figure 10. Schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à la XAS (ex: du montage de la ligne FAME de l'ESRF à Grenoble) (www.esrf.fr).

Au cours de cette thèse, des spectres XAS ont été enregistrés à différents seuils d'absorption et sur différentes lignes de lumières, chacune ayant leur propre spécificité (Tableau 4).

Tableau 4 : Lignes de lumières utilisées et leur spécificité.

Ligne de lumière	Synchrotron	Seuils d'absorption	Spécificité
FAME	ESRF, Grenoble France	K du Fe	échantillons dilués
XAFS 11.1	ELETTRA, Trieste, Italie	K du Ge et K du Fe	échantillons concentrés

2.2 Les outils pour le suivi des interactions nanomatériaux/organismes

L'étude des interactions entre les NM et les cellules est complexe et peu de méthodes sont adéquates pour les étudier. Dans cette thèse, nous avons testé deux nouveaux outils pour ces études, **le microscope à champ sombre couplé à de l'analyse hyperspéctrale et la nanotomographie aux rayons X**.

Puisque ces outils sont récents, nous avons voulu utiliser des modèles simples en étudiant les interactions entre *A. thaliana* ou *P. brassicacearum* et des nanoparticules d'or ou les Ge-imogolite.

Voici le descriptif des techniques utilisées

2.2.1 Microscope à champs sombre couplé à de l'imagerie hyperspéctrale

Les méthodes communément utilisées pour l'étude de l'interaction du vivant et des NM comme les techniques de microscopies ou de spectroscopies nécessitent des étapes de séparations ou de préparation des échantillons qui peuvent mener à de nombreux artefacts. La microscopie à champ sombre équipée d'un spectrophotomètre pour **l'imagerie hyperspéctrale** (HSI pour Hyperspectral System Imaging) est un outil récent qui est très prometteur pour la détection et la caractérisation de MN dans des systèmes environnementaux complexes [17].

2.2.1.1 Principe et acquisition des données

L'illumination de champ sombre utilise une source de lumière alignée avec soin afin de minimiser la quantité de lumière directement transmise et de ne collecter que la lumière diffusée par l'échantillon. Elle permet d'augmenter considérablement le contraste des images, particulièrement pour les échantillons transparents.



Figure 11 : Microscope confocal à champ sombre (à gauche) équipé d'un spectrophotomètre pour la détection du signal hyperspectral. L'alignement du condenseur (à droite) permet l'amélioration du contraste des images.

La lumière source (transmise) n'atteint pas directement l'objectif ; seule la lumière diffusée, et donc déviée par l'échantillon peut être observée. Le champ sombre en résultant a une illumination plus de 150 fois plus brillante qu'avec un microscope à champ noir classique [18]. **En chaque pixel**, la diffraction de la lumière des matériaux est mesurée sur une gamme de longueur d'onde de 400 à 1000nm. Chaque pixel contient ainsi une information spectrale qui est fonction de(s) matériau(x) contenu(s) dans le pixel.

Les acquisition d'images HSI ont été obtenues en utilisant un microscope optique à champ sombre (Olympus BX41) équipé avec une spectrophotomètre pour l'imagerie hyperspectrale (Cytoviva Hyperspectral Imaging System (HSI), Auburn, AL). Le microscope Cytoviva HSI est équipé d'un spectrophotomètre qui est capable d'enregistrer des spectres de très bonne qualité (avec un haut rapport signal/bruit) dans le visible et le proche infra-rouge (de 400 à 1000nm), avec une résolution spectrale de 1,5nm et une résolution de pixel de 25nm. Cependant il est possible de détecter des objets plus petits (jusqu'à 10nm) *via* la détection de la lumière qu'ils diffusent.

Afin d'acquérir une image, aucune préparation d'échantillon particulière n'a été faite. Une goutte d'échantillon (10 μ l) est simplement déposée entre lame et lamelle. Lors de l'observation de racines exposées aux NM, les racines étaient rincées trois fois dans de l'eau ultrapure avant montage entre lame et lamelle. L'acquisition des images était réalisée avec un temps d'acquisition et une intensité lumineuse donnés et optimisé. Il en résulte une image dont chaque pixel contient une information spectrale, un **spectre d'adsorption de la lumière** pour plusieurs valeurs de longueurs d'onde (nommées **bandes**). Un signal hyperspectral est d'ailleurs défini comme un spectre contenant des centaines de bandes.

2.2.1.2 Traitement des données

Le traitement des données consiste en la création de **librairies hyperspectrales**, signatures spécifiques des NM étudiés. Des études ont montrées que cette signature hyperspectrale était fonction de la composition chimique, de l'enrobage, de la taille et de l'agrégation des NM [17]. Cette librairie est ensuite utilisée pour localiser sur une image tous les pixels qui présentent un signal contenu dans la librairie hyperspectrale.

2.2.1.2.1 La construction de la librairie hyperspectrale

L'acquisition de la librairie est faite en plusieurs étapes (imaginées en Figure 12)

L'image contenant l'information spectrale d'intérêt est transformée en **fraction de bruit minimum (MNF pour Minimum Noise Fraction)** : le bruit contenu dans l'image est estimé et séparé du signal en se basant sur la variance du signal entre deux pixels. Cela améliore le traitement spectral des données en obtenant des données débarrassées de leur bruit (images non bruitées dites **cohérentes**). La transformation MNF consiste en deux étapes. Premièrement, le bruit est converti en unité de variances, les **bandes** (les pas de longueurs d'ondes) sont décorrélées (**MNF bandes**) et les données non bruitées sont regroupées en **composantes principales**. Ainsi, les pixels regroupés en composantes principales sont séparés des pixels non-cohérents (vous pouvez voir l'image MNF résultante en Figure 12 B). Les valeurs des **vecteurs propres** de ces composantes principales sont fonction de la qualité de l'information qu'elles contiennent.

Les données sont alors représentées sur un graphique où les bandes MNF sont fonction des **vecteurs propres** de chaque composante principale. Les images avec des vecteurs propres proches de 1 comprennent principalement du bruit, les autres sont les images contenant les informations les plus cohérentes. À chacun des pixels de ces images cohérentes est indexée une valeur de pureté de pixel (**PPI pour Pixel Purity Index**).

Un diagramme de dispersion est alors réalisé en projetant à plusieurs reprises chaque valeur de PPI sur un vecteur à unité aléatoire de **n-Dimensions** (**n** étant le nombre de bandes). Pour chaque projection, les pixels dits extrêmes sont enregistrés, et le nombre de fois qu'un pixel a été marqué comme extrême (et donc **pur**) est comptabilisé.

Le **n-Dimensional Visualiser (NDVI)** est un algorithme qui permet de classer les groupes de pixels purs dans la dimension n-D, puis d'en enregistrer les spectres (Figure 12 C). Aussi, les pixels purs sont en bordure de la comète représentée. Tous ces spectres issus des pixels contenant l'information non bruitée et pure sont sélectionnés, les spectres correspondant extraits et enregistrés dans la **librairie spectrale** (Figure 12 D).

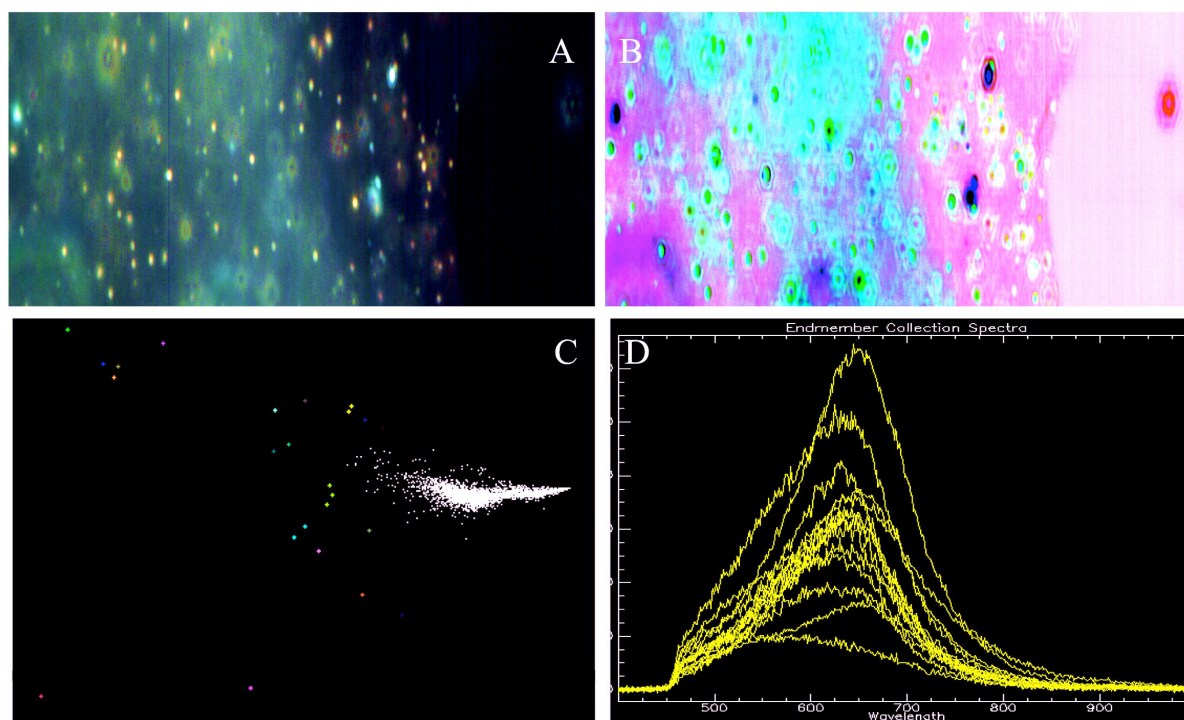


Figure 12 : Chaîne de traitement des données d'une image de nanoparticules d'or (12nm coatées citrate) (A), avec l'obtention des bandes MNF dont les trois première sont illustrées en RGB sur l'image MNF (B), la sélection des endmembers présentant les pixels les plus purs grâce au NDVI (C) et la librairie spectrale associée (D).

2.2.1.2.2 L'identification des pixels d'intérêts

La dernière étape est ensuite d'identifier les pixels d'autres images contenant le signal d'un ou de plusieurs spectres contenus dans la librairie spectrale. La méthode du Spectral Angle Mapper (**SAM**) consiste en la comparaison entre une **image spectrale** (contenant des matériaux inconnus) et une **référence** (librairie hyperspectrale de matériaux connus) en les traitant comme des vecteurs à n-Dimension. Si on représente ces vecteurs sur un axe à 2-Dimensions (Figure 13 B), chaque point représente l'intensité d'adsorption de la lumière dans la bande 1 et dans la bande 2. L'angle entre le vecteur de la référence et de l'image spectrale

est calculé. Des angles très petits indiquent une forte similarité des spectres et un bon fit entre les spectres de références et les pixels de l'image.

Ainsi, chaque pixel présentant un spectre proche de ceux contenus dans la librairie hyperspectrale (l'angle spectral limite est fixé par l'utilisateur) sera labélisé d'une couleur (Figure 13D).

Dans cette étude, l'angle spectral utilisé pour toutes les cartographies de librairies hyperspectrales sur les images d'intérêts était de 0,085rad. Cet angle assez restrictif permet de s'assurer de la spécificité et de la pureté des pixels illuminés.

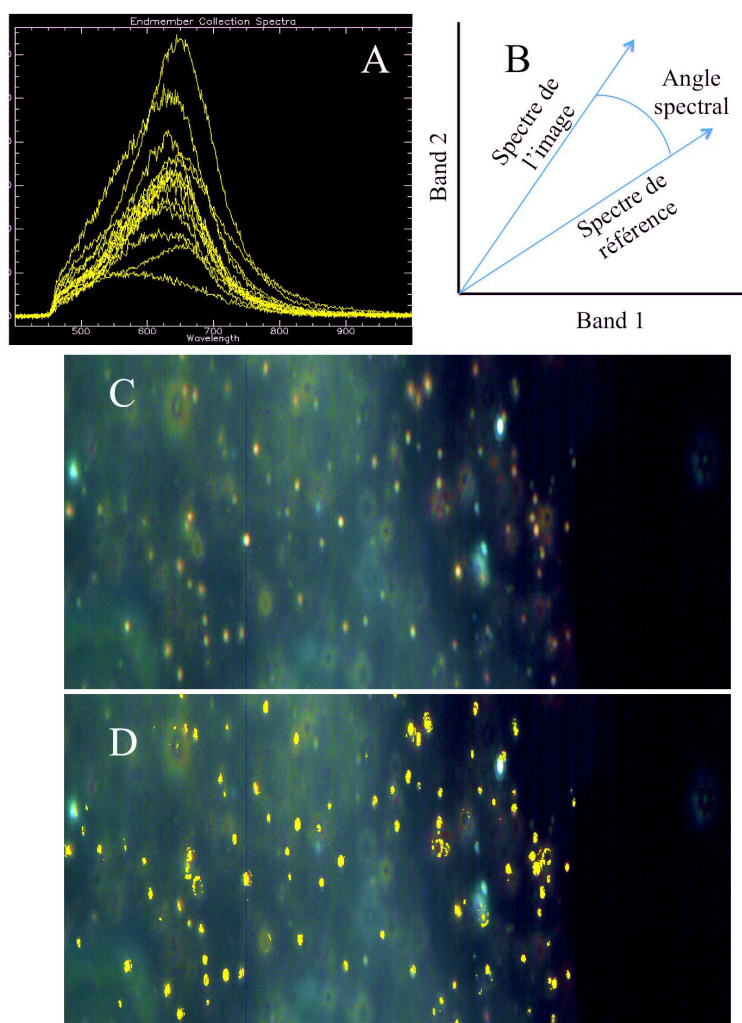


Figure 13 : Etapes pour réaliser le Spectral Angle Mapping. (A) la librairie spectrale des nanomatériaux contenant les spectres de références. (B) Angle spectral autorisé et défini pour comparer en chaque bande les spectres de références aux spectres de chaque pixel de l'image. (C) image de nanoparticules d'or NPAu- dans le Phytigel (1ppm). (D) Pixels illuminés, avec un angle spectral inférieur à 0,085 radians par rapport aux spectres de référence. Ces pixels contiennent le signal des NM.

2.1 Nanotomographie aux rayons X

La nanotomographie aux rayons X permet la visualisation en 3 dimensions (3D) de structures. Cette technique a été utilisée pour localiser les NM dans les tissus de plantes ou de bactéries exposées.

La plateforme d'imagerie 3D installée au CEREGE depuis fin 2012 est composée de deux tomographes aux rayons X qui ont été financés par l'Equipex NANO-ID. Ce projet, porté par le CEA de Grenoble regroupe plusieurs instruments et partenaires au sein d'une plateforme nationale de détection de nanomatériaux dans des milieux complexes lié à la sécurité.

J'ai pu, grâce à cette plateforme, avoir accès à une nanotomographie aux rayons X, qui est l'unique appareil installé en France. A notre connaissance, cette étude en nanotomographie aux rayons X de laboratoire sur des tissus biologiques est une des premières réalisées.

2.1.1 Principe de mesure

La CT est une technique d'imagerie aux rayons X basée sur la reconstruction 3D d'un volume à partir de l'acquisition de projection 2D à différents angles autour de l'axe de rotation d'un échantillon. Le faisceau de rayons X (N0) est focalisé par un capillaire sur l'échantillon. Le faisceau non absorbé par l'échantillon (N1) est focalisé par une zone plate en amont du détecteur. Deux zones plates sont disponibles, permettant un agrandissement 10x ou 40x. Les analyses en nano-CT peuvent donc être réalisées à deux résolutions différentes, avec un agrandissement final de 200x en **large field of view (LFOV)**, field of view de 65 μ m) ou 800x (**high resolution –HR-** field of view de 16 μ m) comportant des tailles de **voxels** (pixel en 3D) de respectivement 63³ et 16³ nm³ et des **résolutions** de 150 et 50nm. Il est possible d'ajouter un anneau de phase en aval de l'échantillon permettant de déphaser l'onde qui le traverse et ainsi d'observer les **contrastes de phases** créés. Cette technique d'observation en contraste de phase permet d'observer des échantillons peu absorbants.

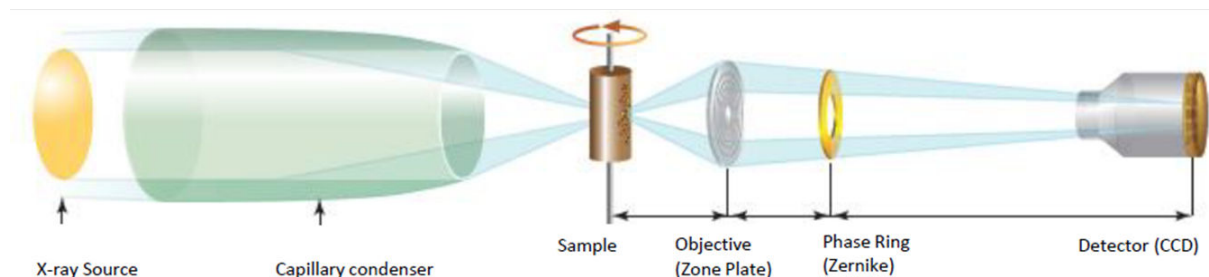


Figure 14 : Schéma du faisceau de rayons X de la nano-CT.

2.1.2 Préparation des échantillons et conditions de mesures

Concernant les analyses en nanotomographie aux rayons X, puisque les scans durent plusieurs heures, il est indispensable que les échantillons soient parfaitement secs avant les analyses. Afin de préserver au mieux les architectures cellulaires, nous avons réalisé une fixation au glutaraldéhyde 2,5% (v/v) dans un tampon phosphate pH 7.2 pendant 12h. Les échantillons ont ensuite été déshydratés puis séchés supercritiquement (Leica, EM CPD 3000).

Ce type de séchage consiste en la substitution de l'eau dans l'échantillon par de l'éthanol (*via* une déshydratation par des bains successifs), de l'échange de l'éthanol par du CO₂ liquide, puis de l'évaporation subite du CO₂ en conditions supercritique. Ce type de séchage permet d'éviter les tensions de surfaces au sein de l'échantillon et la destruction des structures cellulaires. Les conditions expérimentales pour chaque type de cellule sont détaillées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Conditions de déshydratation et de séchage supercritique des échantillons.

Echantillons	Bains de déshydratation	Etapes de séchage supercritique
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	5 min par bain d'éthanol à (% v/v) : 0, 25, 50, 70, 90, 90, 100, 100	14 cycles d'échanges des liquides à vitesse lente, 120s entre chaque cycle, transformation en gaz à température basse et vitesse lente
Racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	20 min par bain d'éthanol à (% v/v) : 0, 25, 50, 70, 90, 90, 100, 100	20 cycles d'échanges des liquides à vitesse moyenne, 120s entre chaque cycle, transformation en gaz à température moyenne et vitesse moyenne

Une fois sèches, les racinées étaient glissés dans un tube en polymides de 1 mm de diamètre, très peu absorbants des rayons X (société Cole-Parmer) puis insérés dans un porte échantillons. Concernant les bactéries, un support MicroGripper (Société MiTeGen) constitué d'une boucle en polymide insérée sur une tige de métal a été utilisé. Le support en polymide était simplement mis en contact avec les poudres de bactéries pour en accrocher à sa surface.

Des billes d'or (environ 900nm de diamètre) ont été déposées sur chaque échantillon à l'aide d'un pinceau et d'un microscope optique présentant des molettes directionnelles pour la micromanipulation (grossissement x50, microscope Xradia) avant chaque scan.

La nanotomographie aux rayons X (nano-CT) utilisée est le modèle UltraXRM-L200, Zeiss (société Xradia). Elle est équipée d'une anode tournante en cuivre (Cu, $\text{K}\alpha_1$, 8048 keV). Les scans ont été effectués avec une tension d'accélération de 40 kV avec 901 projection (de -90° à 90° avec un pas de 0.16°) et une exposition de 60s par image en absorption lors des

acquisitions en LFOV et de 250s en HR, pour des temps de scans totaux de respectivement 17h et 63h.

Une fois l'échantillon traversé, les photons N1 sont convertis en intensité lumineuse grâce à un scintillateur puis en information digitale par un photo-détecteur à transfert de charge (CCD) afin de produire une image 2D digitale en niveaux de gris.

2.1.3 Traitement des données

2.1.3.1 Reconstruction 3D

Le traitement de données consiste en premier lieu à la reconstruction 3D des 901 projections 2D de l'échantillon (Figure 15 A). La première étape consiste en la correction des éventuels déplacements de l'échantillon durant l'analyse. Pour se faire, le suivi d'une (ou de plusieurs billes d'or préalablement déposées sur l'échantillons) a été fait *via* le logiciel Autoalign 2.0.4 qui suit les variations des coordonnées en X et en Y de la bille d'or sur chacune des projections. Ainsi il est possible de corriger le mouvement de chaque projection lorsqu'un déplacement de la bille d'or (autre que la rotation de l'échantillon autour de son axe) est identifié (Figure 15 B).

Une fois ces déplacements corrigés, la reconstruction 3D des projections 2D est réalisée grâce au logiciel Avizo Fire 8 (Figure 15 C). Les images 2D (1024 × 1024 px) reconstruites permettent d'obtenir l'information 3D avec des volumes de 1024×1024×1024 voxels soit un total de 1,07 milliard de voxels. Le volume reconstruit fournit pour chaque voxel l'information d'atténuation des RX traduite par un niveau de gris (0 à 65535 niveau de gris pour une image 16 bits). Ces données sont résumées par **l'histogramme** du volume reconstruit qui fournit pour chaque niveau de gris le nombre de voxels associés.

2.1.3.1 Isolement et mesure des particules d'intérêts

Sur chaque volume 3D, un sous-volume (d'environ $1,4 \times 10^8$ pixel³) a été sélectionné. Ce sous-volume ne contenait pas de particules d'or déposées pour l'alignement et a été utilisé pour en extraire l'histogramme.

Par comparaison avec les échantillons témoin non exposés aux NM, il a été établi un seuil de niveau de gris (i.e. un niveau d'absorption des rayons X) au delà duquel les matériaux absorbants sont des nanoparticules d'or. Ce seuillage a permis d'extraire du volume les voxels contenant des NM et d'en calculer leur volume et leur diamètre équivalent.

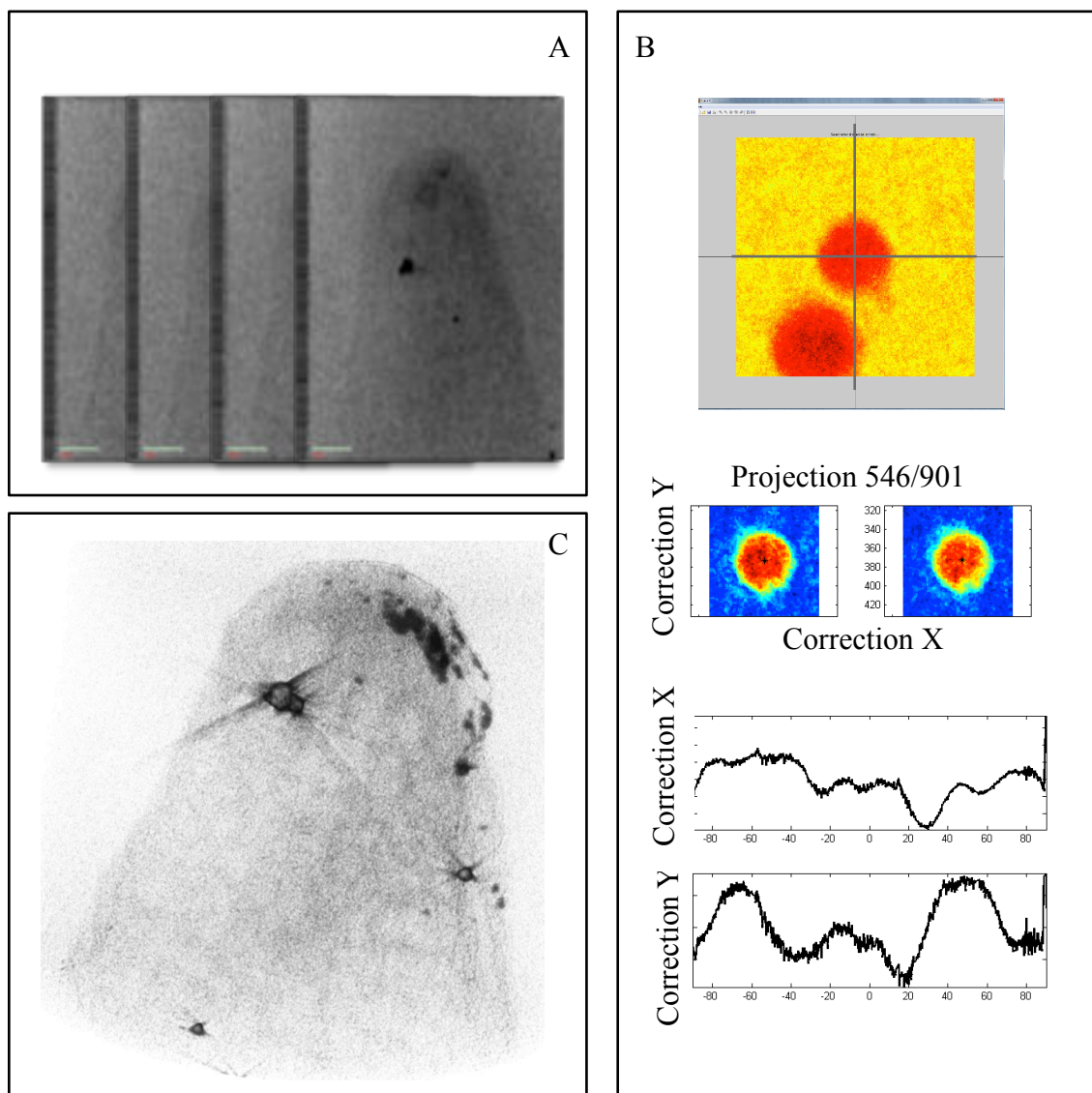


Figure 15 : Etapes d'alignement et de reconstruction 3D des tomographies 2D, exemple d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* exposée à des nanoparticules d'or (12nm enrobées bPci). (A) les 901 projections 2D de l'échantillon sont collectées de -90° à 90° . (B) Les éventuels shifts entre chacune des images sont corrigés grâce au suivi d'une bille d'or préalablement déposée sur l'objet à reconstruire. (C) Reconstruction 3D de la structure.

3 Bilan du chapitre

Dans ce chapitre nous avons réalisé une description détaillée des nanomatériaux et des modèles biologiques utilisés, des conditions expérimentales, ainsi que des outils utilisés. Vous trouverez le bilan de toutes les expériences en Tableau 6 ainsi que les renvois aux pages où sont traitées les thématiques. Il est à noter que dans le cas des études EXAFS au seuil du fer sur les échantillons biologiques exposés aux Ge-imogolite, du temps synchrotron a été alloué à l'ESRF (European Synchrotron Radiation facility) sur la ligne Fame à Grenoble en novembre 2015. Les résultats seront donc acquis après le rendu de ce manuscrit.

Tableau 6 : Récapitulatif des outils utilisés pour l'étude des effets des NM sur des organismes de rhizosphères lors de cette thèse. * temps synchrotron alloué en novembre 2015.

Modèle biologique	Aucun	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>
		Détails en 1.2. Les modèles biologiques et leur exposition aux nanomatériaux p.62		
Nanomatériaux	Ge-imogolites (détails des NM en 1.1.1.6 Bilan des échantillons de Ge-imogolites obtenus p.60)	Or (détails en Tableau 2 p.62)		
Type d'exposition	Pré-caractérisation (eau et milieu de culture)	Contact direct	Contact indirect	
Type d'expérience		Expériences réalisées		
Caractérisation des NM (détails en 2.1 Caractérisation physico-chimique p.67)	ICP-AES	X	X	X
	ICP-MS	X	X	X
	Granulométrie	X	X	X
	Potentiel zéta	X	X	X
	AFM	X		
	DRX	X		
	EXAFS seuil k du Ge et/ou du Fe	X	X	X
		X	X *	
	Croissance		X	
	Test de toxicité		X	
Effets biologiques (détails en 1.3 Le suivi des réponses biologiques p.64)	Live/Dead ratio	X		
	Génération de ROS	X	X	
	Homéostasie du fer	X	X	
	Microscopie à champ sombre couplé au HSI	X	X	X
Etude des interactions (détails en 2.2 Les outils pour le suivi des interactions nanomatériaux/organismes p.80)	Nano-CT aux rayons X		X	X

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. Levard, J. Rose, A. Masion, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, C. Dominici, O. Grauby, J. C. Woicik, et J.-Y. Bottero, « Synthesis of Large Quantities of Single-Walled Aluminogermanate Nanotube », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n° 18, p. 5862–5863, mai 2008.
- [2] P. Maillet, C. Levard, E. Larquet, C. Mariet, O. Spalla, N. Menguy, A. Masion, E. Doelsch, J. Rose, et A. Thill, « Evidence of double-walled Al-Ge imogolite-like nanotubes. a cryo-TEM and SAXS investigation », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 4, p. 1208–1209, févr. 2010.
- [3] C. Levard, J. Rose, A. Thill, A. Masion, E. Doelsch, P. Maillet, O. Spalla, L. Olivi, A. Cognigni, F. Ziarelli, et J.-Y. Bottero, « Formation and Growth Mechanisms of Imogolite-Like Aluminogermanate Nanotubes », *Chemistry of Materials*, vol. 22, n° 8, p. 2466–2473, avr. 2010.
- [4] P. Maillet, C. Levard, O. Spalla, A. Masion, J. Rose, et A. Thill, « Growth kinetic of single and double-walled aluminogermanate imogolite-like nanotubes: an experimental and modeling approach », *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, vol. 13, n° 7, p. 2682–2689, févr. 2011.
- [5] C. Levard, A. Masion, J. Rose, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, P. Chaurand, C. Dominici, F. Ziarelli, A. Thill, P. Maillet, et J. Y. Bottero, « Synthesis of Ge-imogolite: influence of the hydrolysis ratio on the structure of the nanotubes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, n° 32, p. 14516–14522, août 2011.
- [6] A. Thill, P. Maillet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi, et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780–3786, févr. 2012.
- [7] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)3Al2O3Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284–11286, déc. 2013.
- [8] A. Avellan, C. Levard, N. Kumar, J. Rose, L. Olivi, A. Thill, P. Chaurand, D. Borschneck, et A. Masion, « Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials », *RSC Advances*, vol. 4, n° 91, p. 49827–49830, oct. 2014.
- [9] D. I. Arnon, D. R. Hoagland, et others, « Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. », *Soil Science*, vol. 50, p. 463–485, 1940.
- [10] W. Achouak, L. Sutra, T. Heulin, J. M. Meyer, N. Fromin, S. Degraeve, R. Christen, et L. Gardan, « *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 9–18, janv. 2000.
- [11] D. Allaway, N. A. Schofield, M. E. Leonard, L. Gilardoni, T. M. Finan, et P. S. Poole,

- « Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes », *Environmental Microbiology*, vol. 3, n° 6, p. 397–406, juin 2001.
- [12] M. Utratna et C. P. O’Byrne, « Using enhanced green fluorescent protein (EGFP) promoter fusions to study gene regulation at single cell and population levels », *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1157, p. 233–247, 2014.
- [13] W. Achouak, S. Conrod, V. Cohen, et T. Heulin, « Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy », *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 17, n° 8, p. 872–879, août 2004.
- [14] A. J. Moyano, R. A. Tobares, Y. S. Rizzi, A. R. Krapp, J. A. Mondotte, J. L. Bocco, M.-C. Saleh, N. Carrillo, et A. M. Smania, « A Long-Chain Flavodoxin Protects *Pseudomonas aeruginosa* from Oxidative Stress and Host Bacterial Clearance », *PLoS Genet*, vol. 10, n° 2, p. e1004163, févr. 2014.
- [15] A. Simon-deckers, « Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques », PhD Thesis, 2008.
- [16] B. Ravel et M. Newville, « *ATHENA*, *ARTEMIS*, *HEPHAESTUS*: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using *IFEFFIT* », *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 12, n° 4, p. 537–541, juill. 2005.
- [17] A. R. Badireddy, M. R. Wiesner, et J. Liu, « Detection, Characterization, and Abundance of Engineered Nanoparticles in Complex Waters by Hyperspectral Imagery with Enhanced Darkfield Microscopy », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 18, p. 10081–10088, sept. 2012.
- [18] J. Beach, « A richer view of bio structures », in *BioOptics World*, PennWell, 2009.

Chapitre III. Synthèses accélérées de Ge-imogolites

SOMMAIRE

Chapitre III. Synthèses accélérées de Ge-imogolites	97
1 Introduction.....	97
1.1 Rappels bibliographiques	97
1.2 Objectifs du chapitre	98
2 La synthèse en fluide supercritique.....	99
2.1 Le principe.....	99
2.2 La synthèse d'imogolites en fluide supercritique.....	100
2.3 Résultats	100
2.4 Conclusions	102
3 Croissance des Ge-imogolites sous irradiation MW.....	103
3.1 Le principe.....	103
3.2 Résumé étendu de l'article	104
3.3 Accelerated Microwave Synthesis of Alumino-Germanates Imogolites Nanotubes.....	106
3.3.1 Abstract	106
3.3.2 Introduction	107
3.3.3 Experimental	108
3.3.4 Results and discussion.....	108
3.3.5 Outlook.....	113
3.3.6 Supporting information	114
4 Conclusions du chapitre.....	115
Références bibliographiques	116

Chapitre III. Synthèses accélérées de Ge-imogolites

1 Introduction

1.1 Rappels bibliographiques

Comme détaillé dans le Chapitre I. Introduction page 1, la synthèse des Ge-imogolites est reproductible, et varier les concentrations initiales en réactifs permet d'obtenir des nanotubes à structures et à morphologies différentes. Un schéma résumant les conditions de synthèses de Ge-imogolites à structures contrôlées décrites dans la littérature est proposé en Figure 1.

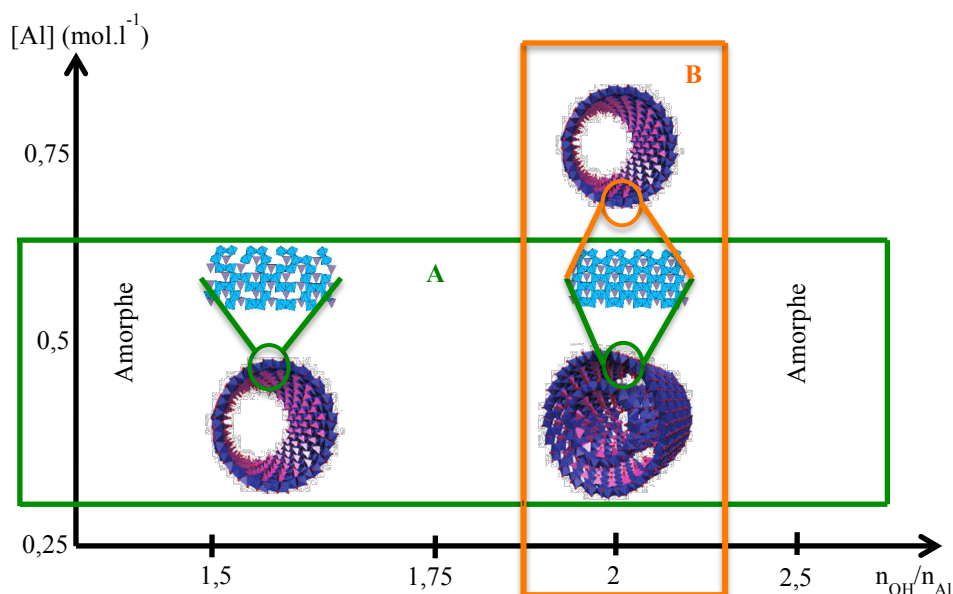


Figure 1 : Obtention de Ge-imogolites à différentes structures en fonction des conditions de synthèses avec des ratios n_{Al}/n_{Ge} de 2. L'encadré vert (A) correspond aux résultats de l'étude de Levard et coll. [5] qui consistait en la synthèse de Ge-imogolites en utilisant $C_{Al}=0,5$ mol.l⁻¹ et $R = [0,5 ; 1 ; 1,5 ; 1,75 ; 2 ; 2,5 ; 2,75 ; 3]$. L'encadré orange (B) correspond aux résultats obtenus dans les études qui ont fixé un $R=2$ et ont fait varier C_{Al} dans Maillet et coll. [6] avec $C_{Al}=[0,25 ; 0,5]$ mol.l⁻¹ ainsi que dans Thill et coll. [7] qui font varier $C_{Al} = [0,5$ ou $0,75]$ mol.l⁻¹.

Les mécanismes de formation des Ge-imogolites ont été étudiés au cours de la thèse de Clément Levard [9] et de Perrine Maillet [10]. Les étapes de synthèse des Ge-imogolites ont été décrites comme suit :

- la formation des proto-imogolites qui resteront isolés (précurseurs des SW) ou s'arrangeront par paires (précurseurs des DW) en fonction de l'élasticité des tuiles et de leur attraction/répulsion électrostatique [7]
- une phase de croissance à température modérée pendant plusieurs jours durant laquelle les proto-imogolites se ferment. Les mécanismes de fermeture des proto-

imogolites en anneaux ne sont pas encore clairement établis. L'élongation des tubes est ensuite due à la collision de tubes courts entre eux (collage bout-à-bout) [6], [7]. Cette dernière étape de croissance des nanotubes nécessite plusieurs jours (au moins 4) de chauffe. Le temps et l'énergie que représente cette étape reste ainsi un facteur limitant dans l'utilisation des Ge-imogolites.

1.2 Objectifs du chapitre

Le but global du travail décrit dans ce chapitre est de réduire le temps de la phase de croissance nécessaire pour la fermeture des proto-imogolites et l'élongation des nanotubes. Les protocoles actuels nécessitent en effet une étape de chauffe de 5 jours, limitant l'utilisation industrielle des Ge-imogolites. Basés sur les mécanismes connus de croissance des nanotubes décrivant des collisions bout-à-bout de tubes courts, nous avons cherché à augmenter la probabilité de rencontre des tubes entre eux, et donc la probabilité de chocs efficaces. Pour ce faire nous avons fourni l'énergie nécessaire à cette étape autrement que *via* la chauffe traditionnelle en étuve (CH pour Conventional Heating en Anglais) en réalisant l'étape de croissance (i) en fluide supercritique ou (ii) sous irradiation micro-onde (MW pour l'acronyme MicroWave en Anglais).

Une étude multi-échelle des composés obtenus a été réalisée en étudiant la forme (en microscope à force atomique –AFM–), les ratios molaires (en étudiant la chimie grâce à la spectrométries à torche à plasma couplée à un détecteur optique –ICP-AES–) et l'organisation cristalline (avec la diffraction des rayons X –DRX–) des matériaux obtenus. Chacune des méthodes sont décrites plus en détails dans le Chapitre II. Matériels et Méthodes, page 53. Ces outils ont permis de caractériser finement la structure et la morphologie des nanotubes obtenus.

2 La synthèse en fluide supercritique

2.1 Le principe

Le diagramme de phase (pression, température, volume molaire) d'un corps pur permet d'identifier les limites de ses domaines d'états solide, liquide et gaz. Chaque état induit des propriétés physico-chimiques des fluides différentes. Ces trois états de la matière sont en équilibre au point triple. Le **point critique** est le point à partir duquel, pour des températures ou des pressions supérieures, la transition entre le domaine liquide et gaz devient continue (Figure 2). Le fluide possède alors des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Les coordonnées (T_c ; P_c) du point critique varient en fonction des fluides. Si pour l'eau elles sont élevées (647 ; 218) celles de l'éthanol (514 ; 62,3) ou du dioxyde de carbone (305 ; 73), le sont beaucoup moins.

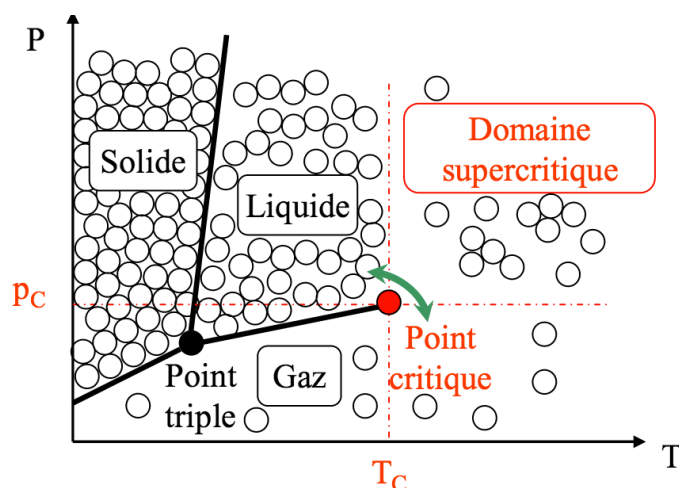


Figure 2 : Schéma du diagramme de phase d'un corps pur en fonction des conditions de pressions et de températures dans lequel il se trouve.

Ainsi, au voisinage du point supercritique, le **fluide supercritique** devient plus compressible que le liquide et plus dense que le gaz. Ces propriétés spécifiques ont des conséquences sur le comportement des fluides supercritiques en terme de masse volumique, de viscosité et de diffusivité. En particulier, la viscosité d'un fluide supercritique est comprise en 10^{-5} et 10^{-4} Pa.s. C'est supérieur à celle des gaz et 10 à 100 fois inférieure à celle des liquides. De plus, le coefficient de diffusion d'un soluté est plus important dans un fluide supercritique que dans un liquide [13].

De ce fait, la synthèse de nanomatériaux inorganiques en utilisant des fluides supercritiques a été réalisée dans plusieurs études, notamment dans le but d'utiliser des solvants dits « verts » (eau, CO₂, ammoniac, méthanol, éthanol...) pour l'élaboration de matériaux aux propriétés spécifiques. [13]–[15] Nous avons voulu ici exploiter les propriétés des fluides supercritiques pour réduire le temps nécessaire à la croissance des Ge-imogolites.

2.2 La synthèse d'imogolites en fluide supercritique.

Dans le cas de la synthèse de Ge-imogolites, nous avons réalisé la phase de croissance des imogolites en fluide supercritique dans le but de diminuer la viscosité du fluide et le coefficient de diffusion des particules. Nous avons émis l'hypothèse que ceci permettrait (i) une accélération de la cinétique de fermeture des proto-imogolite et de croissance des nanotubes (ii) l'augmentation de la probabilité de rencontre de deux tubes courts, et donc une plus grande probabilité de chocs efficaces et une plus grande élongation des tubes.

Nous avons ainsi testé différentes conditions de croissance. Après avoir classiquement synthétisé des proto-imogolites dans l'eau ($C_{Al} = 0,2M$; $n_{OH}/n_{Al} = 2$ et $n_{Al}/n_{Ge}=1,75$), nous avons dilué cette solution (10% v/v) dans de l'éthanol ultra pur ou dans de l'eau. Nous avons ensuite placé la solution de proto-imogolite dans l'eau à l'étuve (95°C) pour 5 jours. Ceux dilués dans l'éthanol ont été placés dans un réacteur dans lequel l'éthanol était remplacé par du CO₂ liquide à 2°C. Le système était ensuite placé dans les conditions de températures et de pressions proches du point critique du CO₂, à savoir 60°C 100 bar, pendant 4h ou 8h. Après cette phase de croissance, les solutions ont été centrifugées pendant 45 min à 8000g puis resuspendues dans de l'eau ultra pure pour leur caractérisation.

2.3 Résultats

Nous avons donc trois échantillons, les proto-imogolites dans l'eau chauffés à l'étuve, ou les échantillons dans l'éthanol placés en conditions supercritiques 60°C, 100 bar pendant 4h ou 8h. Les échantillons ont été lyophilisés puis analysés en Diffraction des Rayons X (Figure 3). Le diffractogramme de l'échantillon témoin est caractéristique des Ge-imogolites à doubles parois (3 pics entre 8 et 15 thêtas). Les diffractogrammes obtenus à partir des poudres issues des phases de croissance en conditions supercritiques se rapprochent de celui que l'on obtient avec une solution de proto imogolites. Cependant, ni l'intensité ni la distance des pics caractéristiques des imogolites n'ont été identifiés.

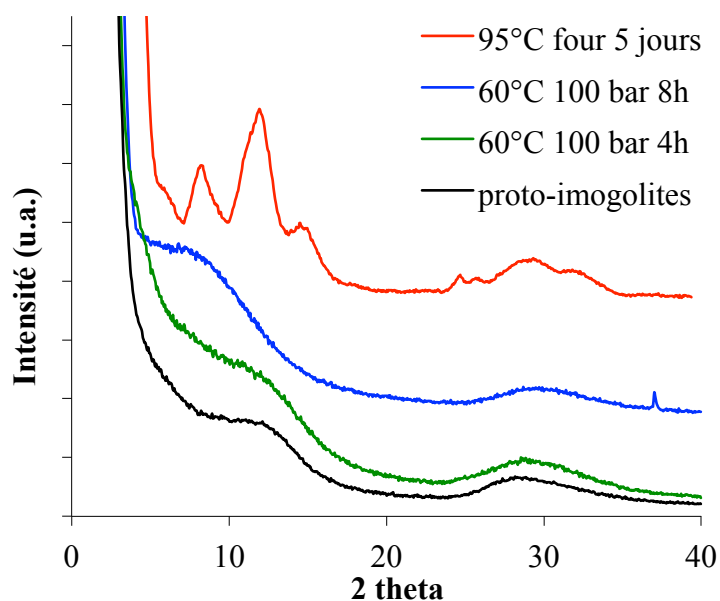


Figure 3 : Diffractogramme des échantillons de proto-imogolites après étape de chauffage dans l'eau à l'étuve ou dans le CO₂ en conditions supercritiques.

Au vu de ces diffractogrammes, nous avons conclu que ces solutions étaient principalement constituées de proto-imogolites. S'il y a présence de tube, elle doit être très inférieure à la quantité de proto-imogolite. Aussi, pour savoir si des tubes s'étaient formés en conditions supercritiques, nous avons observé les échantillons en AFM.

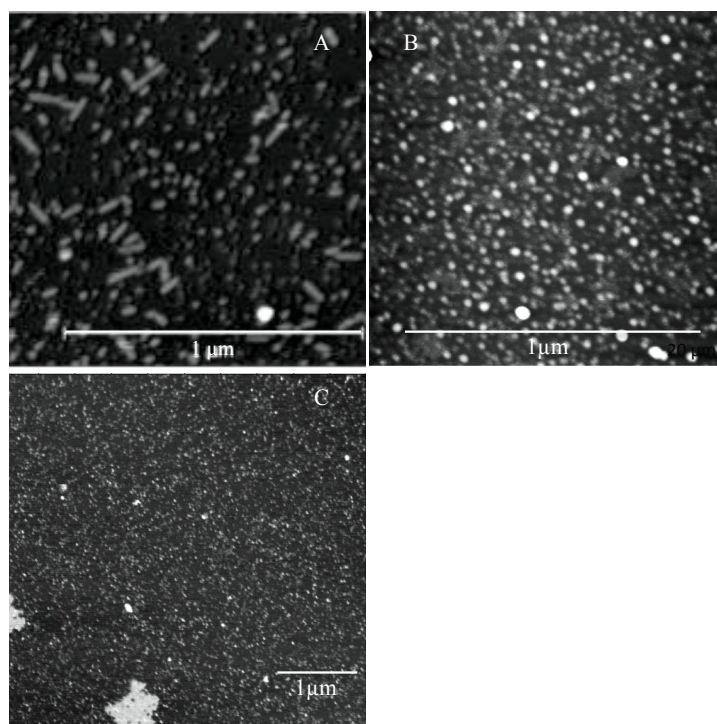


Figure 4 : Images obtenues en microscopie à force atomique des échantillons de proto-imogolites (A) dans l'eau avec une phase de croissance à l'étuve et dans l'éthanol avec une phase de croissance à 60°C, 100 bar pendant (B) 4h ou (C) 8h. 7 μ l de solution diluée à 1 mg.L⁻¹ a été déposé sur une plaque de mica clivée puis séchée à l'étuve à 40°C. Barre d'échelle : 1 μ m.

La solution témoin dont l'étape de croissance a été faite en étuve comprend bien des nanotubes de quelques dizaines de nanomètres de long. A l'inverse, aucun tube n'a pu être identifié dans les solutions chauffées en conditions supercritiques, quelque soient les conditions.

Ces expériences ont été dupliquées et des résultats similaires ont été obtenus.

2.4 Conclusions

Les études préliminaires pour l'augmentation de la cinétique de croissance des Ge-imogolites en fluide supercritique n'ont pas été concluantes. En effet, les solutions résultantes n'étaient composées que de proto-imogolites et aucun nanotube n'a été identifié dans les échantillons. Cela peut être dû à *(i)* l'augmentation des forces ioniques dans les échantillons du fait de leur dilution dans l'éthanol, modifiant les interactions entre proto-imogolites et empêchant leur fermeture ou *(ii)* à un temps de croissance trop court pour que la fermeture et l'assemblage des proto-imogolite en tubes n'ai pu intervenir.

Les conditions de pressions et de températures relativement élevées pour que le CO₂ soit dans un état proche de son point critique étant énergivores, (i.e. *a minima* 60°C, 100 bar) nous n'avons pas envisagé de réaliser des essais de temps de croissances plus long. De la même façon, réaliser la phase de croissance dans un autre solvant nécessiterait des conditions de températures et de pressions encore plus extrêmes.

Aussi, au vu de ces résultats nous n'avons pas investigué la synthèse d'imogolites en fluides supercritiques plus avant.

3 Croissance des Ge-imogolites sous irradiation MW

3.1 Le principe

Les micro-ondes (MW pour l'acronyme anglais MicroWave) sont des ondes électromagnétiques. Cela signifie qu'elles sont la résultante d'ondes électriques et magnétiques, de mêmes fréquences, mais sur des plans perpendiculaires différents (illustration en Figure 5). Les MW ont des longueurs d'ondes intermédiaires entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion, de l'ordre du GHz.

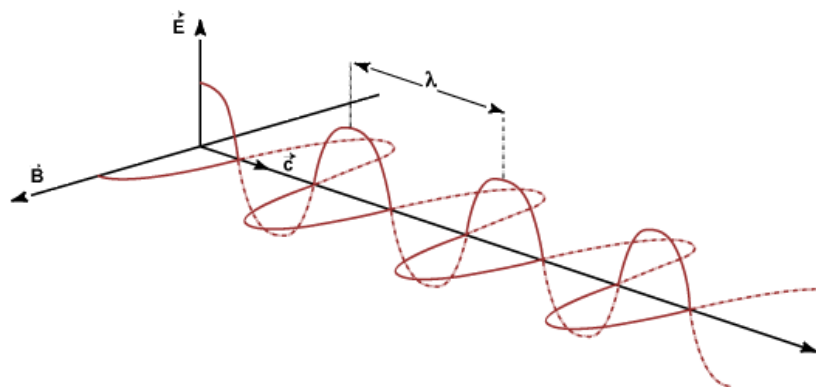


Figure 5 : Structure d'une onde électromagnétique. E : champ électrique. B : champ magnétique. C : célérité (m.s^{-1}). λ : longueur d'onde.

L'effet thermique des MW sur la matière est fondé sur l'absorption de l'énergie par un diélectrique. Il s'exerce instantanément dans toute la masse de la matière (contrairement à une diffusion progressive en chauffe conventionnelle). Seules les molécules polaires, typiquement celles de l'eau, mais également celles de composés chimiques renferment un groupe polaire, sont concernées. Chaque alternance de sens du champ électrique des MW entraîne un changement d'orientation des dipôles, et les collisions entre ces molécules entraîne une augmentation thermique. Cet effet dipolaire s'accompagne d'un effet thermique de conduction lié aux déplacements des charges électriques (venant des ions en solution par exemple).

Les propriétés des micro-ondes ont été exploitées pour la synthèse de nombreux nanomatériaux organiques et inorganiques. Plus rapide, l'irradiation MW a permis dans plusieurs études de synthétiser des NM en diminuant les temps de réactions, en améliorant les rendements, et en resserrant les distributions de taille. [16]–[19] Même si les mécanismes de croissance des nanomatériaux sous irradiation MW ne sont pas entièrement identifiés, il a été

argumenté par plusieurs auteurs que ces effets ne pouvaient être dus uniquement à des phénomènes thermiques. Aussi il apparaît que l'irradiation MW induirait des effets qui semblent spécifiques aux micro-ondes. A ce jour, cet « effet micro-onde » fait débat et reste à démontrer.

3.2 Résumé étendu de l'article

Le temps de croissance des Ge-imogolites est de 4 jours à 90°C *a minima* dans les protocoles de la littérature. Cette étape est donc couteuse en temps et en énergie. Dans cette étude, nous avons voulu réduire le temps alloué à la croissance des imogolites en apportant l'énergie nécessaire à cette étape *via* l'irradiation MW plutôt que le chauffage classique en étuve (CH pour l'acronyme anglais Conventional Heating).

Pour ce faire une solution de proto-imogolites a été synthétisée en utilisant le protocole classiquement décrit dans la littérature. La phase de croissance a ensuite été réalisée sous irradiation MW à 100°C, 150°C ou 200°C pendant 1h ou 2h. Les échantillons résultant ont ensuite été caractérisés en DRX pour la caractérisation de leur structure cristalline et en AFM pour déterminer la distribution de taille des nanotubes formés (longueur et diamètre). Les produits de synthèse obtenus sous irradiation MW ont été comparés à ceux obtenus par CH à 95°C, 150°C ou 200°C pendant 1h, 2h et 7 jours.

En CH, nous avons observé que lorsque la température est augmentée de 95°C à 200 °C, les solutions sont enrichies en tubes courts (de l'ordre de la dizaine de nanomètres) au détriment des proto-imogolites. Augmenter le temps de 1h à 2h pour des températures supérieures à 95°C induit la coprécipitation de phases amorphes.

L'irradiation MW permet d'obtenir des tubes micrométriques dès 100°C en seulement 1h. Augmenter la température et/ou le temps permet d'enrichir les solutions en tubes longs, et des solutions composées uniquement de Ge-imogolites micrométriques sont obtenues après 2h à 200°C. Contrairement aux protocole déjà existant pour la synthèse de Ge-imogolites micrométriques, cette synthèse permet d'obtenir des longueur peu polydispersées. La Figure 6 illustre la différence de longueurs des tubes obtenus en 7 jours à 95°C en CH ou en 2h à 200°C sous irradiation MW.

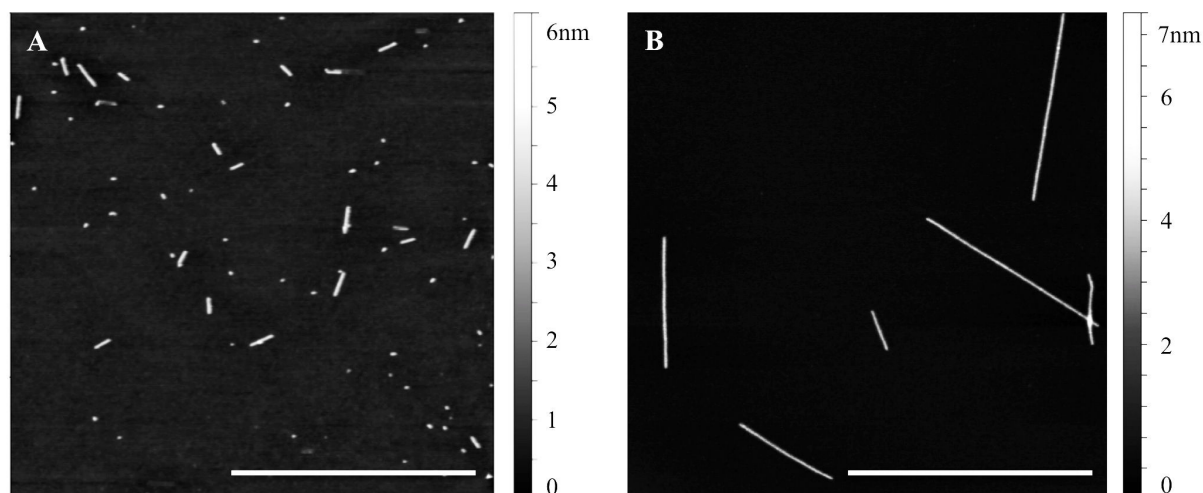


Figure 6 : Etude de l'effet de l'irradiation micro onde sur la croissance des Ge-imogolites. Si le chauffage traditionnel en étuve pendant 7 jours donne des nanotubes courts (A), l'irradiation MW permet d'obtenir des nanotubes micrométriques en 2h à 200°C (B). Echelle = 1 μ m.

Nous avons émis l'hypothèse que la diminution du temps nécessaire au réarrangement des proto-imogolites en anneaux puis en tubes est dû à l'augmentation de l'agitation thermique au sein de la solution. En effet, les imogolites sont des matériaux dipolaires puisque leurs charges positives sont, pour la majorité, situées en bordure de tubes, et les charges négatives à l'intérieur. Aussi ces dipôles, en essayant de s'aligner sous le champ électromagnétique alternatif des MW, augmentent certainement l'agitation thermique de la solution, et donc la cinétique de croissance des Ge-imogolite.

De plus, de récentes études réalisées par Onofri et ses collaborateurs, basés sur la spectroscopie d'extinction de lumière polarisée [33], [34], ont clairement démontré l'alignement des imogolites sous champ électrique. Ainsi, cet alignement, augmenterait la probabilité de collisions efficaces entre les tubes courts en solution, induisant une plus grande élongation. Enfin, nous avons observé que des proto-imogolites persistent en solution jusqu'à 2h à 150°C en MW et jusqu'à 200°C 2h en CH. Ceci amène à penser que la croissance due à la collision de tubes bout-à-bouts n'est pas le seul mécanisme de croissance des Ge-imogolites, et que l'élongation des tubes pourrait également subvenir *via* l'attraction et la liaison des proto-imogolites sur les bords des tubes déjà formés.

3.3 Accelerated Microwave Synthesis of Alumino-Germanates Imogolites Nanotubes.

Accelerated microwave assisted synthesis of alumino-germanates imogolites nanotubes

*A. Avellan**^{1, 2,3}, *C. Levard*^{1, 2,3}, *C. Chaneac*⁴, *D. Borschneck*^{1, 2,3}, *F.R.A. Onofri*⁵, *J. Rose*^{1, 2,3}, *A. Masion**^{1,2,3}.

¹ CEREGE, CNRS, Aix-Marseille Université, IRD, UM34, 13545 Aix-en-Provence, France.

² iCeint – International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

³ LabEx SERENADE, Europôle de l'Arbois; 3545 Aix-en-Provence, France.

⁴ Chimie de la Matière Condensée de Paris - UMR7574 (UPMC/CNRS); Collège de France; 11, place Marcelin Berthelot; 75231 Paris; France

⁵ IUSTI, Aix-Marseille Université, CNRS, UMR 7343, 13453, Marseille, France

in prep pour publication dans Langmuir.

3.3.1 Abstract

Ge-Imogolite nanotubes ($\text{Al}_2\text{GeO}_7\text{H}_4$) show great promise for many applications since they can be readily obtained in various lengths, chemical compositions and crystallinities. Their synthesis includes the nucleation of roof-tile shaped precursors at room temperature followed by heat promoted growth (typically 95°C) for at least 4 days, duration which may impede their industrial use. To circumvent long synthesis durations, we used microwave assisted heating to accelerate the growth. Micron sized tubes were formed from 1hr at 100°C, and best results were obtained for 2 hours at 200°C, i.e. a gain of approx. 100 over the required duration with conventional heating. Additionally, tube lengths were shifted towards larger values by one order of magnitude, leading to micron sized Imogolites vs. 150 nm with conventional heating. Possible mechanisms leading to these longer tubes are discussed.

3.3.2 Introduction

Tubular nanomaterials are increasingly popular in a number of applications e.g. to improve mechanical strength, pack high surface areas in a limited volume. If carbon nanotubes remain the most publicized materials in this category, much of the focus now shifts towards inorganic nanotubes/nanofibers. Among these, imogolites ($\text{Al}_2\text{SiO}_7\text{H}_4$) are nanotubes occurring naturally in volcanic soils, which can be synthesized with a simple aqueous sol gel process. [20], [21] However these protocols have in common very poor yields (millimolar concentrations) and slow kinetics (several days of growth). Yield is no longer an issue, since large quantities of Ge analogues, isostructural to imogolite ($\text{Al}_2\text{GeO}_7\text{H}_4$, hereafter called Ge-imogolites) are readily obtained with initial reagent concentration in the molar range. [4] The diameter (3-4.5 nm) is a function of wall multiplicity, which is easily controlled with the initial concentrations. [7] These hydrophilic tubes can also be functionalized on both the internal- and external tube surfaces. [22], [23]

Like silicon based imogolite, the synthesis of Ge-imogolites is an aqueous phase process where the room-temperature base hydrolysis of a mixture of Al and Ge monomers results in the nucleation of roof-tile shaped proto-imogolite (ca. 5nm). [12] Although not entirely elucidated, the mechanisms of tube growth are thought to include the formation of annular structure from proto-imogolite upon heating, followed by tube growth via tip-to-tip collisions. [11] Under these conditions, average tube length is a few tens of nanometers, with a maximum length typically not exceeding 150 nm. during a growth step at moderate temperature for several days. Some micro-sized Ge-imogolites were obtained using urea instead of NaOH during hydrolysis. [8] However the growth still requires a week, and it is unclear to which extent the formation of long tubes is a quantitative process.

Predominantly short tubes (< 200 nm) and long growth duration are detrimental characteristics of all the imogolite syntheses available in the literature. To overcome these limitations, at least partly, we investigated the improvements that microwave (MW) heating could offer in comparison to conventional heating in an oven. MW is widely used for the synthesis of organic materials and, to a lesser extent, for the synthesis of minerals. Using conventional heating (CH), thermal energy is delivered to the material surface by radiant and/or convection heating and is transferred to the bulk solution via conduction. During MW processing, polar water molecules tend to align with the changing alternating electric field, and energy is transferred by rotation, friction and collision. As a result, heat can be generated homogenously throughout the volume. [24] In the literature, MW syntheses had increased reaction rates, improved yield and narrowed particle size distribution. [19], [25]–[27] These

improvements cannot be explained solely by a rapid heating effect, and therefore various authors postulate the existence of a "specific microwave effect". [28]

In the present study, we report the effects of MW heating on the formation of Ge-imogolite as a function of reaction time and temperature.

3.3.3 Experimental

Ge-imogolite precursors (proto-imogolite) were obtained by adding a germanium ethoxide solution to aluminum chloride (0.05 mol.L^{-1} , $n_{\text{Al}} / n_{\text{Ge}} = 1.75$). The solution was slowly hydrolyzed with a 0.05 mol.L^{-1} NaOH solution (1ml/min) to a hydrolysis ratio ($R=n_{\text{OH}}/n_{\text{Al}}$) of 2. Proto-imogolites were refrigerated at 4°C before further use. Tube growth was performed either under Conventional Heating (CH) in an oven with pressure resistant containers or under microwave (MW) irradiation (Anton Paar Synthos 3000 microwave, 2.45 GHz) under stirring. For both heating regimes, 3 temperatures (100 , 150 and 200°C) and 2 durations (1h and 2 h) were tested; CH systems were also heated for 7 days, the CH system at 100°C during 7 days being a reference. The final suspensions were dialyzed with a 1kDa pore size membrane against ultra pure water until the conductivity reached $2 \mu\text{S.cm}^{-1}$. AFM images (Bruker INOVA) were obtained in tapping mode. Diluted samples (1mg.L^{-1}) were deposited on a mica sheet and dried several hours at 60°C prior analysis.

AFM image extraction and height profile thresholds were performed on Gwyddion 2.4 software. [29] Particle counting, length and height distributions were extracted using Fiji 2.0 plugin [30] and image J 1.46 software. [31] As opposed to height resolution (0.2 nm), lateral resolution is poor and limited to 25 nm by the dimensions of the AFM tip; therefore proto-imogolites were determined on the basis of their height (ca. 1nm , vs. 3.5 for the tubes) and not their length which is not distinguishable from the shortest tubes. To this end, a threshold of 2.5 nm was applied using the Gwyddion software (cf. details in S.I.)

X-ray diffraction patterns were obtained on freeze-dried dialyzed samples using an X'Pert Pro diffractometer (PANalytical) equipped with a rotating glass capillary ($\varnothing 300\mu\text{m}$) and a mirror as a primary optics to produce a parallel beam. Cobalt $K\alpha$ radiation ($1.79\text{\AA}$) was used at 40kV and 40mA . Scans were performed in the scattering angle range $2\theta = 2-55^{\circ}$ with a step of $Dq = 0.05^{\circ}$ and 15s per step.

3.3.4 Results and discussion

The reference sample, i.e. 7 days CH at 100°C , corresponds to the most common protocol described in the literature. The diffractogram of the recovered tubes of this reference sample (Figure 7(a)) corresponds to the pattern previously observed with Ge-imogolites.[23] As

expected, average tube length as determined by AFM is below 80 nm (Figure 8) and the maximum does not exceed 150 nm (Figure 9).

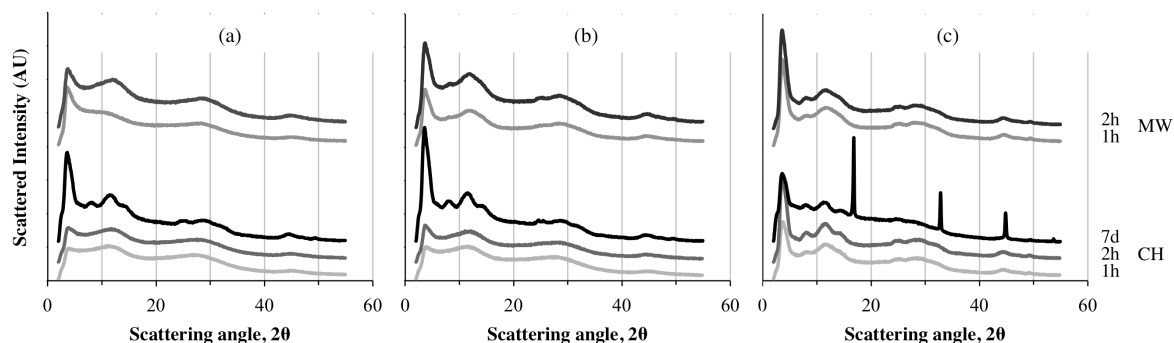


Figure 7: X-ray diffraction patterns of samples synthesized under (a) 100, (b) 150 or (c) 200°C under conventional heating (CH) or microwave (MW) heating conditions for 1h, 2h or 7 days.

Increasing the temperature to 150°C and 200°C resulted in poorer results. While the diffraction pattern still display the signature of Ge-imogolite (Figure 7), only very few tubes were detected by AFM (Figure 8). Instead, the AFM images are dominated by globular structures, presumably aggregates of precursors and/or ill-ordered aluminum (oxy)hydroxides at 150°C, and an additional boehmite contribution (AlOOH ; *ICDD* PDF #74-1895) (Fig.1) at 200°C, possibly resulting from the maturation of the species formed at 150°C.

Figure 10 shows the proportions of proto-imogolite (distinguished from short tubes by their height around 1 nm as explained above), short tubes (i.e. < 25 nm) and "long" tubes (> 25 nm) as determined from AFM data. Under CH conditions, no tubes are present at 100°C after 1 and 2 hours heating. Above 100°C, the proportion of tubes formed under CH conditions increases with the reaction temperature and reaction time to reach 90% at 200°C after 2 hours, short tubes (<25 nm) being the predominant structure. The XRD patterns are consistent with Ge-imogolite formation (Figure 7) To the best of our knowledge; this is the first report unequivocally documenting the early formation of imogolite (i.e. within one or two hours) under hydrothermal conditions. However, it appears that the formed Ge-imogolite cannot withstand prolonged maturation under these conditions since they become undetectable on the AFM images after 7 days (Figure 8).

Synthesis results obtained with MW contrast sharply their CH counterpart. The most striking result is that micron-sized tubes are detected from the lowest temperature and shortest time (100°C, 1 h) (Figure 8). At this stage, there is still a majority of proto-imogolite present in the sample. Increasing the temperature and duration causes this proportion to gradually decrease, mainly to the benefit of long (> 25 nm) tubes, which are the only detected structures after 2 h

at 200°C (Figure 10). Using MW, the reaction rate is accelerated by a factor close to 100 compared to CH protocols. This is accompanied by a shift in the tube length by approx. one order of magnitude. To the best of our knowledge, there is no previous evidence of the synthesis of micron-sized imogolite in such a short time frame.

Micron-sized Ge imogolite was also obtained previously using urea as hydrolysis agent with considerably slower kinetics than the present study, i.e. 5 days of heating. [8] The maximum lengths measured under these conditions were between 1 and 2 μm , which is also the case with our MW based protocol. This length might correspond to an "equilibrium" value since two different growth procedure lead to the same maximum value. The systems hydrolyzed with urea are described as very polydispersed in length. [8] In the present case, the particle size distribution (PSD) can be termed as bimodal with maxima around 300 and 800 nm (Figure 10), and may be an improvement in terms of length selectivity compared to the urea based protocol. However, a PSD of the solids formed following this procedure is required to confirm this hypothesis.

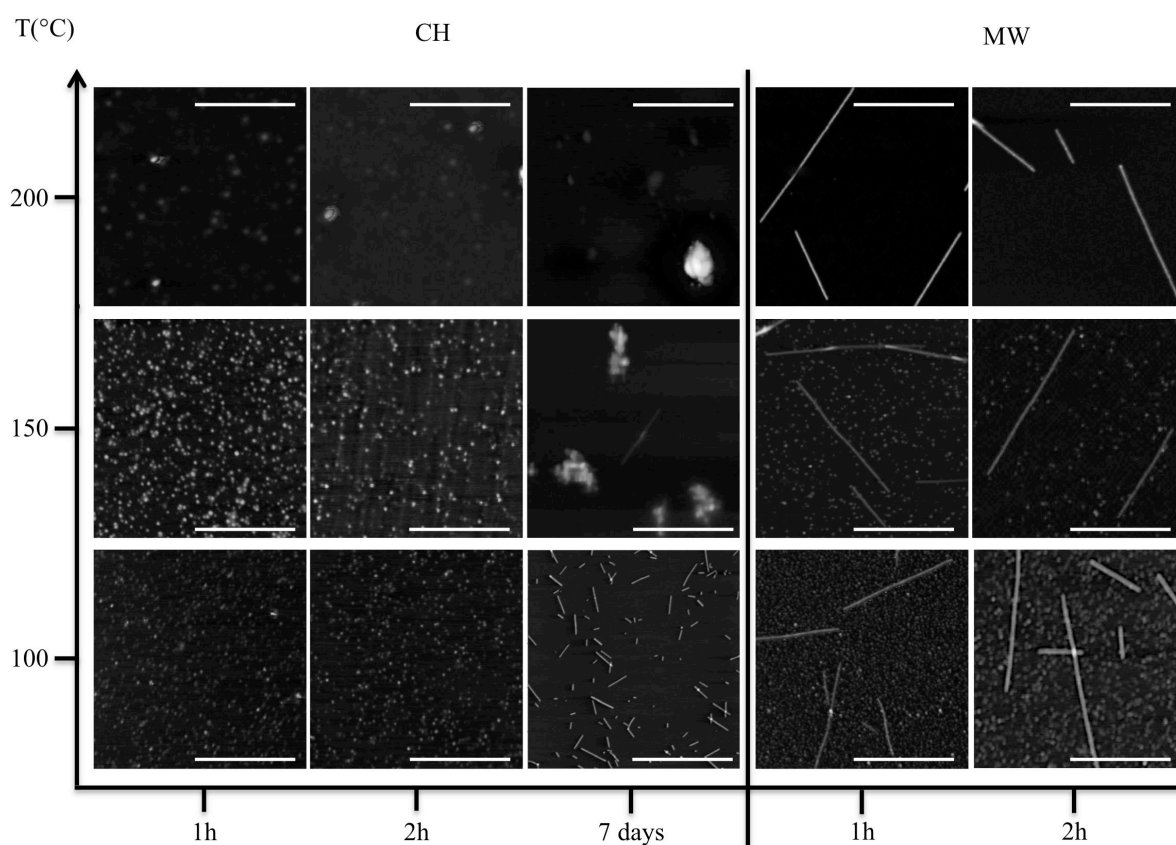


Figure 8: AFM images under tapping mode for samples synthesized under (a) conventional heating (CH) or (b) microwave heating (MW). Scale bar = 500nm.

Amara et al. hypothesize an urea mediated modification of the interactions between the tips of the tubes to explain the increased length, but could not give further details on the nature of the mechanisms involved.[8] The present results are consistent with a structuring role of urea during tube formation. Indeed, when the growth is conducted under similar conditions (viz. CH, 150°C for 7 days vs. 140°C 5days for the urea based protocol), only negligible amounts of tubes are produced from NaOH hydrolyzed systems (Figure 8), thereby suggesting that urea and/or its decomposition by-products not only promote tube lengthening, but also prevent the decomposition/destructuration of the short tubes formed in the initial stages of heating. In the present study, it is obvious that the enhanced tube growth under MW heating is the result of a different mechanism. The MW induced molecular motion of polar species causes homogenous heating throughout the sample volume, [18] but increased molecular mobility is not necessarily linked to thermal effects. [32]

The fast and homogeneous increase in temperature under MW irradiation certainly increases the kinetics of tube formation. However this faster molecular motion is not sufficient to explain the observed enhancement of the tube length. As a matter of fact, it appears that prolonged heating at temperature above 100°C has even adverse effects on tube growth as shown by the quasi-absence of Ge-imogolites for the systems that underwent CH at 150 and 200°C during 7 days (Figure 8). Interestingly, this temperature dependent destructuring of short Ge-imogolite tubes is not observed when MW are applied, and increasing proportions of long tubes are formed instead (Figure 7 and Figure 10).

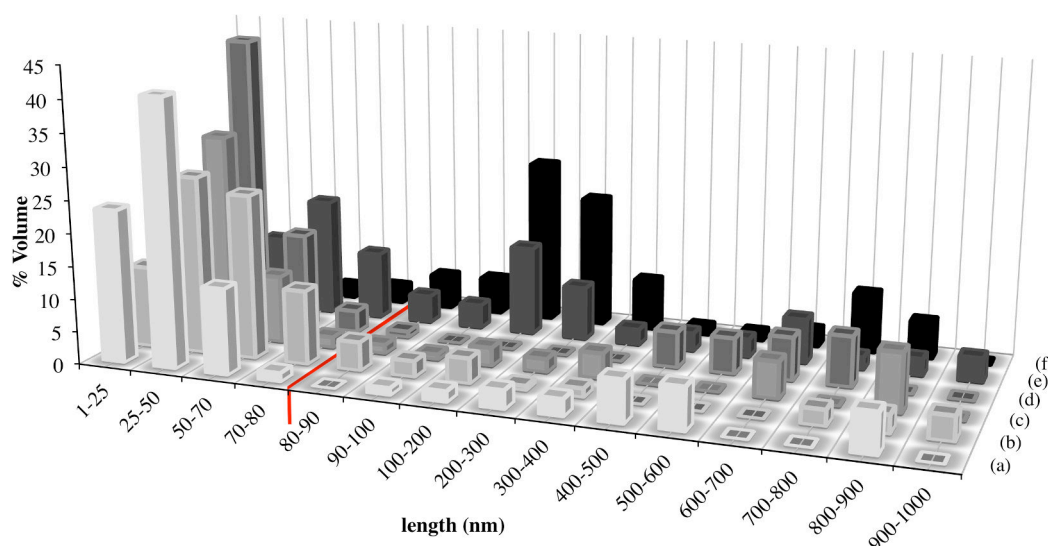


Figure 9: Repartition in volume percentage of Ge-imogolites nanotube lengths estimated from AFM images. At least 200 particles were considered excluding aggregates. Growth stages were performed under microwave heating at 100°C 1h (a) 2h (b), 150°C 1h (d) or 2h (e), 200°C 1h (f) or 2h (g). The maximum length (80nm) obtained with conventional heating is delimited with a line.

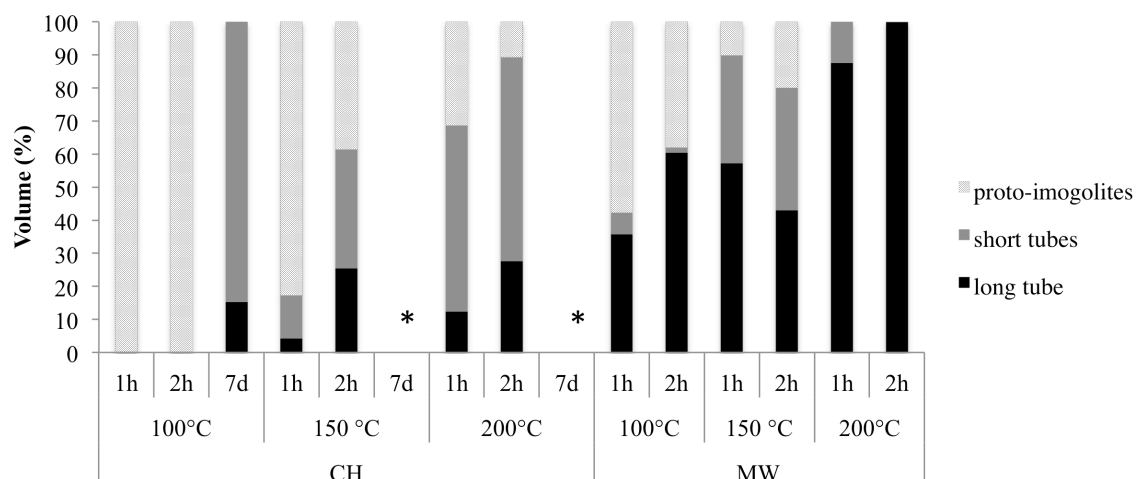


Figure 10: Repartition in volume percentage and type: proto-imogolites, short tubes (<25nm) or long tubes (>25nm) estimated from AFM images, for various temperatures, growing durations and the two heating conditions. *: samples dominated by large aggregates preventing the determination of tube proportions.

Amelioration of the tube growth could be achieved by favoring tip-to-tip collisions, since this has been hypothesized as major growth mechanism. [11] The most obvious way to accomplish this, is to restrict, at least partly, the randomness in particle collisions, i.e. promoting the alignment of the tubes within the sample, which equates to eliminating 2 degrees of liberty and thus a theoretical improvement of the probability of effective collisions by 4 to 5 orders of magnitude depending on symmetry. In this context, a specific MW effect could be the alignment of imogolites tubes along the MW electric field streamlines. Recent experiments, carried out with polarized light extinction spectroscopy, [33], [34] have clearly demonstrated that in the 0.3-6 MHz range, where the electrical properties of water are expected to be comparable to the GHz range, electric field gradients of 50V/mm are sufficient to align aqueous suspensions of imogolites nanotubes of a few tens of nanometers. On the other hand, for such moderate electric field gradients, electromagnetic calculations show that the induced dielectric force and dielectric moment are directly proportional to the particle electrical polarisability and thus, to the square of their length in the case of elongated particles such as nanotubes. As a consequence, the effect of the dielectric force induced by MW increases quadratically with the length of nanotubes, preventing their rotation induced by the Brownian motion and, to some extent, thermal effects. It is believed that such a mechanism would be most effective in promoting the tip-to-tip collisions between long tubes (and thus

rare at the beginning of the process), leading to the formation of micrometer-long tubes rather than nanometer of a few tens nanometers long.

For the MW systems at 100°C, proto-imogolite and long tubes are the major species while the proportion of short tubes is surprisingly low. This suggests an additional growth mechanism, according to which tubes grow from the addition of proto-imogolite. Since Ge is a good MW absorber (i.e. high equivalent electrical permittivity), [35] hotspots are likely to occur where Ge atoms are concentrated, i.e. the tubes and precursors, thus creating a favorable environment from an energy standpoint.

Obviously, these two mechanisms probably take place simultaneously. They are also not inconsistent since, for instance, the forced orientation of the largest nanotubes should also promote the assembly at their tips of proto-imogolites (which are probably less sensitive to the MW electrical field).

3.3.5 Outlook

The use of MW is a significant step forward in the synthesis of Ge-imogolite (100 times faster and tubes 10 times longer than with CH), and could be the key to commercial applications of this material. A better control over the tube length might be required to tailor tubes to specific uses. This means a more in-depth investigation of the mechanisms involved, their relative importance during the entire process. Here, it would be a matter of determining at which stage precursor addition or tube-tube collision are the predominant mechanism. To do so, monitoring particle orientation during the entire process is an essential piece of information. This aspect, which far from being straightforward, is currently under investigation.

3.3.6 Supporting information

AFM tip resolution (20nm) is too low to distinguish small tubes from proto-imogolites. Based on height repartitions exported from AFM data with the Gwyddion software (Figure 11.A.), we choosed a threshold under which particles are proto-imogolite, and tubes when above. The threshold choosend was 2.5nm, and was applied in AFM pictures (Figure 11.B.) to distinguish proto-imogolite (in black and white) from tubes (in red) (Figure 11.C.)

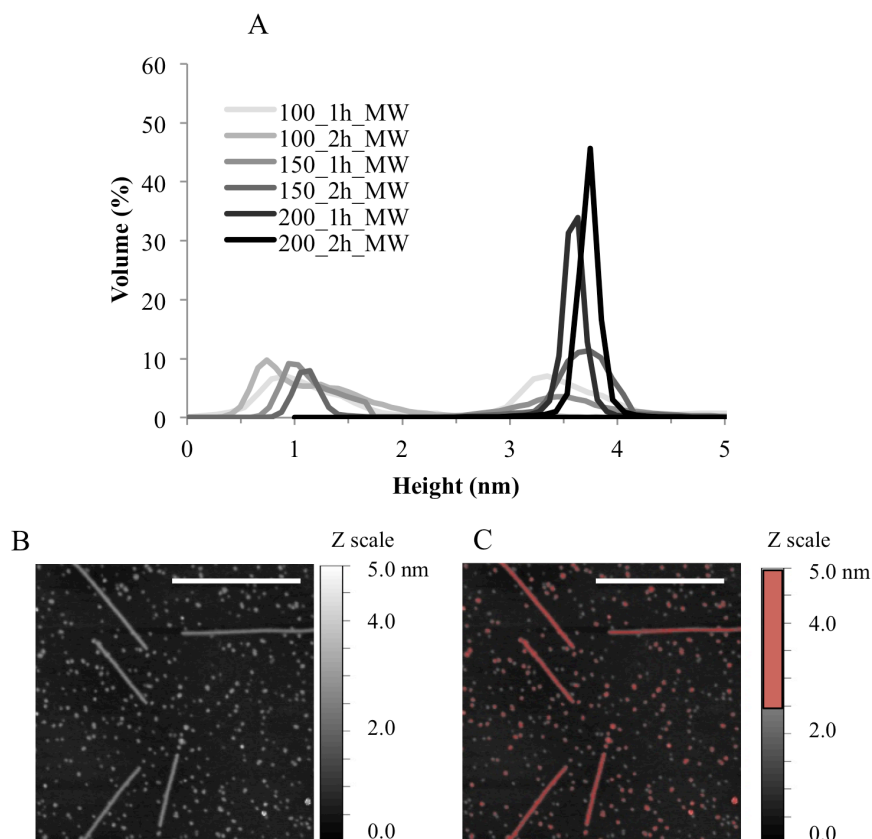


Figure 11 : Example of height thresholding to distinguish proto-imogolites from tubes. (A) Height repartition (volumes) of particles synthesized under MW irradiations, exported using Gwyddion software from AFM pictures. (B) AFM picture of Ge-imogolite grown under MW irradiation, 150°C, 2hrs. (C) Particles highest than 2.5nm are highlighted in red.

4 Conclusions du chapitre

Ce chapitre avait pour objectif global de présenter des nouveaux outils pour la réduction du temps de synthèse des Ge-imogolite. La phase de croissance étant l'étape la plus énergivore (4 jours à 95°C au minimum), nous nous sommes concentrés sur la réduction du temps nécessaire à cette étape. Pour se faire, nous avons apporté l'énergie nécessaire à la croissance des proto-imogolites en les plaçant *(i)* en fluides supercritiques ou *(ii)* sous irradiation MW.

Les conditions d'essais de croissance des Ge-imogolites dans un fluide supercritique ne sont pas celles permettant la fermeture et l'élongation des imogolites. L'énergie (haute température, hautes pressions) nécessaires pour que les fluides soient en conditions supercritiques et nos études exploratoires non concluantes ne nous ont pas encouragées à investiguer d'avantage ce mode de synthèse.

Cependant, nous avons réalisé une « **synthèse rapide** » des **Ge-imogolites** sous irradiation micro-onde associé à une augmentation de la longueur des tubes (1µm) en comparaison aux longueurs des protocoles les plus fréquents (moins de 100nm). Nous avons émis l'hypothèse que ces phénomènes sont dus *(i)* à l'alignement des particules sous champs électrique et *(ii)* à l'augmentation de la réactivité/de la mobilité des proto-imogolites, s'agrégeant en bordures de tubes. De plus, ce nouveau protocole nous permet désormais de réduire la phase de croissance de quatre jours à **2h sous irradiation micro-onde**.

Les Ge-imogolites, du fait du contrôle de leur morphologie, sont des matériaux prometteurs, notamment pour leur capacité d'adsorption spécifique des polluants (métalliques en particulier). Leur alignement sous champ pourrait permettre le design de membrane de filtration aux diamètres de pores contrôlés, permettant du même coup la dépollution des eaux. Ce nouveau protocole rend l'utilisation à grande échelle des Ge-imogolite réalisable puisque le temps nécessaire à leur croissance n'est plus que de 1 à 2h, contrairement aux anciens protocoles nécessitant 4 à 7 jours dans la littérature.

La variation des conditions de synthèses et les modifications morphologiques des Ge-imogolites en résultant illustre, ici encore, le potentiel qu'ont ces NM à être utilisés comme modèle, notamment pour les études des caractéristiques physico-chimiques des NM induisant des toxicités, comme réalisé dans cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. D. G. Cradwick, V. C. Farmer, J. D. Russell, C. R. Masson, K. Wada, et N. Yoshinaga, « Imogolite, a Hydrated Aluminium Silicate of Tubular Structure », *Nature*, vol. 240, n° 104, p. 187–189, pubmonth 1972.
- [2] K. Wada, N. Yoshinaga, et H. Yotsumoto, « High Resolution Electron Micrographs of Imogolite », *Clay Minerals*, vol. 8, n° 4, p. 487–489, 1970.
- [3] S. Wada et K. Wada, « Effects on substitution of germanium for silicon in imogolite », *Clays and Clay Minerals*, vol. 30, n° 2, p. 123–128, janv. 1982.
- [4] C. Levard, J. Rose, A. Masion, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, C. Dominici, O. Grauby, J. C. Woicik, et J.-Y. Bottero, « Synthesis of Large Quantities of Single-Walled Aluminogermanate Nanotube », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n° 18, p. 5862–5863, mai 2008.
- [5] C. Levard, A. Masion, J. Rose, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, P. Chaurand, C. Dominici, F. Ziarelli, A. Thill, P. Maillet, et J. Y. Bottero, « Synthesis of Ge-imogolite: influence of the hydrolysis ratio on the structure of the nanotubes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, n° 32, p. 14516–14522, août 2011.
- [6] P. Maillet, C. Levard, E. Larquet, C. Mariet, O. Spalla, N. Menguy, A. Masion, E. Doelsch, J. Rose, et A. Thill, « Evidence of double-walled Al-Ge imogolite-like nanotubes. a cryo-TEM and SAXS investigation », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 4, p. 1208–1209, févr. 2010.
- [7] A. Thill, P. Maillet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi, et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780–3786, févr. 2012.
- [8] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)3Al2O3Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284–11286, déc. 2013.
- [9] C. Levard, « Nanoparticules naturelles : imogolites et allophanes. Structure, mécanismes de croissance et capacité de rétention des éléments traces métalliques », Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2008.
- [10] P. Maillet, « Structure et croissance de nanotubes de Ge-imogolite simple et double-paroi », Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2010.
- [11] P. Maillet, C. Levard, O. Spalla, A. Masion, J. Rose, et A. Thill, « Growth kinetic of single and double-walled aluminogermanate imogolite-like nanotubes: an experimental and modeling approach », *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, vol. 13, n° 7, p. 2682–2689, févr. 2011.
- [12] C. Levard, J. Rose, A. Thill, A. Masion, E. Doelsch, P. Maillet, O. Spalla, L. Olivi, A. Cognigni, F. Ziarelli, et J.-Y. Bottero, « Formation and Growth Mechanisms of Imogolite-Like Aluminogermanate Nanotubes », *Chemistry of Materials*, vol. 22, n° 8, p. 2466–2473, avr. 2010.
- [13] F. Cansell, C. Aymonier, et A. Loppinet-Serani, « Review on materials science and

- supercritical fluids », *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 7, n° 4-5, p. 331-340, août 2003.
- [14] C. Aymonier, A. Loppinet-Serani, H. Reverón, Y. Garrabos, et F. Cansell, « Review of supercritical fluids in inorganic materials science », *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 38, n° 2, p. 242-251, sept. 2006.
- [15] P. S. Shah, T. Hanrath, K. P. Johnston, et B. A. Korgel, « Nanocrystal and Nanowire Synthesis and Dispersibility in Supercritical Fluids », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, n° 28, p. 9574-9587, juill. 2004.
- [16] M. Tsuji, M. Hashimoto, Y. Nishizawa, M. Kubokawa, et T. Tsuji, « Microwave-Assisted Synthesis of Metallic Nanostructures in Solution », *Chemistry – A European Journal*, vol. 11, n° 2, p. 440-452, janv. 2005.
- [17] J. A. Gerbec, D. Magana, A. Washington, et G. F. Strouse, « Microwave-Enhanced Reaction Rates for Nanoparticle Synthesis », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, n° 45, p. 15791-15800, nov. 2005.
- [18] I. Bilecka et M. Niederberger, « Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis », *Nanoscale*, vol. 2, n° 8, p. 1358-1374, août 2010.
- [19] Y.-J. Zhu et F. Chen, « Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase », *Chemical Reviews*, vol. 114, n° 12, p. 6462-6555, juin 2014.
- [20] V. C. Farmer, A. R. Fraser, et J. M. Tait, « Synthesis of imogolite: a tubular aluminium silicate polymer », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 13, p. 462-463, janv. 1977.
- [21] M. Suzuki et K. Inukai, « Synthesis and Applications of Imogolite Nanotubes », in *Inorganic and Metallic Nanotubular Materials*, vol. 117, T. Kijima, Éd. Springer Berlin / Heidelberg, 2010, p. 159-167.
- [22] C. Zanzottera, A. Vicente, E. Celasco, C. Fernandez, E. Garrone, et B. Bonelli, « Physico-Chemical Properties of Imogolite Nanotubes Functionalized on Both External and Internal Surfaces », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 116, n° 13, p. 7499-7506, avr. 2012.
- [23] A. Avellan, C. Levard, N. Kumar, J. Rose, L. Olivi, A. Thill, P. Chaurand, D. Borschneck, et A. Masion, « Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials », *RSC Advances*, vol. 4, n° 91, p. 49827-49830, oct. 2014.
- [24] S. Das, A. K. Mukhopadhyay, S. Datta, et D. Basu, « Prospects of microwave processing: An overview », *Bulletin of materials science*, vol. 32, n° 1, p. 1-13, 2009.
- [25] Y. Li, E. J. Lee, et S. O. Cho, « Superhydrophobic Coatings on Curved Surfaces Featuring Remarkable Supporting Force », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, n° 40, p. 14813-14817, 2007.
- [26] J. Miyawaki, M. Yudasaka, H. Imai, H. Yorimitsu, H. Isobe, E. Nakamura, et S. Iijima, « In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Single-Walled Carbon Nanohorns by Labeling with Magnetite Nanoparticles », *Advanced Materials*, vol. 18, n° 8, p. 1010-1014, 2006.
- [27] L. Vovchenko, L. Matzui, M. Zakharenko, M. Babich, et A. Brusilovetz, « Thermoexfoliated graphite as support for production of metal-graphite nanocomposites », *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 65, n° 2-3, p. 171-175, mars 2004.
- [28] S. C. Motshekga, S. K. Pillai, S. Sinha Ray, K. Jalama, et R. W. M. Krause, « Recent Trends in the Microwave-Assisted Synthesis of Metal Oxide Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes and Their Applications », *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, p.

- e691503, mars 2012.
- [29] D. Nečas et P. Klapetek, « Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis », *Central European Journal of Physics*, vol. 10, n° 1, p. 181–188, nov. 2011.
 - [30] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, et A. Cardona, « Fiji: an open-source platform for biological-image analysis », *Nature Methods*, vol. 9, n° 7, p. 676–682, juill. 2012.
 - [31] C. A. Schneider, W. S. Rasband, et K. W. Eliceiri, « NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis », *Nature Methods*, vol. 9, n° 7, p. 671–675, juill. 2012.
 - [32] A. de la Hoz, Á. Díaz-Ortiz, et A. Moreno, « Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects », *Chemical Society Reviews*, vol. 34, n° 2, p. 164–178, janv. 2005.
 - [33] F. R. A. Onofri, C. Pelcé, L. Meister, C. Montet, P. Pelcé, S. Barbosa, M. Sentis, et M. Bizi, « On the size and morphological characterization of needle-shaped TiO₂ nanoparticles in suspension », 2014, vol. 9232, p. 92320K–92320K–6.
 - [34] F. R. A. Onofri, K. F. Ren, et C. Grisolia, « Development of an in situ ITER dust diagnostic based on extinction spectrometry: Dedicated light scattering models », *Journal of Nuclear Materials*, vol. 390–391, p. 1093–1096, juin 2009.
 - [35] E. Muthuswamy, A. S. Iskandar, M. M. Amador, et S. M. Kauzlarich, « Facile Synthesis of Germanium Nanoparticles with Size Control: Microwave versus Conventional Heating », *Chemistry of Materials*, vol. 25, n° 8, p. 1416–1422, avr. 2013.

**Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la
cristallinité des Ge-imogolites sur l'induction d'effets
toxiques**

SOMMAIRE

Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la cristallinité des Ge-imogolites sur l'induction d'effets toxiques	123
1 Introduction et objectifs du chapitre	123
2 Modification de la croissance de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> en présence de Ge-imogolites à morphologies variables.....	125
2.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons	125
2.1.1 Le diamètre des tubes et leur nombre de parois	125
2.1.2 La longueur des tubes.....	127
2.1.3 La présence de lacunes	129
2.1.4 Les potentiels zéta	130
2.2 Etudes des effets des Ge-imogolites sur la croissance de <i>P. brassicacearum</i> ..	131
3 La modification des effets toxiques des Ge-imogolites en fonction de leurs défauts structuraux.	133
3.1 Résumé étendu de l'article	133
3.2 Influence of structure defects of Ge-imogolite nanotubes on their toxicity towards <i>Pseudomonas brassicacearum</i> bacteria.....	135
3.2.1 Introduction	135
3.2.2 Material and methods	136
3.2.3 Results and discussion.....	138
3.2.4 Conclusion.....	143
3.2.5 Supporting information	145
4 Conclusions du chapitre.....	147
Références bibliographiques	149

Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la cristallinité des Ge-imogolites sur l'induction d'effets toxiques

1 Introduction et objectifs du chapitre

Comme détaillé dans le Chapitre I. Introduction, certains paramètres physico-chimiques des nanomatériaux (NM) montrent des tendances communes à la modulation des toxicités qu'ils engendrent. Parmi eux, les grands rapports d'aspect (i.e le rapport longueur/hauteur) des NM a été cité dans plusieurs études. Par exemple, sur des cellules eucaryotes, il a été démontré que les nanotubes de carbones (NTC), induisent des inflammations identiques à l'amiante lorsque leurs formes étaient similaires, bien que présentant des propriétés de surfaces différentes (hydrophobe vs. hydrophile par ex.). [1] Ces résultats ne démontrent cependant pas de manière convaincante un rôle majeur de la taille des NTC, notamment parce que la taille n'était pas le seul paramètre à varier.

Partant de ce constat de la nécessité de NM modèles, deux études ont utilisé les Ge-imogolites afin de faire varier leur rapport d'aspect et identifier l'importance de leur morphologie dans l'induction d'effets toxiques [2], [3]. Aussi, la toxicité des Ge-imogolites simple (SW) ou double parois (DW) a été étudiée sur des tissus pulmonaires de rats *in vivo* [3] Les auteurs concluent à l'induction d'une toxicité due au nombre de tubes (réactivité de surface) plutôt qu'à la modification du diamètre des Ge-imogolites. Les auteurs suggèrent alors que le facteur déterminant dans l'induction de la toxicité soit le nombre de bords de tubes, présentant des sites plus réactifs. D'ailleurs, l'étude de Liu et coll. sur l'effet de la longueur de Ge-imogolites DW sur leur génotoxicité sur des cellules épidermiques [2] montre que les cas les plus génotoxiques sont observés pour les précurseurs des DW, moins bien formés (avec des défauts structuraux) mais de tailles équivalentes aux tubes les plus courts. Cependant, dans cette étude les Ge-imogolites sont courtes (plusieurs dizaines de nanomètres) et ne permettent pas d'investiguer réellement l'effet de la longueur des tubes *vs* l'effet des défauts structuraux (la présence de lacunes).

Enfin, l'étude de la variation de la morphologie des NM à grand rapport d'aspects sur des cellules procaryotes n'a jamais été investiguée avec d'autres NM que les NTC ou des nanorods (type ZnO, CeO₂ ou TiO₂...), présentant, encore une fois, des morphologies, des cristallinités ou des compositions chimiques variables.

Dans ce contexte, nous avons soulevé plusieurs questions quand à l'impact du rapport d'aspect dans la toxicité des nanomatériaux modèles Ge-imogolites.

Les Ge-imogolites à grands rapports d'aspect vont-elles engendrer les mêmes toxicités sur des cellules procaryotes bactériennes que sur des cellules eucaryotes ? Peut-on, dans un système expérimental bien contrôlé, identifier quel paramètre du rapport d'aspect ou des défauts structuraux induit la toxicité des Ge-imogolites ? Est-il possible d'identifier des mécanismes de toxicité particuliers liés à ces paramètres ?

Dans ce chapitre, nous détaillerons les résultats des travaux réalisés pour répondre à ces questions.

L'impact du rapport d'aspect a été étudié en comparant des Ge-imogolites bien cristallisées à **nombre de parois** et à **longueurs** variables. L'impact des défauts structuraux a été investigué en utilisant des Ge-imogolites à **cristallinité** variables (présence de lacunes) mais à diamètre et longueurs équivalentes.

Pour ce faire, des Ge-imogolites à paramètres variables ont été synthétisés en variant les conditions de synthèses. Les concentrations en réactifs pour l'obtention de tubes DW, DW micrométriques (DW μ m), SW ou SW lacunaires (SWlac) sont résumées en Figure 1. Après la dialyse des solutions obtenues, chacun de ces échantillons (excepté DW μ m qui ont été synthétisés séparément, comme détaillé dans le Chapitre II (Matériel et Méthodes, Page 53) a été fractionné par filtration tangentielle sur un seuil de coupure à 200 nm afin d'enrichir les sous-fractions en tubes plus courts (nommée plus tard <200nm) ou plus longs (>200nm). Ces solutions ont été lyophilisées et pesées afin de déterminer la proportion de particules courtes et longues dans les solutions mères (NF). Les morphologies et les cristallinités de ces Ge-imogolites ont été caractérisées. Les modifications de leurs toxicités (i.e. la croissance bactérienne après 24h) ont été suivies sur la bactérie des sols *Pseudomonas brassicacearum*.

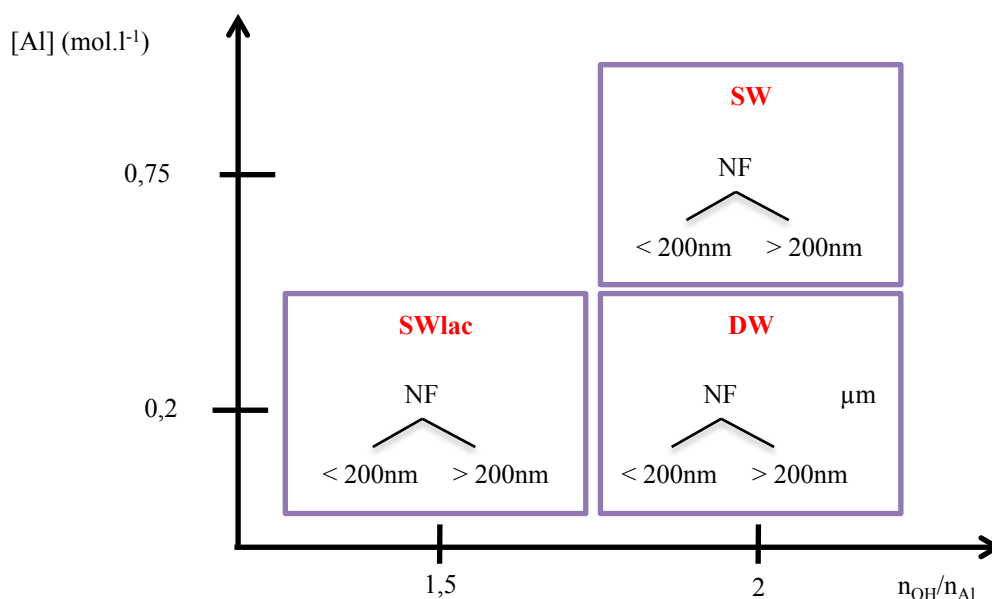


Figure 1 : Conditions de synthèses (concentrations en aluminium et rapports d'hydrolyse) pour l'obtention d'imogolites à structures variables, et séparation de taille des sous-fractions. SW : simples parois ; SWlac : simples parois lacunaires ; DW : doubles parois. NF : solution mère non filtrée. Fractions obtenues en filtration tangentielle enrichies en tubes courts (<200nm) ou longs (>200nm). µm : DW de longueurs micrométriques avec étape d'hydrolyse à l'urée.

2 Modification de la croissance de *Pseudomonas brassicacearum* en présence de Ge-imogolites à morphologies variables.

L'influence de la longueur des Ge-imogolites sur leur toxicité nécessite d'être étudiée sur des Ge-imogolites à diamètre (SW ou DW) équivalent. Les effets dus au nombre de parois doivent eux être réalisés pour des tubes de longueur fixe. Dans ces deux cas, les systèmes devaient être bien caractérisés afin de ne pas induire de variable supplémentaire. La caractérisation des paramètres physico-chimiques de forme (longueur, nombre de parois) a donc été réalisée. Le rapport molaire Al/Ge ainsi que la cristallinité des tubes ont également été mesurés afin de s'assurer que ces paramètres restaient constants lorsque la taille ou le diamètre varie.

2.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons

2.1.1 Le diamètre des tubes et leur nombre de parois

Afin de caractériser le nombre de parois des Ge-imogolites, nous avons mesuré la hauteur des particules (i.e. leur diamètre) sur des images de microscopie à force atomique (AFM), dont l'exemple des hauteurs des fractions <200nm est présenté en Figure 2.

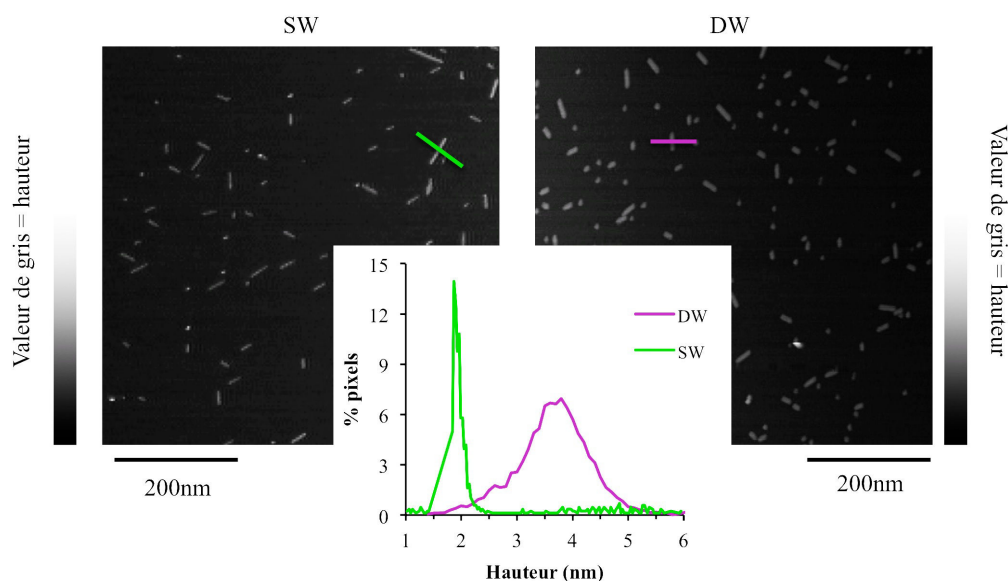


Figure 2 : Exemple de différence de hauteur des tubes (i.e. diamètre) mesurée en AFM sur les sous fractions courtes (<200nm) des échantillons simple paroi (SW) et doubles parois (DW). Les images AFM contiennent une information de hauteur en niveau de gris. Le pourcentage de pixel pour chaque taille (i.e. niveau de gris) pour 200 particules a été tracé pour obtenir les répartitions de hauteurs.

Ce graphique de répartition de hauteurs indique que les matériaux ont deux diamètres bien distincts, centrés sur 2nm pour les SW et sur 4nm pour les DW. L'augmentation du diamètre des tubes est due à leur nombre de parois. Si le diamètre des DW est proche de ce qui est décrit dans la littérature d'après des mesures en solution de diffusion des rayons X aux petits angles (4,3nm d'après [4]), le diamètre mesuré des SW est inférieur (3,8nm dans la littérature). Ceci peut être dû à la plus grande fragilité des tubes simple paroi, déformés par la pointe AFM. Cependant, ces répartitions de hauteurs démontrent bien que les protocoles de synthèses nous ont bien permis d'obtenir des SW et des DW.

Cette mesure a été confirmée par une étude en diffraction des rayons X (DRX) des échantillons. L'analyse des diffractogrammes (en Figure 3) de chacun des échantillons et de leurs sous fractions permet d'obtenir des informations sur les distances entre les plans atomiques des structures. Il est à noter que les pics de diffraction des rayons X des Ge-imogolites ont été très peu investigués dans la littérature, et que les plans atomiques correspondants n'ont pas été identifiés. Seul le pic à 8,5 Å a été assigné à la répétition du motif de gibbsite le long des nanotubes [5]. Il a été récemment montré que la présence de deux plans de Bragg entre 12 et 18 Å correspondant à des plans de diffraction du cylindre intérieur d'un tubes DW et permet de faire la distinction entre les SW (1 plan) et les DW (2 plans) [6].

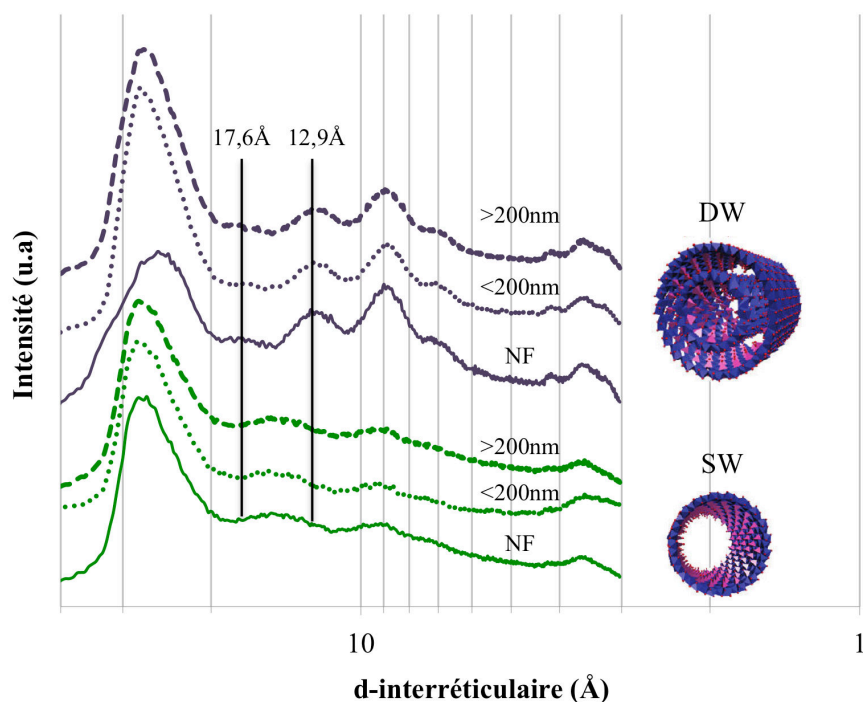


Figure 3 : Diffractogrammes des échantillons de Ge-imogolites SW ($C_{Al}=0,75M$) ou DW ($C_{Al}=0,2M$) et de leurs sous fractions. Anti-cathode de cobalt ($\lambda_{K\alpha} = 1,79\text{\AA}$).

Ces diffractogrammes confirment que nous avons donc bien synthétisé des échantillons comportant un nombre de parois différents (SW ou DW). De plus, les sous-fractions <200nm et >200nm ont la même structure que leur solution mère (NF), indiquant que le nombre de parois ne dépend pas de la longueur des tubes au sein d'un échantillon.

2.1.2 La longueur des tubes

La mesure des longueurs des tubes a été réalisée grâce à l'analyse des images AFM. Pour réaliser les répartitions de longueurs, la longueur de Feret (i.e. ; la plus grande distance entre deux points au sein d'une particule), assimilable à la longueur des tubes dans notre système, a été mesurée pour chaque particule sur *a minima* trois images différentes (pour plus de détails sur l'extraction des longueurs de Feret, se reporter au Chapitre II. Matériels et Méthodes page 53).

Les distributions de longueurs obtenues sont représentées en Figure 4. Les longueurs moyennes pour chaque fraction ont été reportées dans le Tableau 1

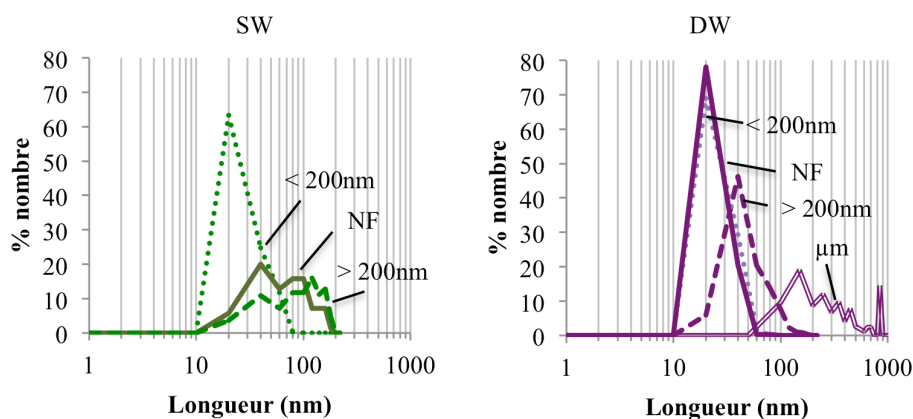


Figure 4 : Distributions de longueur des Ge-imogolites simple parois (SW, en vert) et doubles parois (DW, en violet) des fractions non filtrées (NF) et de leurs sous fractions enrichies en particules courtes (<200nm) ou longues (>200nm). Les DW micrométriques (DW μ m) sont également représentés. Les longueurs ont été mesurées par AFM en exportant les longueurs de Feret d'un minimum de 500 particules, sans prendre en compte les éventuels agrégats.

Tableau 1 : Longueurs moyennes mesurées par AFM, proportions des sous fractions dans la solution NF initiale ; masses et nombre par gramme calculés des Ge-imogolites. DW : double parois. SW : simple paroi. SWlac : SW lacunaires. NF : Non filtré ; μ m : micrométrique. <200nm : inférieur à 200nm. >200nm : supérieur à 200nm.

Echantillon	Longueur moyenne (nm)	Proportion des sous-fractions dans la solution NF	Masse calculée d'un tube (g)	Nombre calculé de tube par gramme
DW μ m	200	-	$7,2 \cdot 10^{-18}$	$1,4 \cdot 10^{17}$
DW NF	25	100	$8,8 \cdot 10^{-19}$	$1,1 \cdot 10^{18}$
DW >200nm	57	5	$2,1 \cdot 10^{-18}$	$4,9 \cdot 10^{17}$
DW <200nm	27	95	$9,7 \cdot 10^{-19}$	$1,0 \cdot 10^{18}$
SW NF	84	100	$1,8 \cdot 10^{-18}$	$5,7 \cdot 10^{17}$
SW >200nm	105	77	$2,2 \cdot 10^{-18}$	$4,6 \cdot 10^{17}$
SW <200nm	30	23	$6,3 \cdot 10^{-19}$	$1,6 \cdot 10^{18}$

Ces résultats montrent qu'il y a une disparité de longueurs en fonction de la structure des Ge-imogolites. En effet, si les longueurs moyennes des DW NF sont courtes (25nm), celles des SW NF sont plus longues (84nm). Cette différence a déjà été observée dans la littérature, même si ce phénomène n'a pas été discuté. [7] La sous fraction <200nm des SW composait 23% de l'échantillon initial. La séparation de taille a bien fonctionné puisque l'échantillon est composé exclusivement de particules courtes (longueurs moyennes de 30nm) quand la fraction >200nm est enrichie en particules longues (longueurs moyenne de 105nm). Cependant, le seuil réel de coupure de la filtration semble se situer à une cinquantaine de nanomètres. Les DW NF sont composés à 95% de particules courtes. Aussi leur filtration n'a pas enrichie la sous fraction <200nm en particules courtes (moyenne de 27nm). Cependant, la sous fraction >200nm montre un enrichissement en particules plus longues, avec des

longueurs moyennes de 57nm. Ici encore, le seuil de coupure de la membrane de filtration semble être en réalité d'une cinquantaine de nanomètres.

En utilisant les longueurs moyennes de tubes obtenues en AFM, le nombre de tubes par gramme a été calculé pour normaliser les résultats de toxicité par nombre de tubes (en plus de la normalisation par masse classiquement utilisée). L'étude des Ge-imogolite par SAXS (Small angle X-ray Scattering) par Thill et coll. en 2012 [4] décrit le nombre d'atomes de Ge qui composent les tubes. Deux anneaux (8,5 Å le long du tube) de SW sont composés de 44 atomes de Ge et de DW de 76 atomes de Ge (50 sur la paroi externe et 26 sur la paroi interne). Nous avons utilisé ces données pour extrapoler la masse d'un tube SW ou DW pour les longueurs moyennes mesurées en AFM (Tableau 1).

2.1.3 La présence de lacunes

Comme détaillé plus tôt dans ce chapitre, afin d'étudier l'effet de la morphologie (longueur et nombre de parois) sur la toxicité, aucun autre paramètre ne doit varier. Notamment, la présence de lacunes qui sont potentiellement des sites à forte réactivité, pourraient influencer directement ou indirectement leur toxicité. Nous avons donc caractérisé la cristallinité des Ge-imogolites afin de s'assurer de l'absence de lacunes. Le potentiel zéta a également été mesuré puisqu'il permet de sonder la présence de lacunes.

L'extérieur des tubes de Ge-imogolite est composé d'une couche courbée de gibbsite ($\text{Al}(\text{OH})_3$) et l'intérieur de germanium tétraédriques (liés à 6 octaèdres d'aluminium pour des systèmes bien cristallisés). [8] Afin d'identifier la présence de lacunes dans la couche externe d'Al, la spéciation du Germanium a été étudiée en utilisant la spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) au seuil K du Ge. La transformée de Fourier (TF) des oscillations EXAFS permet de visualiser la nature, le nombre, la distance des atomes rétrodiffuseurs dans la sphère de coordination du Ge. Le Tableau 2 présente les meilleures simulations pour chacun des spectres correspondant aux 4 échantillons analysés, ainsi que les rapports molaires Al/Ge mesurés par ICP-AES.

Tableau 2 : Résultats de modélisations des spectres EXAFS, et rapports Al/Ge mesurés en ICP-AES. R : distance radiale (Å) $\pm 0,01$ Å. N : nombre d'atomes voisins ($\pm 10\%$). σ : facteur de Debye-Waller (Å).

Elément	Ge-O			Ge-Al			$n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}}$
	R	N	σ	R	N	σ	
DW >200nm	1,75	4,0	0,05	3,25	5,5	0,07	$1,98 \pm 0,04$
DW <200nm	1,75	3,9	0,05	3,26	5,0	0,07	$1,86 \pm 0,03$
SW >200nm	1,75	4,0	0,05	3,25	5,0	0,07	$1,85 \pm 0,05$
SW <200nm	1,75	4,3	0,05	3,25	5,3	0,07	$1,82 \pm 0,04$

Le rapport stoechiométrique Al/Ge théorique des Ge-imogolites est de 2. Le nombre théorique moyen d'atomes d'O liés à un Ge est de 4,0 à une distance interatomique de 1,75 Å, et de 6 atomes d'Al à 3,26 Å. [9] Dans les sous-fractions de DW et de SW, les résultats des modélisations sur la transformée de Fourier inverse des spectres EXAFS sont très proches (aux erreurs près) de ces données théoriques. Ces résultats indiquent une bonne cristallinité des échantillons, sans défauts dans la couche de gibbsite. Les rapports stoechiométriques Al/Ge proches de 2 (aux erreurs près) confirment ces mesures.

Il est à noter que l'échantillon DW μ m a été obtenu plus tardivement au cours des travaux et que l'étude de la spéciation du Ge en EXAFS n'a pas pu être réalisée. Cependant, son rapport n_{Al}/n_{Ge} est de $1,97 \pm 0,03$ ce qui indique une bonne cristallinité des tubes.

2.1.4 Les potentiels zéta

Les mesures des potentiels zéta permettent d'avoir une indication sur la charge des particules au point de cisaillement de son cortège ionique en solution. Le potentiel zéta est calculé *via* la mobilité électrophorétique des particules en solution, influencée par les charges de surfaces des matériaux. Ces résultats sont illustrés en Figure 5.

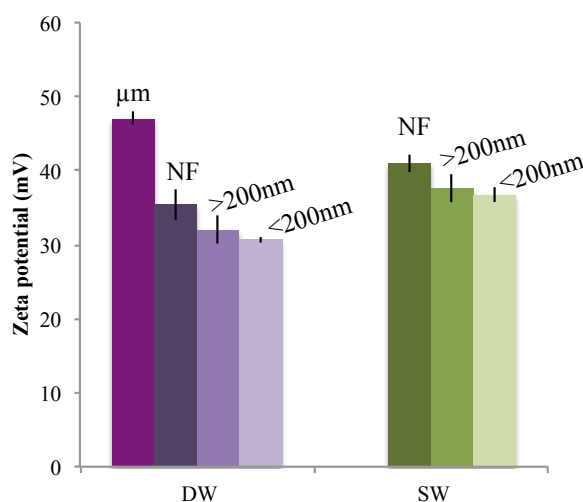


Figure 5 : Potentiels zéta calculés à partir de la mobilité électrophorétique des Ge-imogolites et de leurs sous fractions, à 50mg.L⁻¹. (pH = 6-7, conductivité= 45-50 μ S.cm⁻¹).

Les résultats montrent que tous les potentiels zéta des échantillons sont supérieurs à +30mV indiquant une bonne stabilité colloïdale des NM dans l'eau. La tendance à l'augmentation du potentiel zéta des NM en fonction du nombre de parois (DW<SW) est non significative. Les différences de potentiels zéta des sous fractions <200nm et > 200nm en comparaison avec les NF ne sont pas significatives. L'échantillon DW μ m présente un potentiel zéta plus élevé (+47mV). Ces potentiels zéta positifs sont dus à des charges positives des Ge-imogolites à pH

6,5. La répartition des charges n'est pas connue sur les Ge-imogolite. Cependant, leurs charges sont possiblement conférées par les groupements

- Silanols -SiOH, à l'intérieur des tubes, négativement chargés au delà d'un pH 3-4.
- Al-O(H)-Al sur les parois des tubes. La courbure de la couche de gibbsite induit une diminution du pH à laquelle les groupes se déprotonent. Cependant ces groupements devraient être positivement chargés à pH 6-7.
- Les groupements Al(OH)_x qui se retrouvent en bordure de tube ou dans les sites lacunaires. Ces groupements sont positivement chargés à pH 6-7.

Aussi, nous n'avons pas pu expliquer l'augmentation du potentiel zéta des DW μm . Les charges structurales des parois ont été modélisées comme ayant une contribution majoritaire dans l'étude de la répartition des charges sur des Si-imogolites. [10] Des tubes plus longs présenteraient donc, à masse égale plus de charges de parois.

2.2 Etudes des effets des Ge-imogolites sur la croissance de *P. brassicacearum*

Grâce à la caractérisation précise de la structure des Ge-imogolites DW et SW, nous savons que seuls varient (i) le nombre de parois ou (ii) la longueur des tubes dans les sous-fractions. La structure cristalline et les potentiels zéta des échantillons sont identiques, excepté pour DW μm qui présentent un potentiel zéta plus élevé. L'effet de la taille et du diamètre des Ge-imogolites sur la croissance de *P. brassicacearum* n'a été étudié que sur les sous-fractions de tailles des échantillons (< 200nm et > 200nm), qui présentaient des répartitions de longueurs plus resserrées que leurs solutions mères (NF).

10⁷ bactéries/ml ont été exposées à 0, 1, 10 ou 50mg.L⁻¹ de Ge-imogolites. Après 24h de croissance, le nombre de bactérie a été mesuré *via* un décompte CFU (Colony Forming Unit). Les conditions de cultures, le détail de la souche bactérienne et du milieu utilisé sont détaillés dans le Chapitre II. Matériel et Méthodes, page 53.

La modification de la croissance de *P. brassicacearum* en contact avec les Ge-imogolites est présentée en fonction de la concentration massique des NM, ou de leur nombre (Figure 6).

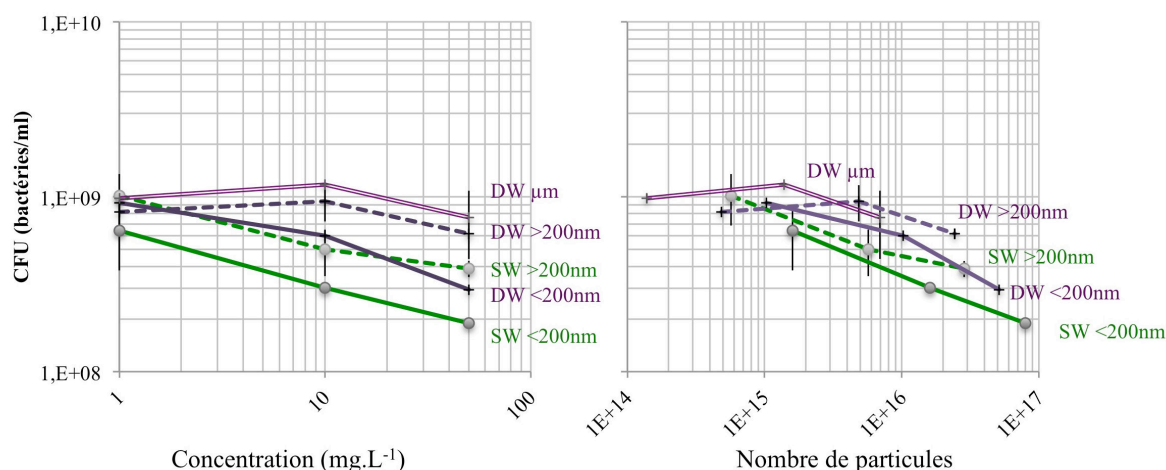


Figure 6 : Nombre de bactéries par ml après 24h de croissance en présence de Ge-imogolites. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration massique (à gauche) ou du nombre (à droite) de Ge-imogolite. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance ($\alpha=0,05$). Le nombre de bactéries contrôle est de $1,5 \cdot 10^9$ CFU. DW : double paroi. SW : Simple paroi. μm = micrométrique. $<200\text{nm}$: fraction courte. $>200\text{nm}$: fraction longue.

Les bactéries non exposées aux Ge-imogolites (témoins) atteignent $1,5 \cdot 10^9$ CFU. Les Ge-imogolite qui réduisent significativement (ANOVA, $\alpha=0,05$) la croissance des bactéries par rapport aux contrôles non exposés sont SW <200 (dès 10mg.L^{-1}), SW $>200\text{nm}$ et DW $<200\text{nm}$ (à 50mg.L^{-1}).

Si les résultats sont étudiés en fonction de leur concentration, à 50mg.L^{-1} l'effet induit par les Ge-imogolites plus courtes ($<200\text{nm}$) est significativement différents de leurs analogues plus longs ($>200\text{nm}$ ou μm), indiquant que plus les Ge-imogolites sont courtes, plus leur effet est délétère sur la croissance de *P. brassicacearum*. De plus, à longueurs égales, le nombre de paroi ne modifie pas significativement ces effets.

Cependant, lorsque les résultats sont étudiés en fonction du nombre de NM ajouté, les différences observées pour les tubes courts ne sont plus significatives. Ces résultats en nombre indiquent que **ni le diamètre, ni la longueur** n'influe sur la croissance de *Pseudomonas brassicacearum*. Seul le **nombre de particules** induit une modification des effets. De plus, à masse égale et à structure identique, la surface spécifique ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) de NM est égale et ne varie pas en fonction du nombre de NM. Aussi ces effets des Ge-imogolites sur la croissance de *P. brassicacearum* n'est pas dû uniquement à la surface de NM à laquelle les bactéries sont exposées. A ce stade nous avons émis l'hypothèse que ces effets sont induits par le **nombre de bords** de tubes. En effet, nous pensons que les sites de bordures sont les sites les plus énergétiques, qui vont contrôler la réactivité des Ge-imogolites envers les bactéries.

3 La modification des effets toxiques des Ge-imogolites en fonction de leurs défauts structuraux.

3.1 Résumé étendu de l'article

Comme présenté au dessus, la réduction de la croissance de *Pseudomonas brassicacearum* serait principalement due au nombre de bords de tubes (de sites réactifs) auxquels sont exposées les bactéries. Afin de tester cette hypothèse, des synthèses de Ge-imogolites simple paroi bien cristallisée (SW) ou présentant des défauts structuraux, des lacunes, dans la couche de gibbsite (SWlac) ont été synthétisés. La caractérisation de ces échantillons a été réalisée en mesurant le nombre de paroi, la hauteur, la longueur, ainsi que la cristallinité des tubes. Afin d'étudier l'impact de la présence de défauts structuraux (i.e. les lacunes) dans la parois des Ge-imogolites, nous avons exposé *Pseudomonas brassicacearum* à 0, 1, 10 ou 50 mg.L⁻¹ de SW ou SWlac. La croissance des bactéries après 24h a été utilisée comme un proxy de la toxicité qu'induisent les Ge-imogolites à cristallinité variables. Afin de comprendre les effets induits par les Ge-imogolites, nous avons étudié (i) les interactions des nanotubes avec les bactéries, (ii) leur dégradation dans le milieu de culture, (iii) la sorption des éléments nutritifs sur les Ge-imogolites.

Les résultats de caractérisation des échantillons montrent que les SW et SWlac sont de structure (simple paroi), de hauteur (2nm) et de longueurs (30nm) similaires, seule la cristallinité variant. Les SW présentent une bonne cristallinité, sans lacunes, tandis que les SWlac ont environ 30% d'atomes d'Al manquants dans leur couche octaédrique d'aluminium. Ces lacunes sont corrélées à l'augmentation du potentiel zéta des SWlac du fait de la création de nouveaux sites réactifs composés d'hydroxydes liés à un seul Al (-AlOH), chargés positivement à pH7. [10]. Cependant, dans le milieu de culture la contribution principale aux potentiels zéta est due aux composés organiques du milieu de culture, et sont identiques pour les deux types de tubes. Les résultats de l'étude des toxicité obtenus montrent que

- les SW diminuent peu la croissance de *Pseudomonas brassicacearum* et ne sont pas significativement plus toxiques lorsque leur concentration augmente
- les nouveaux sites présents dans les parois des SWlac induisent une diminution drastique de la croissance des bactéries (de l'ordre de deux ordres de grandeur) après 24h d'exposition, illustrant l'inhibition de leur croissance.

L'étude plus fine des interactions de SW et SWlac avec le milieu de culture et les bactéries a mis en évidence

- Une modification des interactions avec *P. brassicacearum*, qui ne s'agrègent pas avec les SWlac (contrairement à l'hétéro-agrégation observée avec les SW). Cela traduit un comportement différent des SWlac en solution.
- 20% de dégradation des SWlac (contre 5% pour les SW) qui induit une concentration en Ge et Al relargué pouvant induire une toxicité.
- La sorption d'éléments nutritifs (Cu et Zn) essentiels à la croissance des bactéries plus importante sur SWlac. La concentration restante en Cu non associés aux SWlac est très basse, et proche des concentrations critiques induisant un arrêt de la division cellulaire dans la littérature.

La toxicité différente qu'induit les SWlac par rapport aux SW est donc due à la synergie de plusieurs événements. L'augmentation des défauts structuraux des Ge-imogolites augmente le nombre de sites réactifs en contact avec l'environnement, modifiant les interactions subvenant entre le milieu de culture et les bactéries.

Si le contact direct entre les NM et les bactéries semble déterminant dans les mécanismes de toxicité, discuté par plusieurs auteurs comme une des conditions à l'induction de toxicité, *via* une atteinte à l'intégrité des membranes cellulaires et une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, il peut également se produire des événements indirects, comme la dissolution des NM, ou l'adsorption spécifique d'éléments essentiels à la croissance des bactéries, perturbant fortement leur comportement.

3.2 Influence of structure defects of Ge-imogolite nanotubes on their toxicity towards *Pseudomonas brassicacearum* bacteria.

Influence of structure defects of Ge-imogolite nanotubes on their toxicity towards *Pseudomonas brassicacearum* bacteria.

A. Avellan,^{a,b} W. Achouak,^d C. Santaella,^d C. Levard,^{a,b} J. Rose,^{a,b} L. Olivi,^c A. Masion^{a,b}.

^a CEREGE, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, Collège de France, Europôle Méditerranéen de l'Arbois, BP80, 13545 Aix-en-Provence, France.

^b iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

^c ELETTRA, Synchrotron Light Source, 34012 Trieste, Italy.

^d LEMiRe, UMR 6191 CNRS/CEA Université Aix Marseille II, 13108 Saint Paul lez Durance, France

3.2.1 Introduction

Over the past decade, nanotechnologies have become a significant economic sector in a number of countries. However, the concerns regarding the associated risks to public health and the environment are still vivid, but are rarely addressed in a way that is useful in terms of prediction and regulation purposes. More precisely, linking toxic effects to specific physical chemical properties of a nanomaterial remains sketchy at best. Even though an ample literature dealing with the toxicity of nanomaterials has been generated over the past 10 years, the material parameters triggering the biological response have received only marginal attention,[11] and their categorization into nanospecific- vs. bulk properties is almost never addressed. A common misconception is to establish this categorization based on whether the material meets the 100 nm size requirement [12]. Intuitively, it is easy to conceive that, among all parameters likely to be affected by size variations (optical, mechanical, thermal...), the crystallinity is sensitive to diminishing sizes. Structural modifications will appear as a result of size dependent changes in site geometry and/or energy. These are modifications occurring well below the 100 nm limit. [12]

Modifying the crystallinity while preserving other material properties can be a rather involved process. However, Ge-imogolite, a structural analogue to the naturally occurring aluminosilicates,

silicate imogolite fibres found in volcanic soils, is a nanotubular material for which this can be readily achieved. The synthesis of Ge-imogolite is sufficiently well mastered to obtain chemically pure material with a reasonable control over wall multiplicity[7], presence and extent of vacancies in the wall structure[9], and tube length[13].

Additionally, there is some toxicity data available regarding this material: unlike CNTs or asbestos, no adverse fiber effect was observed on fibroblast cell cultures (keeping in mind that the tube length did not exceed the size of the biological target), and, as a matter of fact, less well formed structures, the precursors, had stronger genotoxic effects than well formed with a comparable size [2].

Here we built on this first step to expand our understanding on how structural imperfections may influence the toxicity of a material towards biota. To this end *Pseudomonas brassicacearum*, i.e. relevant soil bacteria, were exposed to single walled Ge-imogolite purposely incorporating defects in the wall structure.

3.2.2 Material and methods

Imogolite synthesis and characterization

Single-walled (SW) and lacunar Singled-Walled (SWlac) Ge-imogolite tubes were synthesized, adapting the existing protocols described in 2011 by Levard *et al* [9]. Aluminum perchlorate $\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$ at a given concentration ($C_{\text{Al}} = 0.75 \text{ M}$ for SW and 0.2 M for SWlac) were mixed to germanium(IV) ethoxide $\text{Ge}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ($n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}} = 1.75$). This solution was then slowly hydrolyzed by adding caustic soda (NaOH) ($C_{\text{OH}} = C_{\text{Al}}$) until the desired R ratio $n_{\text{OH}}/n_{\text{Al}}$ was reached ($R = 2$ for SW and 1.5 for SWlac). The suspensions were heated at 95°C for 5 days to promote tube growth, and then dialyzed against ultra-pure water until a conductivity of $2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ was reached.

Morphology and size of the formed structures was assessed with AFM (Inova, Bruker). Images were obtained in tapping mode after deposition of a diluted drop onto a mica sheet. Length and height distributions were measured using the Gwyddion [14] and ImageJ [15] softwares.

The $n_{\text{Al}}/n_{\text{Ge}}$ ratio within the formed solid was measured by ICP-AES (Ultima-C, Horiba) on acid (HNO_3) digested samples.

Structure determination was performed on freeze dried solids using XRD (PANalytical, Xpert Pro) and Ge K-edge EXAFS (beamline 11.1, ELETTRA synchrotron, Trieste, Italy). EXAFS is an element specific probe of the atomic environment of a given atom (here Ge). Normalized X-ray absorption spectra is used to extract EXAFS oscillations, which were

Fourier transformed. The $R+\Delta R$ region containing the picks of interest was back-Fourier transformed. These curves were fitted with theoretical plots varying the nature of the atoms bounded to Ge, their number, their distances and the atomic disorder they contain, a best fit for each curve was obtained. Adding an other atom shell to the fit have been made if the resulting fit had a reduced χ^2 improved by 30%.

Imogolite degradation in the culture media was estimated by measuring Al and Ge concentrations inside and outside 10kDa dialysis bags containing 50 mg.L⁻¹ of the imogolite material after 24h hours contact with the bacteria.

The zeta potential of the formed particles in in culture media was measured unsing a nanoZS, Malvern.

Ge-imogolite bacterial growth modulation.

Pseudomonas brassicacearum, wild type strain NFM421 [16] from frozen stocks (-80°C) were grown on tenfold diluted tryptic soil broth solidified with 15g/l agar (TSA 1/10) for 24h at 30°C. A single colony was resuspended in diluted tryptic soil broth media (TSB 1/10) and kept at 28°C, 150 rpm (rotations per minute), until a concentration of 1.10¹⁰ bacteria/ml was reached. This pre-culture suspension was diluted to 1.10⁷ bacteria/ml in the casaminoacid medium (CAA), containing different concentration of imogolite (0 0.1, 1, 10 or 50mg.L⁻¹).

After 24h growth at 28°C, 150rpm of the bacteria exposed to imogolites, the CFU and the optic density at 600nm were measured to look at growth modifications.

NM-bacteria interactions were studied using enhanced darkfield microscope (Olympus BX51) equipped with a CytoViva Hyperspectral Imaging System (HSI, Auburn, AL). A drop (20 µl) of sample was deposited on a clean glass slide and covered with a coverslip for imaging. Pictures were made using 75% light magnification and 0.25 s acquisition time per line. Hyperspectral signal acquisition was processed in each pixel following light absorption for wavelength from 400 to 1000 nm. NM hyperspectral library was build on pictures of NM in abiotic culture media after 24h. These libraries were used to process a spectral angle mapper (SAM) on pictures using a maximum angle of 0.085 rad. Analyses were performed using ENVI 5.1 software (exelis). Each pixel on pictures containing the nanoparticles hyperspectral signature was then labeled with a chosen color.

Abiotic CAA containing 0 or 50mg.L⁻¹ of both imogolite was keep under agitation for 24h at 28°C. Al, Ge, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu and Zn concentrations in CAA were measured by

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrophotometer (ICP-MS, NexION 350X, Perkin Elmer) (i) before and (ii) after centrifugation (8000g for 30min) in the supernatant fraction.

3.2.3 Results and discussion

Imogolites characterization

The XRD pattern (in Supporting information –S.I. Figure 12) for the synthesized imogolite samples (SW and SWlac) are both characteristics of single-walled Ge-imogolite [6]. The presence of wall defects in the SWlac sample did not cause an observable modification of the diffraction compared to intact imogolite.

The tube diameter determined from AFM images was about 2 nm for both SW and SWlac. This value is lower than the 3.5 nm determined earlier from TEM and SAXS data (Maillet 2010), and may be due to tube deformations caused by the force of the AFM tip as observed on Si-imogolite [17].

Tube length was similar with size distributions centered around 30 and 59 nm for SW and SWlac respectively; thus the two tube types differ only in crystallinity.

Tube wall integrity / defects were characterized by examining the Ge speciation in the samples by studying X-ray absorption spectra (cf. full results in S.I.).

In a well formed imogolite each GeO_4 tetrahedron is surrounded by 6 Al in the gibbsite layer. The best fit of our Ge K-edge EXAFS data for the SW sample is consistent with this binding environment (Figure 8): the first shell around Ge consists of about 4 O at 1.75 Å and the next nearest shell of ca. 5 Al at 3.25 Å and 1 Al at 3.15 Å. This is in agreement with previous EXAFS measurement on similar material [9].

For SWlac, the ligand sphere around Ge is, within the margin of error, (Figure 8) identical to the SW sample. However, our XAS data indicates the presence of only 4 Al in the second coordination shell instead of 6 in well crystallized imogolite. This corresponds to a wall defect proportion of about 30 ± 10 %.

The Al/Ge ratios measured by ICP-AES (Figure 8) confirm the presence of wall defects in the SWlac: the Al/Ge ratio 1.55 for SWlac displays an Al deficit of about 25% compared to the theoretical 2, and is 15% lower than the 1.82 ratio measured for the SW sample.

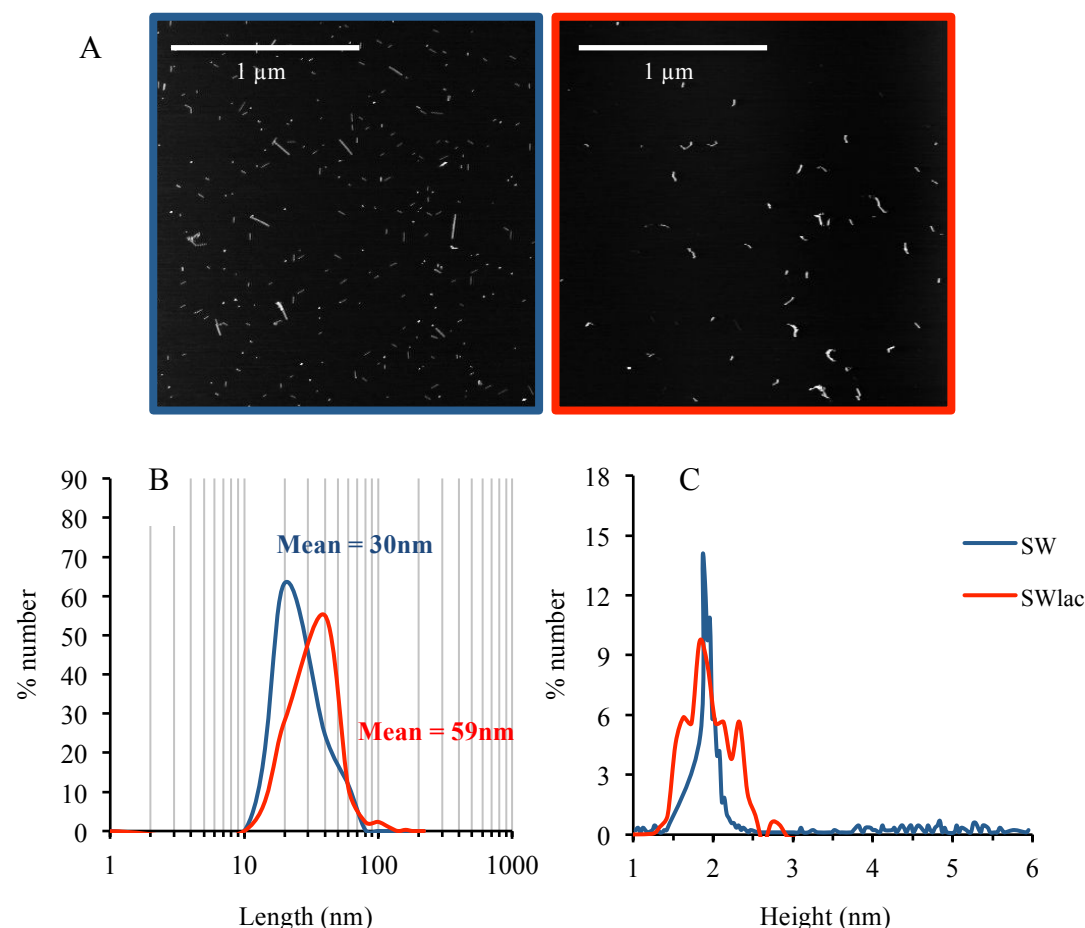
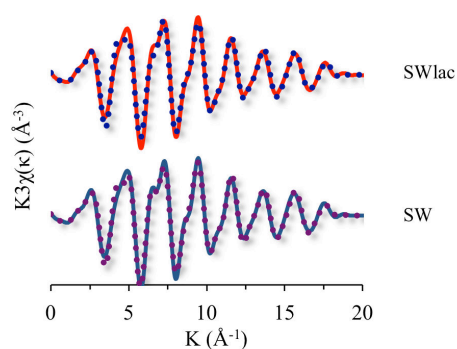


Figure 7 : (A) AFM pictures used to measure (B) length and (C) height distribution of imogolite nanotubes. SWlac in red, SW in blue. Length and height distributions are based on at least 200 particles, excluding aggregates.



	Ge-O shell			Ge-Al shell			Ge-Al shell			Red χ^2	R-fact	n_{Al}/n_{Ge}
	N	R	σ	N	R	σ	N	R	σ			
Swlac	4.4 ± 0.3	1.75 ± 0.003	0.05	4.3 ± 0.5	3.26 ± 0.006	0.07	-	-	-	192	0.06	1.55 (0.03)
SW	4.3 ± 0.3	1.75 ± 0.004	0.05	4.8 ± 0.4	3.25 ± 0.006	0.07	1.1 ± 0.3	3.15 ± 0.02	0.07	867	0.05	1.82 (0.05)

Figure 8 : Back-Fourier transform spectra of the pseudoradial distribution function of SW and SWlac at Ge K-edge (window $1.5 \text{ \AA} < R < 3.5 \text{ \AA}$). Above : Experimental data (lines) and best fits (dots). Under : Best fits parameters and Al/Ge molar ratio.

The Zeta potentials of SW and SWlac were measured in water or in culture media (CAA).

In DI water, the measured zeta potentials were $+32 \pm 1$ mV for SW, and $+63 \pm 2$ mV for SWlac. This significant difference was expected from the significant proportion of tube wall defects in SWlac and the thus generated pH sensitive Al-OH_x end groups located at the vacancies.

In the CAA culture medium, these Zeta potentials are controlled by the organics in the medium and almost identical for both tube samples (-26 ± 3 mV and -29 ± 5 mV for SW and SWlac respectively)

The two tube types were morphologically identical and only differ in crystallinity and thus in zeta potentials.

Imogolites effects on bacterial growth

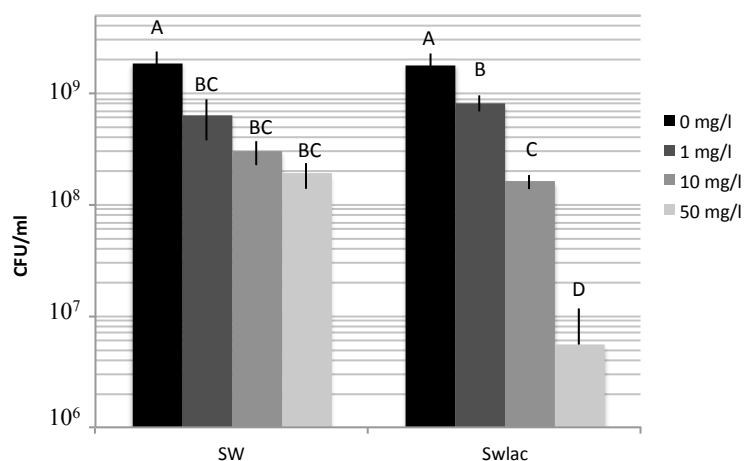


Figure 9 : bacterial number per ml. *Pseudomonas brassicacearum* was exposed to 0, 1, 1 or 50 mg/l of imogolite (SW or SWlac) during 24h in CAA media . Groups marked by letters are statistically different from each other (ANOVA, Turkey HSD test, $p < 0.05$)

The initial number of *Pseudomonas brassicacearum* was 10^7 CFU.mL⁻¹. The control sample, i.e. without tube addition, grown in CAA media after 24h at 28°C, 150rpm reached 1.9×10^9 CFU.mL⁻¹ (Figure 9). Adding 1 mg.L⁻¹ SW imogolites leads to a decrease in bacterial growth with 6×10^8 CFU.mL⁻¹. Further increase of the tube concentration (up to 50 times the lowest tube concentration) caused the CFU number to decrease to 2×10^8 CFU.mL⁻¹, without however being statistically significant.

When SWlac was added, bacterial growth reduction was much more pronounced than with SW for all concentrations above 1 mg.L⁻¹ (Figure 9) and the bacteria count did not exceed

5.5×10^6 CFU.mL⁻¹ for 50mg.L⁻¹, i.e. less than the inoculum bacteria number at 10^7 CFU.mL⁻¹, thus demonstrating complete growth inhibition.

To study the interactions between the imogolites and *P. brassicacearum*, we used enhanced dark field coupled to hyperspectral imaging system (HIS). Every pixel of the images contains the light absorbance spectra between 400 to 1000nm. These spectra reflect the material composition at the location of the pixel.

The hyperspectral libraries for the imogolite materials were built based on their signal in the abiotic culture media. The resulting libraries of SW vs SWlac are different with more intense absorption peaks shifted to larger wavelength in the case of SW. This may reflect the difference in chemical composition (SWlac has 30% less Al in its structure) and/or higher aggregation of SW in the culture media than SWlac [18].

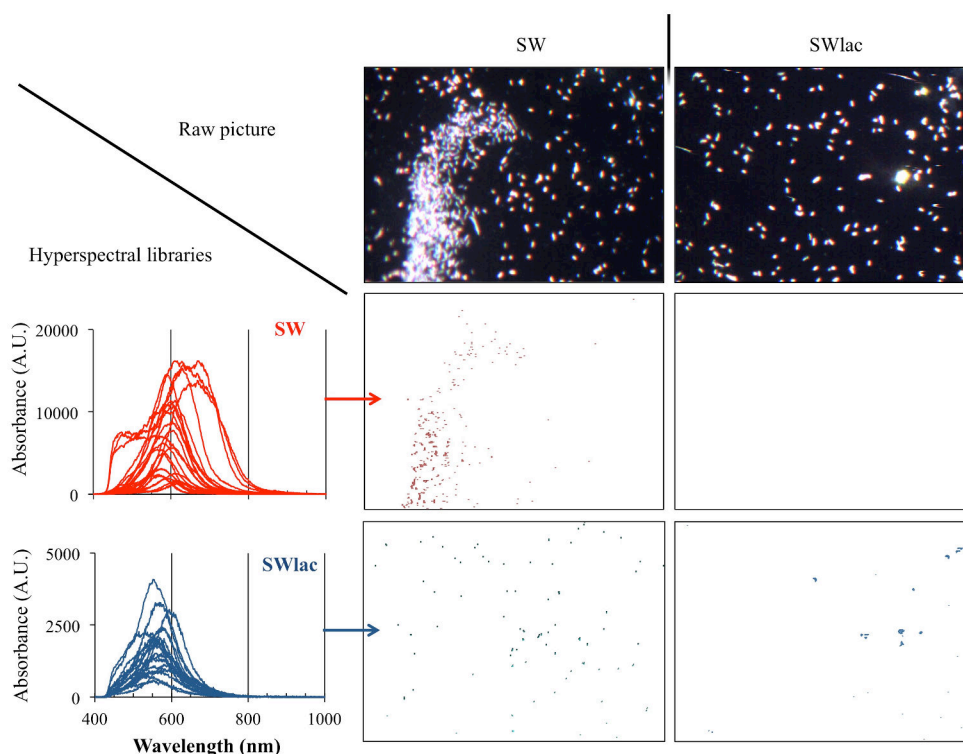


Figure 10: Pixel mapping of NM hyperspectral libraries on dark field microscopy images of bacteria exposed to NM. Illuminated pixels have the same composition than SW (when red) or SWlac (when blue). Maps were made using Spectral Angle Mapper method using a 0.085rad angle.

No SW related signal is detected in either abiotic (Figure 14 in S.I) or biotic samples of SWlac exposure (Figure 10). This demonstrates that our spectra library is sufficiently robust to avoid false positives in systems without SW materials, and that, *a priori*, SW and SWlac material do not share common spectral features. However, SWlac signals were detected in

both abiotic and biotic systems exposed to SW material. This may be caused by SW developing wall defects upon contact with the culture medium and/or commune signal of tubes aggregation (which may have been absent of the abiotic SW picture used for SW libraries building).

In the system where *P. brassicacearum* was exposed to the intact imogolite tubes, the hyperspectral signal of SW material was predominantly associated with bacteria aggregates. A relatively weak occurrence of SWlac spectral signature was detected only on isolated bacteria.

When exposed to imogolites with wall defects, the overall aspect of the system was modified compared to the well-formed tubes in so far as no bacteria aggregates were observed. Additionally the magnitude of the detected SWlac spectral signature remained modest and only occasionally associated with the bacteria in the system. This strongly suggests that the SWlac has undergone sufficiently extensive transformations within the 24 hrs of exposure so as to alter its spectral signature.

To assess the contribution of dissolved species to the observed toxicity, the concentration of Al and Ge was measured outside 10 kDa dialysis bags containing the imogolite material under both abiotic and conditions, assuming all the element getting outside the dialysis membrane were ions. Background concentrations, i.e. the CAA medium only, were 0.15 and 0.3 mg.L⁻¹ for Al inside and outside the bag; Ge was below the detection limit. Adding intact tubes increased the total concentration to 11.1 ± 0.7 mg.L⁻¹ for Al and 21.6 ± 2 mg.L⁻¹ for Ge, with only 5% leaching outside the tube. Similar total concentrations were measured for SWlac. In this case however, the measured Al (1.5 ± 0.3 mg.L⁻¹) and Ge (3.7 ± 0.9 mg.L⁻¹) corresponded to about 20% of the introduced imogolite material. This is equivalent to the release of 66 µmol.L⁻¹ Al and 63 µmol.L⁻¹ Ge ions at maximum. Ge toxicity assessment is anecdotic in literature because of its non-environmental prevalence. However, growth reduction of micro-organisms have been observed for GeO₂ concentrations around 20µM [19]. Regarding aluminum release, 60µmol.L⁻¹ are levels toxic to several *Pseudomonas* species [20]. Therefore a contribution of dissolved Al to the inhibition of bacteria growth observed in the present work cannot be excluded, without however to be a determining factor considering Al expected speciation (viz. circum-neutral pH conditions and presence of complexing organics which alleviate Al toxicity).

The measured Zeta potential demonstrates that both imogolite materials sorbed organics present in the medium. Nevertheless, it is known that aluminosilicates have a significant

affinity of heavy metal ions such as Zn^{2+} , [21] Cd^{2+} and Cu^{2+} . [22]–[24] By extrapolation, it is not unreasonable to assume that this remains valid for the present aluminogermante material. This may lead to deficiencies in essential elements in the medium. To this end, a number of elements important to bacterial growth, viz. Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu and Zn, [25] were monitored in terms of availability after their contact with imogolite material with and without tube wall defects in the retentate of centrifugation (Figure 11). Elements associated with imogolite in the centrifugates are Ca, Mn, Fe and Co in similar proportions for both SW and SWlac. Differences between the added nanotubes were observed for Zn and mainly Cu for which about 40% of the initial amount was associated with SWlac tubes, whereas less than 15% was bound to the intact SW imogolites. Previous reports described specific Cu sorption onto $=\text{Al}-\text{OH}$ sites [22], [23], thus explaining the higher Cu removal from solution with the lacunar imogolite material. As a matter of fact, while after contact with the intact SW, about 85% of the initial Cu were still available in solution, this proportion dropped below 60% after contact with the lacunar SWlac tubes, thus creating a significant deficit for this essential element and added stress for the bacteria. Indeed, the remaining available Cu concentrations after SWlac addition were about $0.07 \pm 0.01 \mu\text{mol.L}^{-1}$. This is in the range concentrations in which *Escherichia coli* is under Cu starvation ($0.08 \mu\text{mol.L}^{-1}$ for $10^9 \text{ cells.ml}^{-1}$) [26], [27].

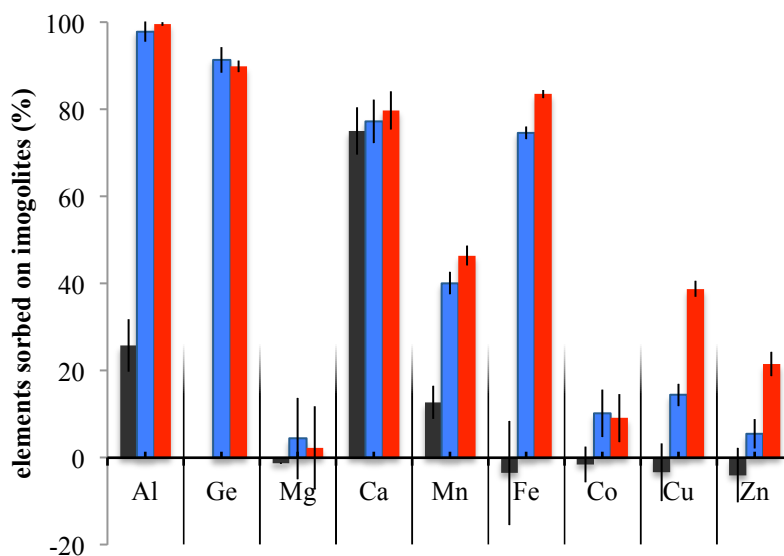


Figure 11 : Element percentage sedimenting in CAA (black) containing 50 mg.L^{-1} of SW (blue) or SWlac (red).

3.2.4 Conclusion

From our results it is evident that the presence of defects in the tube wall of Ge-imogolite has a detrimental effect on the toxicity towards *Pseudomonas brassicacearum*. Since all other

major parameters were kept constant (diameter, size, chemical composition), this enhanced toxicity can unequivocally be attributed to the vacancies. However, it appears that this is the result of a multi tiered process. The intrinsic particle charge plays only an indirect, since the charge difference between intact and lacunar tube is erased upon addition into the culture medium. However, the added sorption capacity of the SWlac tubes renders specific removal of essential nutrients unavailable to bacteria. The influence of toxic presumably dissolved toxicants is more difficult to estimate since their adverse effect(s) is closely related to the speciation, which could not be determined here.

3.2.5 Supporting information

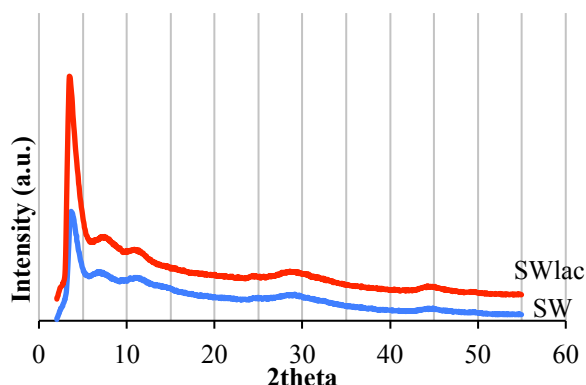


Figure 12 : X-ray diffraction patterns of Ge-imogolite well crystallized (SW) or with lacunar site in its structure (SWlac)

SW are SWlac have specific Ge-imogolite single-walled XRD pattern/

To finely characterize the presence of lacunar site in the aluminium octahedral layer, we processed EXAFS at Ge k-edge. EXAFS is an element specific probe of the atomic environment of a given atom (here Ge). The steps for EXAFS data extraction and treatment are presented in Figure 13. Normalized X-ray absorption spectra is used to extract EXAFS oscillations, which are Fourier transformed. Then a window is taken in the $R + \Delta R$ region containing the information of interest, and is back-Fourier transformed.

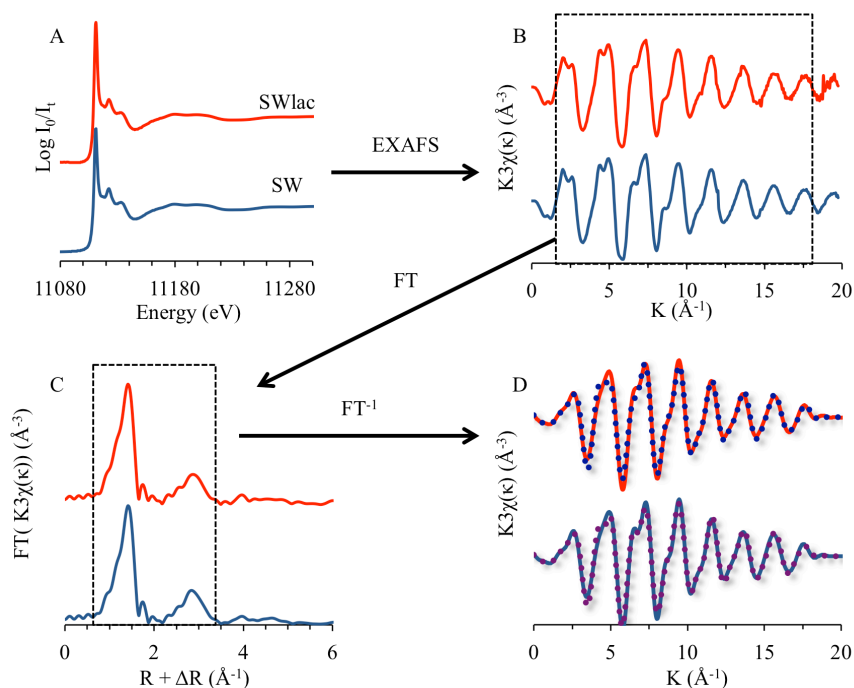


Figure 13 : (A) Normalized X-ray absorption spectra (B) Extracted EXAFS spectra oscillations from (B). (C) Fourier transforms of data in the window (2 to 18 Å⁻¹) of the EXAFS spectra. (D) Back-Fourier transform spectra of the peak (1.5 Å < R < 3.5 Å). Experimental data (lines) and best fits (dots).

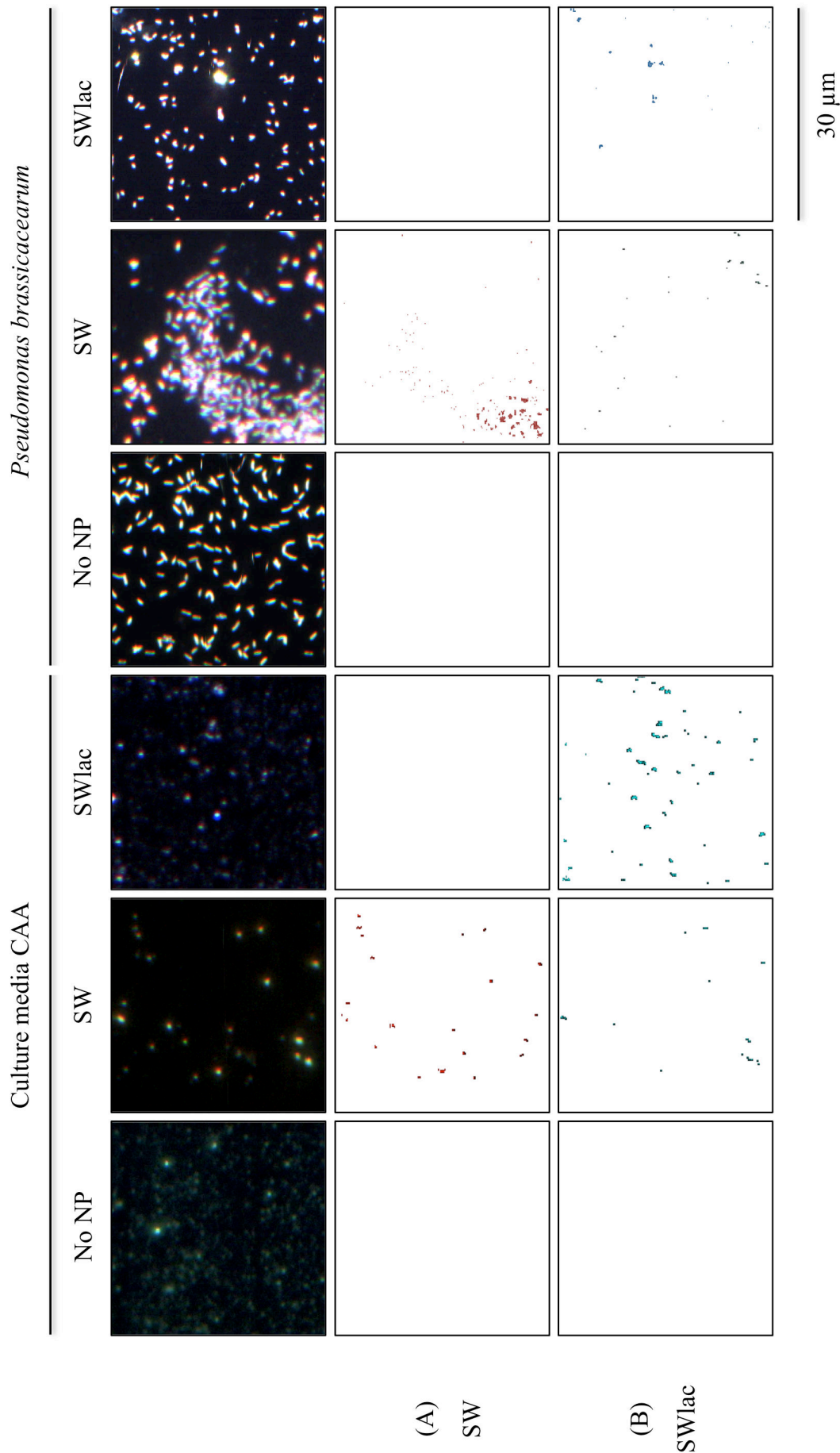


Figure 14 : Mapping results of hyperspectral libraries of (A) Single Walled (SW) or (B) SW lacunar (SWlac) on pictures of culture media (left) and bacteria (right) with or without 50mg.L⁻¹ of SW and SWlac. Mapping made using Spectral Angle Mapper (0,085 rad).

4 Conclusions du chapitre.

Dans ce chapitre, nous avons montré que les Ge-imogolites sont un bon modèle pour contrôler la variation de leurs paramètres physico-chimiques et étudier des réponses cellulaires spécifiques. Nous avons ainsi pu étudier la modification de leurs effets toxiques due à la variation (i) **du nombre de parois** (SW vs DW), à longueurs de tubes équivalentes, (ii) **de la longueur** (longs vs courts) à nombre de parois identiques et (iii) **de la présence de lacunes** (SW vs SWlac) à nombre de parois et longueurs équivalents. Les conditions de synthèse et les résultats de caractérisations des NM obtenus sont résumés en Figure 15.

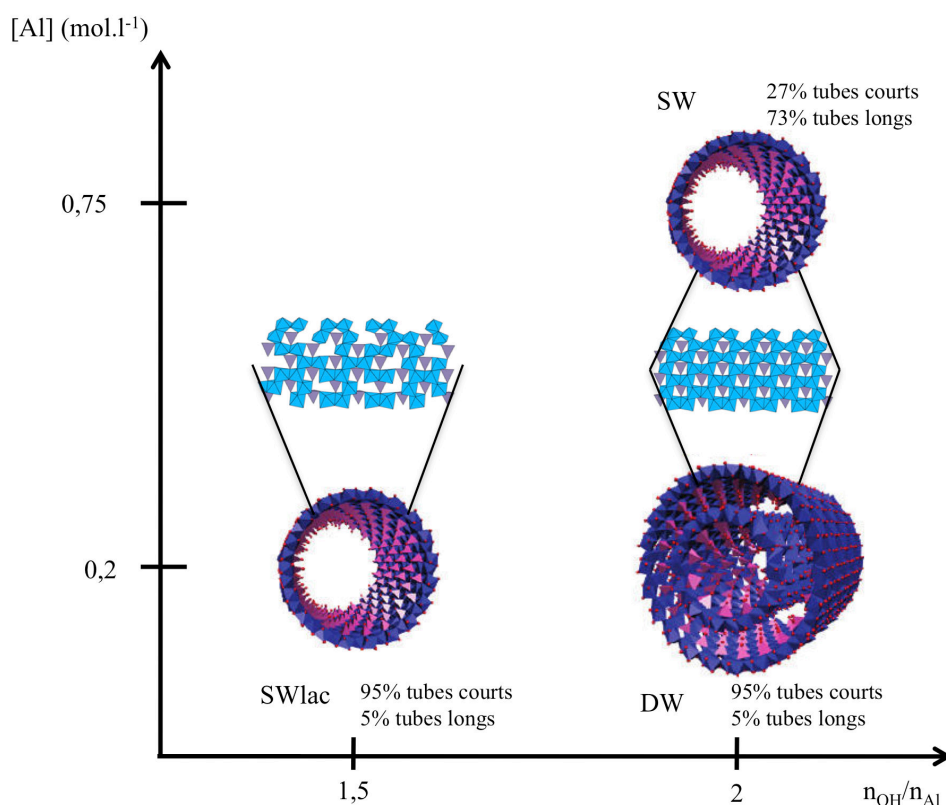


Figure 15 : Bilan des structures de Ge-imogolites obtenues en fonction des conditions de synthèses.

Ces Ge-imogolites modèles nous ont permis de montrer des toxicités spécifiques à certaines caractéristiques :

- La morphologie des imos (nombre de parois, longueur) **n'influe pas** sur la croissance de *Pseudomonas brassicacearum*. Le rapport d'aspect, qui semble déterminant dans la toxicité des NTC sur des cellules eucaryotes n'est pas un paramètre physico-chimique déterminant dans l'induction de la toxicité des Ge-imogolites pour les gammes de taille étudiées. Cependant, la toxicité des Ge-imogolite semble venir du **nombre de bords de tubes** auxquelles les bactéries sont exposées, qui sont les sites les plus réactifs.

- Les imos présentant des défauts structuraux, et donc plus de sites réactifs (identiques à ceux en bordures de tubes), induisent une très grande toxicité qui est majoritairement indirecte, due :
 - à la **fragilisation des tubes** du fait de la présence de lacunes, qui augmente leur dégradation et le relargage d'aluminium et de germanium potentiellement toxiques.
 - à l'**appauvrissement du milieu** en éléments nutritifs essentiels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, et K. Donaldson, « Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study », *Nature Nanotechnology*, vol. 3, n° 7, p. 423–428, juill. 2008.
- [2] W. Liu, P. Chaurand, C. di-giorgio, M. De Meo, A. Thill, M. Auffan, A. Masion, D. Borschneck, F. Chaspoul, philippe Gallice, A. Botta, J.-Y. Bottero, et J. C. Rose, « Influence of the length of imogolite-like nanotubes on their cytotoxicity and genotoxicity towards human dermal cells », *Chemical Research in Toxicology*, sept. 2012.
- [3] S. van den Brule, E. Beckers, P. Chaurand, W. Liu, S. Ibouaaden, M. Palmi-Pallag, F. Uwambayinema, Y. Yakoub, A. Avellan, C. Levard, V. Haufroid, E. Marbaix, A. Thill, D. Lison, et J. Rose, « Nanometer-long Ge-imogolite nanotubes cause sustained lung inflammation and fibrosis in rats », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 11, n° 1, p. 67, déc. 2014.
- [4] A. Thill, P. Maillet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi, et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780–3786, févr. 2012.
- [5] S. Mukherjee, V. M. Bartlow, et S. Nair, « Phenomenology of the Growth of Single-Walled Aluminosilicate and Aluminogermanate Nanotubes of Precise Dimensions », *Chemistry of Materials*, vol. 17, n° 20, p. 4900–4909, oct. 2005.
- [6] M. Bizi, « The structure and textural heterogeneity of single- and double-walled aluminogermanate imogolites », *Journal of Porous Materials*, p. 1–9, août 2015.
- [7] P. Maillet, C. Levard, E. Larquet, C. Mariet, O. Spalla, N. Menguy, A. Masion, E. Doelsch, J. Rose, et A. Thill, « Evidence of double-walled Al-Ge imogolite-like nanotubes. a cryo-TEM and SAXS investigation », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 4, p. 1208–1209, févr. 2010.
- [8] C. Levard, J. Rose, A. Thill, A. Masion, E. Doelsch, P. Maillet, O. Spalla, L. Olivi, A. Cognigni, F. Ziarelli, et J.-Y. Bottero, « Formation and Growth Mechanisms of Imogolite-Like Aluminogermanate Nanotubes », *Chemistry of Materials*, vol. 22, n° 8, p. 2466–2473, avr. 2010.
- [9] C. Levard, A. Masion, J. Rose, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, P. Chaurand, C. Dominici, F. Ziarelli, A. Thill, P. Maillet, et J. Y. Bottero, « Synthesis of Ge-imogolite: influence of the hydrolysis ratio on the structure of the nanotubes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, n° 32, p. 14516–14522, août 2011.
- [10] J. P. Gustafsson, « The Surface Chemistry of Imogolite », *Clays and Clay Minerals*, vol. 49, n° 1, p. 73–80, janv. 2001.
- [11] A. B. Djurišić, Y. H. Leung, A. M. C. Ng, X. Y. Xu, P. K. H. Lee, N. Degger, et R. S. S. Wu, « Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts », *Small*, vol. 11, n° 1, p. 26–44, janv. 2015.
- [12] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, et M. R. Wiesner,

- « Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective », *Nature Nanotechnology*, vol. 4, n° 10, p. 634–641, oct. 2009.
- [13] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)₃Al₂O₃Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284–11286, déc. 2013.
- [14] D. Nečas et P. Klapetek, « Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis », *Central European Journal of Physics*, vol. 10, n° 1, p. 181–188, nov. 2011.
- [15] C. A. Schneider, W. S. Rasband, et K. W. Eliceiri, « NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis », *Nature Methods*, vol. 9, n° 7, p. 671–675, juill. 2012.
- [16] W. Achouak, L. Sutra, T. Heulin, J. M. Meyer, N. Fromin, S. Degraeve, R. Christen, et L. Gardan, « *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 9–18, janv. 2000.
- [17] M. Tani, C. Liu, et P. M. Huang, « Atomic force microscopy of synthetic imogolite », *Geoderma*, vol. 118, n° 3–4, p. 209–220, févr. 2004.
- [18] A. R. Badireddy, M. R. Wiesner, et J. Liu, « Detection, Characterization, and Abundance of Engineered Nanoparticles in Complex Waters by Hyperspectral Imagery with Enhanced Darkfield Microscopy », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 18, p. 10081–10088, sept. 2012.
- [19] R. M. Slawson, M. I. Van Dyke, H. Lee, et J. T. Trevors, « Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms », *Plasmid*, vol. 27, n° 1, p. 72–79, janv. 1992.
- [20] M. Wood, « A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications », *Plant and Soil*, vol. 171, n° 1, p. 63–69, avr. 1995.
- [21] A. Miyazaki, I. Balint, et Y. Nakano, « Solid-liquid interfacial reaction of Zn²⁺ ions on the surface of amorphous aluminosilicates with various Al/Si ratios », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 67, n° 20, p. 3833–3844, oct. 2003.
- [22] L. Denaix, I. Lamy, et J. Y. Bottero, « Structure and affinity towards Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ of synthetic colloidal amorphous aluminosilicates and their precursors », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 158, n° 3, p. 315–325, nov. 1999.
- [23] C. J. Clark et M. B. McBride, « Cation and anion retention by natural and synthetic allophane and imogolite », *Clays Clay Miner*, vol. 32, n° 4, p. 291–299, 1984.
- [24] C. J. Clark et M. B. McBride, « Adsorption of Cu (II) by allophane as affected by phosphate », *Soil science (USA)*, 1985.
- [25] M. N. Hughes et R. K. Poole, « Metal speciation and microbial growth--the hard (and soft) facts », *Journal of General Microbiology*, vol. 137, n° 4, p. 725–734, avr. 1991.
- [26] C. E. Outten et T. V. O'Halloran, « Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis », *Science*, vol. 292, n° 5526, p. 2488–2492, juin 2001.
- [27] L. A. Finney et T. V. O'Halloran, « Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, n° 5621, p. 931–936, mai 2003.

**Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-
imogolites sur les réponses de *Pseudomonas*
brassicacearum.**

SOMMAIRE

Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-imogolites sur les réponses de *Pseudomonas brassicacearum*.....155

1 Contexte scientifique 155

1.1 L'effet du dopage en Fer de nanomatériaux sur les réponses biologiques..... 155

1.2 L'importance de la régulation du fer et les mécanismes cellulaires associés.... 156

1.3 Objectifs du chapitre..... 156

2 La synthèse de Ge-imogolites dopées en fer 157

2.1 Résumé étendu de l'article. 157

2.2 Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials. 159

2.2.1 Article..... 159

2.2.2 Conclusions 165

2.2.3 Supporting information 166

3 La modification des réponses de *Pseudomonas brassicacearum* exposées aux Ge-imogolites dopées en fer ou non. 168

3.1 Résumé étendu de l'article. 168

3.2 Iron-doping of Ge-imogolite inorganic nanotube; modulation of toxicity and afar biotransformation to bacteria in relation with iron homeostasis 170

3.2.1 Introduction 170

3.2.2 Materials and methods 172

3.2.2.1 Imogolite synthesis..... 172

3.2.2.2 Bacterial strain and culture..... 173

3.2.2.3 NPs exposure and bacterial growth..... 173

3.2.2.4 Toxicity mechanisms..... 173

3.2.2.5 Biodegradation and biodistribution..... 174

3.2.3 Results and discussion..... 175

3.2.3.1 Imogolite-bacteria interactions and toxicity..... 175

3.2.3.2 Iron homeostasis in bacteria exposed to imogolites..... 177

3.2.3.3 Fe-imo transformation in biotic and abiotic media. 179

3.2.3.4 ROS generation in *P. brassicacearum* exposed to imogolite..... 181

3.2.4 Conclusion..... 182

3.2.5 Supporting information 182

4 Conclusions du chapitre	184
Références bibliographies.....	185

Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-imogolites sur les réponses de *Pseudomonas brassicacearum*.

1 Contexte scientifique

1.1 L'effet du dopage en Fer de nanomatériaux sur les réponses biologiques.

Comme discuté dans le Chapitre IV (Effets de la morphologie des Ge-imogolites sur l'induction de toxicité, page 119), l'étude des caractéristiques des nanomatériaux (NM) qui induisent des toxicités est complexe. Concernant les HARN (pour l'acronyme anglais High Aspect Ratio Nanomaterials), il semble que leur rapport d'aspect (i.e leur longueur et leur diamètre) influe sur leur toxicité vis à vis des cellules eucaryotes [1]. Dans le cas des cellules procaryotes, nous avons montré dans le chapitre précédent que la toxicité des HARN n'est pas issue de la longueur des tubes, mais du nombre de sites réactifs (en bords de tubes ou sur les sites lacunaires). Une autre caractéristique des NM intéressante à étudier est la modification de leur composition chimique. En particulier, la présence de fer dans les échantillons des HARN semble modifier leur toxicité vis à vis des organismes exposés. Dans le cas des nanotubes de carbone (NTC), il a été démontré que la présence de fer modifiait leur toxicité sur des cellules eucaryotes en l'augmentant [2] ou en la diminuant pour de grandes concentrations d'inclusion structurale du fer (>1% masse) [3]. La grande diversité de métaux dans ces échantillons de NTC, du fait des solvants nécessaires à leur synthèse, ainsi que la grande diversité de morphologie des NTC imposent de nuancer les conclusions dans les études sur les mécanismes de réponse des organismes vivants à leur toxicité. Concernant les NM à plus faibles rapports d'aspect, l'influence du dopage en Fe (i.e. ; de l'inclusion structurale de Fe dans les structures) peut modifier la toxicité des NM envers les cellules. Ici encore, les expériences montrent des réponses biologiques différentes d'une étude à l'autre. Par exemple, le dopage en Fe de nano-ZnO induit une diminution de leur toxicité pour des cellules de macrophages [4], mais aucune modification de la toxicité pour plusieurs espèces bactériennes. [5] Enfin, le dopage en Fe de nano-TiO₂ montre une diminution [6] ou une augmentation [7] de la cytotoxicité de ces NM envers *Escherichia coli*.

Toutes ces études insistent sur la nécessité d'avoir **des échantillons de NM aux caractéristiques physico-chimiques contrôlés dont le dopage en Fe est bien caractérisé** afin de comprendre les modifications de toxicité dues au dopage en fer des NM.

De plus, un modèle biologique simple comme *P. brassicacearum*, dont **certaines voies de régulation du Fe clefs sont bien connues**, permettrait de faire le lien entre variation de la composition chimique des NM et modification des réponses biologiques.

1.2 L'importance de la régulation du fer et les mécanismes cellulaires associés

D'un point de vue biologique, la disponibilité du Fe dans l'environnement d'un organisme est critique pour son activité métabolique. Le fer est essentiel au développement cellulaire et à son bon fonctionnement, mais il est souvent non biodisponible dans les conditions classiques de croissance des organismes (pH neutre, aérobie). Aussi des stratégies d'acquisition du Fe ont été mises en place par les bactéries pour éviter leur carence en Fe. Dans le même temps, un taux élevé de Fe dans les cellules qui génèrent naturellement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) de type H_2O_2 et O_2^- pendant la respiration aérobie, peut induire la formation du radical hydroxyle (puissant oxydant) du à l'oxydation du Fe(II) par l' H_2O_2 via la réaction de Fenton. La régulation du niveau intracellulaire du Fe (on parle d'homéostasie du fer) est donc critique pour les cellules, et une régulation fine de l'acquisition, de l'utilisation et du stockage du Fe intracellulaire est vitale. Dans le cas de *Pseudomonas brassicacearum*, il est connu que ces bactéries sont émettrices de sidérophores pour l'acquisition du fer non biodisponible dans l'environnement. Les sidérophores sont des polypeptides de petites tailles (400-1000 Da) permettant la chélation du Fe(III) en dehors de la cellule, puis son internalisation et sa dissolution en Fe(II).

Enfin, dans plusieurs espèces bactériennes, l'homéostasie du Fe(II) est faite *via* le régulateur Fur (pour Ferric Uptake Regulator). Chez *P. brassicacearum*, cette régulation est indirecte et implique également deux ARN non codants (ARNnc) PrrF1 et PrrF2 [8]. Ces mécanismes sont présentés dans le Chapitre 1. Introduction.

Ainsi, l'utilisation des PrrF comme marqueurs de l'homéostasie du Fe dans les cellules de *P. brassicacearum* permettra de mieux comprendre les mécanismes des effets induits par les Ge-imogolites avec ou sans dopage en Fe.

1.3 Objectifs du chapitre

L'objectif de ce chapitre est d'utiliser les Ge-imogolites comme composés modèles pour étudier l'effet du dopage structural en fer sur leur toxicité vis-à-vis de *P. brassicacearum*.

Pour cela, deux étapes, présentées dans la suite de ce chapitre, ont été nécessaires.

La première a pour but de synthétiser et caractériser des Ge-imogolites avec et sans Fe. Cette étape a nécessité la mise au point d'un nouveau protocole pour (i) synthétiser ces nouvelles

structures et (ii) caractériser la quantité maximale de Fe possiblement incorporable dans la structure des Ge-imogolites.

La deuxième étape a pour objectif d'étudier les interactions entre les Ge-imogolites dopées ou non et *P. brassicacearum*. En particulier, caractériser le comportement du fer depuis l'étape de synthèse (spéciation du fer associé aux Ge-imogolites) jusqu'à son utilisation par la cellule (suivi de l'homéostasie du fer) est clé pour comprendre les mécanismes d'interaction des NM avec les cellules et les potentiels effets toxiques qui en découlent.

2 La synthèse de Ge-imogolites dopées en fer

2.1 Résumé étendu de l'article.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les Ge-imogolites sont de bons modèles pour synthétiser des NM à caractéristiques physico-chimiques variables, dans le but d'étudier les modifications de toxicité que cela induit. Afin d'observer l'influence de l'ajout de Fe dans les structures de NM sur les réponses cellulaires, nous avons dopé les Ge-imogolites en fer *via* la substitution structurale d'atomes d'Al par des atomes de Fe. Pour ce faire, la synthèse des proto-imogolites a été réalisée en ajoutant différentes concentrations de perchlorate de fer(II) à la solution de réactifs initiale. Aussi les conditions de synthèses étaient $C_{(Al+Fe)}=0,5\text{mol.L}^{-1}$, avec $n_{(Al+Fe)}/n_{Ge}=1,75$ et $n_{OH}/n_{(Al+Fe)}=2$. Le rapport $n_{Fe}/n_{(Al+Fe)}$ a été varié à 0 ; 0,02 ; 0,05 et 0,1 (nommés respectivement 0p, 2p, 5p et 10p dans l'article) pour étudier la quantité maximale de substitution des atomes d'Al par Fe. Cette phase de synthèse des proto-imogolites a été réalisée en condition anoxique afin d'éviter l'oxydation du Fe(II) qui entrainerait la précipitation de d'oxy-hydroxydes de Fe(III). La phase de croissance des proto-imogolites a ensuite été réalisée classiquement à l'étuve à 95°C pendant 7 jours. Les matériaux résultants ont été caractérisés par Microscopie à Force Atomique (AFM), Diffraction des Rayons X (DRX) et Spectroscopie d'Adsorption des rayons X (SAX) au seuil K du Fe.

L'ajout de Fe(II) dans la solution initiale avant hydrolyse ne modifie pas la morphologie des tubes formés. Leur longueur moyenne est d'une cinquantaine de nanomètres, et leur diamètre de 3,7 nm. De plus, la DRX réalisée sur ces Ge-imogolites montre des diffractogrammes caractéristiques de nanotubes double-parois (DW).

Aussi, pour de faibles ajouts de Fe(II) ($n_{Fe\text{ initial}}/n_{(Al+Fe)\text{ initial}}=0,02$), nous avons démontré par spectroscopie d'absorption des rayons X que le **Fe est structuralement incorporé** dans la paroi des Ge-imogolites, *via* le substitution de 1% des atomes d'Al par du Fe, sans

coprécipitation de phases secondaires tels que des oxy-hydroxydes de fer (pas de liaisons Fe-Fe observées). Cette substitution est **accompagnée de la présence d'un site d'Al vacant** dans le voisinage des atomes de Fe. Le modèle structural des Ge-imogolites dopées en Fe obtenu est présenté en Figure 1.

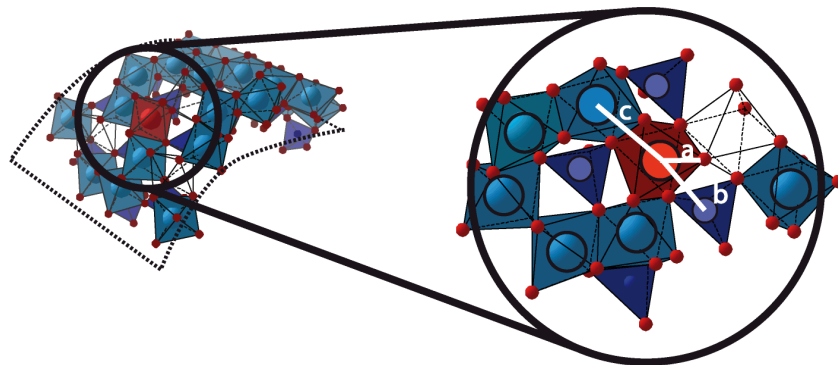


Figure 1 : Modèle structural d'une Ge-imogolite dopées en Fe (1% w/w). Les atomes de Fe (en rouge) se substituent aux atomes d'Al (en bleu). Chaque atome de fer est alors lié en moyenne à six atomes d'oxygène (en rouge) trois atomes de Ge (en violet) et deux atomes d'Al. Cette substitution induit la présence d'un site d'Al vacant (en pointillés).

A l'inverse, augmenter la quantité initiale de Fe(II) ($n_{\text{Fe initial}}/n_{(\text{Al}+\text{Fe}) \text{ initial}} = 0,05$ et $0,1$) induit un plus grand taux de substitution des atomes d'Al par du Fe, mais également la précipitation d'oxy/hydroxydes de fer.

Ces résultats ont fait l'objet **d'une publication en 2014 dans le journal *RSC Advances***.

Du fait de la précipitation de phases secondaires pour les plus fortes concentrations initiale en Fe, l'échantillon utilisé pour étudier l'effet du dopage des Ge-imogolites sur les réponses biologiques est celui synthétisé avec un rapport initial $n_{\text{Fe}}/n_{(\text{Al}+\text{Fe})} = 0,02$. Un échantillon de Ge-imogolite synthétisé dans les mêmes conditions mais sans fer a été utilisé pour comparaison ($n_{\text{Fe}}/n_{(\text{Al}+\text{Fe})} = 0$). Ces échantillons sont respectivement appelés Fe-Imo et Imo dans l'article présenté en partie 3, page 168.

2.2 Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials.

2.2.1 Article

Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials.

A. Avellan,^{a,b} C. Levard,^{a,b} N. Kumar,^{a,b} J. Rose,^{a,b} L. Olivi,^c A. Thill,^d P. Chaurand,^{a,b} D. Borschneck,^{a,b} A. Masion^{a,b}.

^a CEREGE, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, College de France, Europôle Méditerranéen de l'Arbois, BP80, 13545 Aix-en-Provence, France.

^b iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

^c ELETTRA, Synchrotron Light Source, 34012 Trieste, Italy.

^d CEA Saclay, IRAMIS, Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire, 91191 Gif sur Yvette, France

RSC Adv., 2014,**4**, 49827-49830

DOI: 10.1039/C4RA08840A

Nano(structured) products carry great promise for a number of application fields because of their potential specific properties. Implementation or enhancement of these properties requires manipulation of the materials at the molecular/atomic level to tailor size, shape and surface chemistry to given needs. Nanotubular objects are of particular interest since, at this scale, all (or nearly all) atoms are surface atoms, and thus potentially reactive. In this context, aluminogermanate tubes ($\text{Al}_2\text{GeO}_7\text{H}_4$) are attractive on multiple levels: these Ge-analogues of the alumino-silicate imogolite ($\text{Al}_2\text{SiO}_7\text{H}_4$) (hereafter referred to as Ge-imogolite) are obtained with a low temperature, aqueous phase nucleation-growth protocol.[9], [10] As opposed to the Si based tubes, Ge-imogolite is formed quantitatively from molar Al and Ge solutions.[11] Recent studies led to a better understanding of the formation mechanism and

improved control over tube length (approx. 10 to 1000 nm),[12] and tube structure (crystallinity,[13] single- (SW) vs. double-walled (DW) nanotubes).[14], [15]

Ge-imogolite is potentially well suited for a wide range of industrial applications (e.g. chemical sorption,[16]–[18] catalysis,[19]–[21] humidity control[22] and gas adsorption, separation and storage[23]–[25]). Some of these specific properties may be obtained only with prior surface functionalization of the tubes. For example, modifications of the inner wall can cause changes in the sorption properties, either by a better selectivity (e.g. CO₂ sorption enhanced by one order of magnitude),[26] or as side effect of tube diameter changes which increased the space between the imogolite fibers.[27] There have been attempts of substituting Al by Fe in the structure of Si-imogolite to obtain a modified reactivity.[21], [28] For instance, the addition of Fe(III) during the synthesis of Si-imogolite resulted in a modified imogolite with catalysis properties for the oxidation of organic compounds such as cyclohexane, toluene, benzaldehyde and chlorobenzenes.[21] Another example is enhanced removal of As(V) by an imogolite-magnetite hybrid.[28] However, the status of Fe atoms within the imogolite structure remains unclear.

The synthesis of by-product free, Fe-doped imogolite still remains a challenge. *Ab initio* computations suggested that a 5 to 10 % Al substitution by Fe in Si- or Ge-imogolite would reduce the band gap value from 4.6 to 2.6 and from 4.2 to 1.0 eV respectively,[29] thereby conferring semi-conductor properties to Fe-doped imogolite. The case of Ge-imogolite is particularly interesting because of the ease of selectively synthesizing large amounts of single- vs. double-walled nanotubes. However, there is no experimental evidence of Al substitution by Fe in Ge-imogolite in the literature. In the present study, we describe the successful synthesis of a novel Fe-doped Ge-imogolite, where iron is incorporated in the wall structure.

Fe-doped Ge-imogolite was obtained by modifying the synthesis protocol of iron free DW Ge-imogolite[11] as follows: under strictly anoxic conditions (N₂ filled glovebox), aluminum perchlorate and iron (II) perchlorate were mixed (total concentration 0.2 mol.l⁻¹) at molar ratios $n_{\text{Fe}}/n_{(\text{Al}+\text{Fe})}=0, 0.02, 0.05$ and 0.1 (hereafter referred to as 0p, 2p, 5p, and 10p respectively). Iron II was used to ensure the presence of dissolved Fe monomers for the nucleation process. Tetraethoxygermanium was added ($n_{(\text{Al}+\text{Fe})}/n_{\text{Ge}}=1.75$) to the solution. This ratio deviates from the theoretical value of 2 for a well crystallized system. Here, the strategy was to deliberately create octahedral vacancies to facilitate the incorporation of the larger Fe(II) cation into the gibbsite layer. The mixture was then slowly hydrolyzed with NaOH to a hydrolysis ratio ($n_{\text{OH}}/n_{(\text{Al}+\text{Fe})}$) of 2. The suspensions were incubated at 95°C and then dialyzed

(10kDa cutoff) against ultrapure water to remove dissolved salts. The formation of tubular structures was ascertained with AFM observations (Bruker INOVA). Chemical composition (Al, Ge, and Fe) was determined by ICP-AES (Horiba Ultima-C). Additional characterization was performed on freeze-dried subsets of the samples. X-ray diffraction patterns (PANalytical X'pert Pro) were recorded using a glass capillary sample holder. Extended X-Ray Absorption Fine Structure (EXAFS) is an element specific probe of the molecular environment of a given atom. Fe K-edge EXAFS spectra were collected in the transmission mode on beamline 11.1 at the ELETTRA synchrotron (Trieste, Italy). Calculated spectra were fitted to the experimental signal using the iXAFS software.[30]

AFM images obtained confirmed the presence of nanotubes within our samples. Typical AFM pictures of samples 0p and 2p are shown in Figure 1. Similar pictures were obtained for samples 5p and 10p (see Supporting Information.). Tube diameter distributions were similar for 0p and 2p sample (see Figure 2.C) but shifted towards larger values with increasing [Fe] (see S.I.).

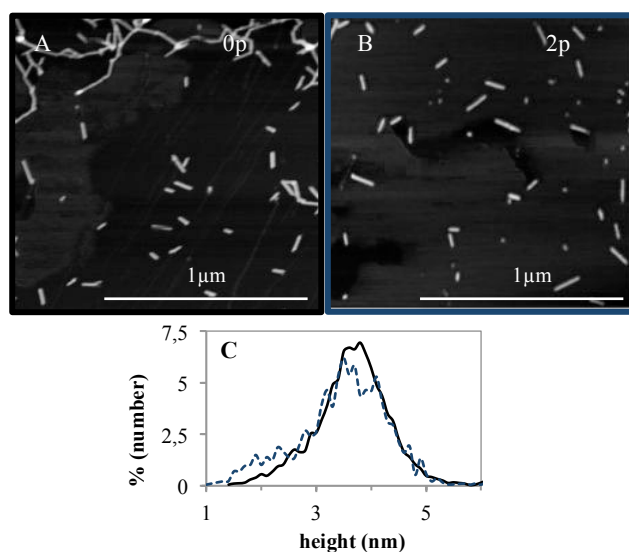


Figure 2: AFM observation in tapping mode for samples 0p (A) and 2p (B) and diameter height distribution (C): solid (sample 0p) and dotted line (sample 2p). Height distributions were obtained with ImageJ software[31], based on the analysis of a minimum of 200 nanotubes, aggregates excluded.

The lengths of tubes vary between 30 to 100 nm for each sample. Within the samples with the highest Fe concentrations (5p and 10p), large globular solids of about 100-200 nm height and 500nm length respectively were observed (see S.I.) and are assumed to be co-precipitated Fe oxy-hydroxides. The XRD patterns displayed the expected bands characteristic of the structure of well crystallized Ge-imogolite structure[13] (see S.I.) without additional features.

Table 1: Element recovery in the formed Ge-imogolite sample as measured by ICP-AES and corrected for non tubular solids (samples 5P and 10p) obtained using EXAFS LCF (see fig 4). Recovery rates are expressed as % of initial amounts X_0 .

Sam ple	Al _{tubes} / Al ₀ (%)	Fe _{tubes} /Fe ₀ (%)	Ge _{tubes} /G e ₀ (%)	Al+Fe/ Fe in tube (%)	in (%)
0p	73	0	88	1.6	0
2p	85	48	84	1.7	1
5p	65	29	70	1.6	2
10p	75	31	73	1.7	3

The $n_{(Al+Fe)}/n_{Ge}$ ratio of 1.6 for the iron free sample (Table 1) indicates the presence of octahedral vacancies in the wall structure as expected. In the sample with the lowest Fe concentration, the examination of the coordination environment using EXAFS spectra analysis revealed that no Fe II is left in the samples. Indeed typical Fe(II)-O distances are around 2.10 Å; however for sample 2p, the ligand sphere of iron consisted of 6 O atoms at 1.99 Å (Figure 3, Table 2), which is indicative of an octahedral coordination of Fe(III). Oxidation of the initially introduced Fe(II) most likely occurred during the incubation phase, i.e. when the containers, although closed, were removed from the anoxic environment to be placed in the oven. Chemical analyses (Table 1) indicated that only half of the initially introduced Fe was recovered in the formed tubes.

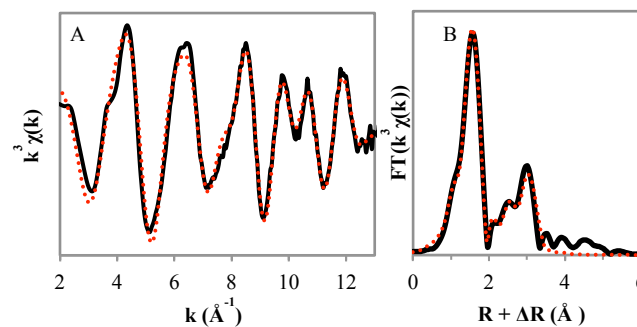


Figure 3: EXAFS spectra $k^3\chi(k)$ (A) and Fourier transform (B) of 2p sample at Fe-K edge. Experimental (solid line) and calculated signal (dotted lines) (see table 2 for fitting details).

The second coordination shell around Fe was fitted with 2.1 ± 0.3 Al atoms at 2.96 ± 0.01 Å (Table 2). This result demonstrates that Fe is incorporated into the structure of Ge-imogolite. The N_{Al} coordination number is significantly lower than the theoretical 3 Al neighbors in the case of an isomorphic substitution in a well crystallized system. In our case however, the initial Al+Fe/Ge ratio was deliberately set below 2 in order to create tube-wall defects capable of accommodating the larger Fe(II)O₆ octahedron (FeII-O: 2.12 Å vs. 1.88 Å for Al-O).[32]–[34] The measured $n_{(Al+Fe)}/n_{Ge}$ ratios in the final products were below 2 as expected (Table 1),

indicating the presence of octahedral vacancies in the wall structure for all samples. The Fe(III) in the final tubes is adjacent to a vacant site.

Table 2: Structural parameters for sample 2p derived from R-space fitting (from 1.052 to 3.360 Å) using theoretical Fe-O, Fe-Al and Fe-Ge paths generated by FEFF6.2. Amplitude factor= 0.77 $\pm$ 0.03 and $\Delta E = -2.80 \pm 0.52$; Chi-square: 1071, reduced Chi-square: 82, R-factor: 0.014. R_x (Å): interatomic distance; N_x : number of neighbors; σ_x (Å): Debye Waller factor.

Fe-O shell			Fe-Al shell			Fe-Ge shell		
R_O (Å)	N_O	σ_O (Å)	R_{Al} (Å)	N_{Al}	σ_{Al} (Å)	R_{Ge} (Å)	N_{Ge}	σ_{Ge} (Å)
1.99 ± 0.01	6.0 ± 0.2	0.07 ± 0.02	2.96 ± 0.01	2.1 ± 0.3	0.05 ± 0.03	3.34 ± 0.01	3.1 ± 0.33	0.08 ± 0.03

It is likely that iron is incorporated into the tube wall structure in the form of Fe(II) cations during the initial nucleation phase under anoxic conditions. In this context, the present data suggest that i) Fe(II), which requires more than 10% additional space compared to Al(III), is added into pre-existing wall defects with the size of two neighboring Al vacancies, or ii) the nucleation around Fe(II) proceeded no further than 2 Al neighbors so as to avoid structural constraints, iii) or both. The oxidation of iron during the incubation phase eases steric constraints due the smaller size of the Fe(III) octahedra. The formation of 3 Fe-O-Al linkages with subsequent bond breakage during oxidation, as well as the exchange of a structural Al with a Fe octahedron are unlikely to form from an energy point of view. Figure 4 shows a tentative structural model of the Fe-doped Ge-imogolite derived from the present data. The absence of Fe-Fe contribution indicates the absence of Fe clusters/polymers, which suggests that all the detected iron is within the imogolite structures; this translates to a substitution level of about 1% (Table 1).

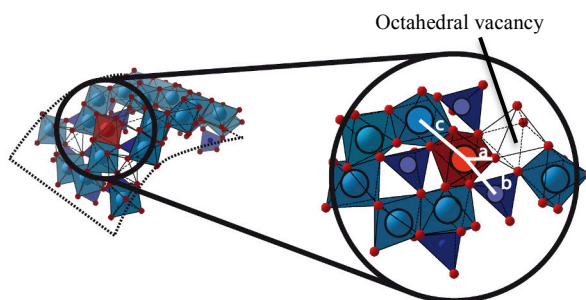
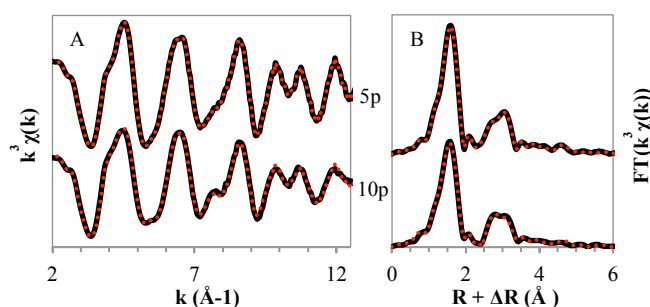


Figure 4: Model of Ge-imogolite with structural substitution of Al by Fe and interatomic distances: (a) Fe-O = 1.99 Å; (b) Fe-Ge = 3.34 Å (c) Fe-Al = 2.96 Å;. Generated by using the CrystalMaker software. (blue: Al; purple: Ge; red: O; gold: Fe)

At higher Fe content (samples 5p and 10p), shell fitting as performed previously with 2p sample yielded poor results. Adding a Fe-Fe contribution did not improve the fits to a satisfactory level. The obtained high values of chi-square and sigma suggest a complex multi-

phasic system certainly due to the precipitation of iron oxy-hydroxide. This hypothesis is consistent with the observation of globular phases on the AFM pictures (see S.I.). To get a more detailed view of the Fe speciation in these systems, linear combination fitting (LCF) was performed using the spectrum of sample 2p as reference for Fe containing imogolite (i.e. assuming that the coordination environment of Fe within the tube structure does not evolve with Fe concentration), and the following model Fe-phases: poorly ordered ferrihydrite, 6L-ferrihydrite, magnetite, lepidocrocite, maghemite, nontronite and goethite. The best fits were obtained with combinations of the Fe-doped Ge-imogolite and 6L-ferrihydrite (Fig. 4). Adding additional Fe compounds did not improve the fit.



Sample	% Ge-imogolite 2p	% Ferrihydrite6L	R-factor	Chi squared
5p	86	16	0.0045	10.32
10p	60	40	0.0062	10.05

Figure 5: Linear combination fitting of samples 5p and 10p and its results. A: EXAFS spectra $k^3\chi(k)$; B: Fourier transform. Solid line: experimental; dotted line: calculated.

Ferrihydrite is a minor species for sample 5p, but accounts for 40% of the signal when the Fe concentration is doubled. This non linear increase of the proportion of 6L ferrihydrite in the system may be the consequence of a "saturation" of the available sites (although octahedral vacancies are still detected at the highest Fe concentration) and/or slow Fe incorporation. The Al substitution levels calculated from the LCF proportions and ICP measurements indicate that the Fe incorporation increases with the initial iron concentration (Table 1). However one needs to keep in mind that the values for the two highest Fe concentration are no more than crude estimates because of the imprecision of LCF fitting and the assumption that the Fe binding environment, and in particular the value of N_{Al} , is constant irrespective of the Al substitution level. Whether Fe addition into pre-existing wall defects or Al polymerization around Fe is the prevailing incorporation mechanism, the present data suggest that the proportion of structural Fe within the tube may be increased beyond the 3% measured here, although it is questionable if significantly higher proportions can be achieved since the incorporation of Fe does not increase linearly with the concentration. Factors controlling the

maximum proportion of Fe within the tube are probably the size difference between the FeO_6 and AlO_6 octaedra potentially causing lattice strain and/or the deficit of charge in the initial nucleation stage caused by the substitution of an Al^{3+} by a Fe^{2+} . Both can potentially lead to growth inhibition above a certain substitution rate. From an engineering point of view, however, increasing the Fe proportion is useful only if a cost-effective separation of the tube from the Fe oxy/hydroxide by-products is possible.

The chemical analysis revealed another interesting feature: not all the introduced Fe are recovered in the precipitated solids (Table 1). A similar phenomenon has been reported previously during the synthesis of Fe free Ge-imogolite where unreacted Al represented approx. 30% of the initial concentration;[35] in the present work this proportion was in a ca. 15-35% range. For Fe, the proportion of unreacted metal cation appears to be even larger (in order of 50%). As opposed to Al, it is very unlikely that the "missing" Fe is in monomers form. Our results suggest that the Fe clusters formed at low Fe concentration are smaller than the cutoff size of the dialysis membrane. However the size of these Fe phases increases with the concentration as demonstrated by the increasing proportion of non-imogolite phases in the recovered solids.

2.2.2 Conclusions

Novel Fe-doped Ge-imogolite nanotubes were obtained in large amounts with a simple one step synthesis in aqueous systems. Fe is incorporated in the structure by occupying octahedral vacancies in the curve gibbsite layer. Tubes 1% Fe doping were obtained by-product free. Higher levels of Fe incorporation were achieved at the cost of co-precipitation of Fe (oxy)hydroxides which complicates the purification process. The present results demonstrate the potential of inexpensive synthesis protocol for obtaining nanotubular structures with a variety of compositions adapted for specific applications.

2.2.3 Supporting information

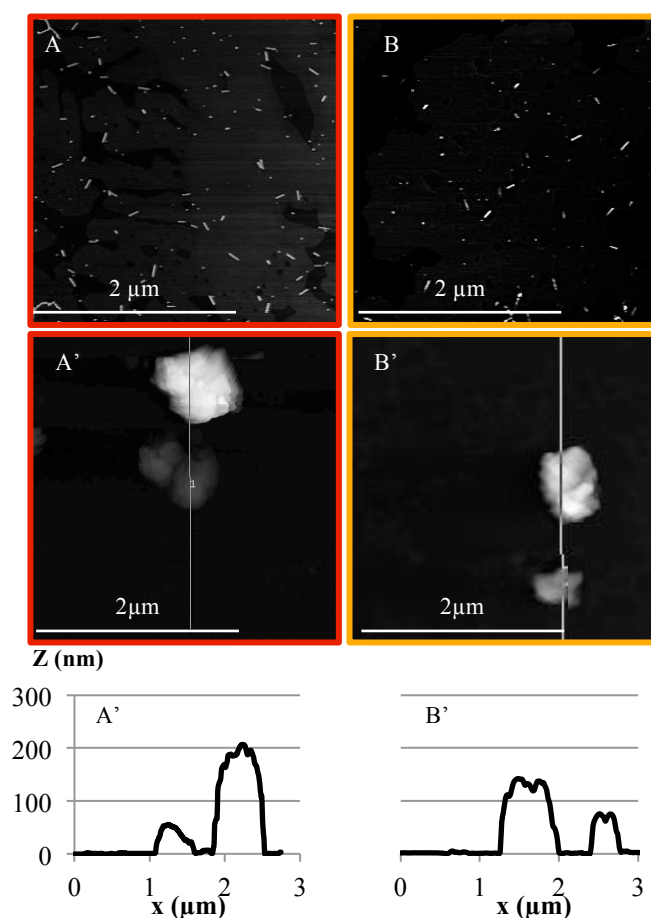


Figure 6: Typical atomic force microscopy images of 5p (A) and 10p (B) samples, large particles observed and their respective cross-section (A' and B')

These large particles about 50 to 200 nm height and 500nm length are suspected to be precipitated iron oxo/hydroxides identified from EXAFS linear combination fit.

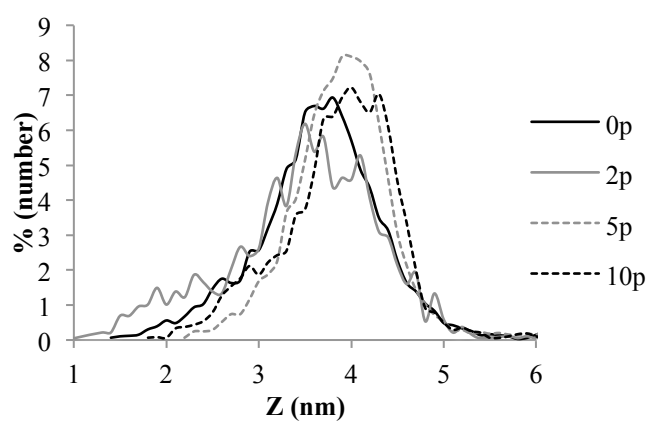


Figure 7 : Tube diameter distributions from AFM data (> 100 tubes, excluding aggregates).

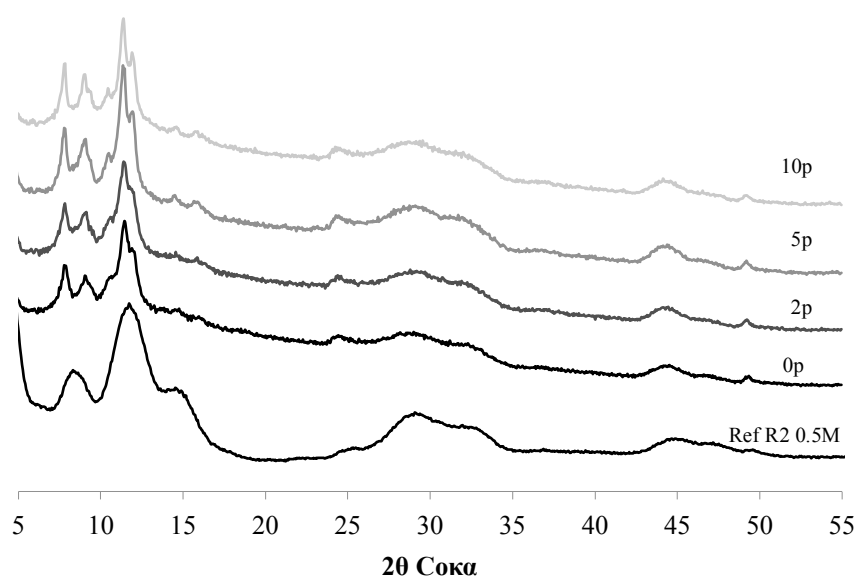


Figure 8: X-ray diffraction patterns of 0p ; 2p ; 5p and 10p Fe-Ge samples compared to DW- Ge imogolite model compounds (R2 0.5M) published in Levard *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011.

XRD results were compared to the diffractogram of a DW Ge-imogolite sample previously characterized by XAS in Levard *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011 used as model compound. The highly defined peaks observed for this sample could be due to a bundle organisation of the nanotubes.

We do not see any differences between imogolite without iron (0p) and samples with (2p, 5p, 10p).

Fe oxy/hydroxide were not detected on our XRD pattern, presumably because of their insufficient amount and/or amorphous structure.

3 La modification des réponses de *Pseudomonas brassicacearum* exposées aux Ge-imogolites dopées en fer ou non.

3.1 Résumé étendu de l'article.

Les effets qu'induisent les Imo ou les Fe-Imo chez la souche NFM421 de *P. brassicacearum* ont été étudiés en cultivant les bactéries dans un milieu pauvre en fer (CAA) et en les exposant aux Ge-imogolites en suivant deux scénarios : le contact direct (CD) ou le contact indirect (CI) dans lequel les Ge-imogolites sont isolées des bactéries en les plaçant dans une membrane de dialyse (porosité de 10 kDa). Les réponses des bactéries à ces expositions ont été étudiées en suivant (i) la modification de la croissance (par décompte CFU) et les interactions NM-bactéries en utilisant la microscopie en champ sombre couplée à de l'analyse hyperspectrale (HIS), (ii) la régulation de l'homéostasie du fer dans les cellules en suivant les modifications de la transcription de *prfF1* (iii) la biodégradation des NM (grâce à la mesure des concentrations des éléments en solution) et (iv) l'accumulation de ROS dans les cellules (en utilisant une sonde fluorescente).

Cette étude montre que le dopage en fer affecte significativement la croissance des bactéries. En effet, en l'absence de Fe dans la structure, les **Imos entraînent une diminution** de la croissance bactérienne alors que **les Fe-Imo induisent l'augmentation** de la croissance de *P. brassicacearum*.

Nous avons observé que cette diminution de croissance n'était induite que s'il y avait un contact direct avec les Imo. D'ailleurs les Imo et les bactéries sont colocalisés dans des hétéroagrégats. Cette absorption des Imo en surface de *P. brassicacearum* est corrélée à une plus grande génération de ROS associée au relargage (ou à l'arrêt de l'acquisition) du fer hors du cytoplasme des bactéries. La diminution du niveau de Fe dans la cellule permet certainement aux bactéries de se protéger d'un éventuel stress oxydant lié à la réaction de Fenton.

A l'inverse, l'augmentation de la croissance des bactéries en présence de Fe-Imo est induite même si le contact avec les bactéries est évité. En suivant les quantité de Fe dans les tubes, dans le milieu de culture, ainsi que les cellules (indirectement *via* le suivi de l'homéostasie du Fe dans les cellules), nous avons mesuré que les Fe-imo ne contiennent plus que 10% de leur quantité de Fe initiale lorsque les bactéries sont présentes (même à distance), ce qui n'est pas observé en milieu abiotique. Cette récupération du Fe par les bactéries est corrélée à un

plus haut niveau de Fe intracellulaire, et explique l'augmentation de la croissance des bactéries en présence de Fe-Imo.

Puisque ce processus est observé même lorsque le contact entre les bactéries et les Fe-imo est évité, nous avons émis l'hypothèse que le **Fe dans les Ge-imogolites est chélaté à distance via les sidérophores** émis par les bactéries. Les Fe-Imo, dont la dégradation n'augmente pas dans le milieu de culture abiotique par rapport aux Imo, sont **dégradées à 40%** après exposition aux bactéries du fait de la chélation du Fe par les sidérophores et donc de la déstabilisation de leur structure.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de préparation, pour soumission au journal Environmental Science & Technology que vous trouverez dans la partie suivante.

3.2 Iron-doping of Ge-imogolite inorganic nanotube; modulation of toxicity and afar biotransformation to bacteria in relation with iron homeostasis

Iron-doping of Ge-imogolite inorganic nanotube; modulation of toxicity and afar biotransformation to bacteria in relation with iron homeostasis

Ge-imogolite nanotube, iron-doping, *Pseudomonas brassicacearum*, biodegradation, siderophore, HIS, ncRNA PrrF1, iron homeostasis.

In prep for submission to Environmental Science & Technology.

3.2.1 Introduction

Linking nanomaterial (NM) physico-chemical properties to specific biological hazard is the key to predict and reduce their potential impact toward the environment. [36]–[39] With the discovery of the high toxic potential of asbestos, attention has been given to the monitoring of fiber-shape nanotoxicity induction. Indeed, studies of high-aspect-ratio nanomaterials (HARNs) –for example carbon nanotubes (CNT), nanorods or nanowires- have pointed correlations between toxicity toward eukaryotes cells and their aspect ratios. [2], [40], [41] Chemical composition, and in particular iron (Fe) structural content, modulates the toxicity. Fe in CNT samples led to the generation of Fe-mediated reactive-oxygen species (ROS) in mammalian cells and thus of toxicity. However the mechanisms were not understood due to the diversity of metal contaminants in CNT samples. [2] Structural incorporation of Fe in asbestos at low Fe level (down 0.67% wt) lead to a high structure disorder, the generation of ROS and a high cytotoxicity. However, radical activity decreased upon increasing Fe-content (to 1.78% wt) due the number of reactive sites reduction. [3] Both these studies emphasized the importance of using well-defined NM sampled for Fe-doping effect analyses.

Concerning NM with a smaller aspect ratio, effects of structural Fe-doping is often paradoxical. For instance, Fe-doped ZnO were shown to be as toxic as the non-doped nano-ZnO for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [5]. On the contrary, Fe-doped nano-ZnO cytotoxicity was lower than the non-doped ZnO towards macrophage cells. [4] A possible explanation is the affectation of the dissolution rate of the NM due to Fe doping, and the

subsequent release of potentially toxic Zn^{2+} . Moreover, Fe-doped TiO_2 NM has been shown to be either non-toxic [6], or cytotoxic toward *E. coli*. [7].

In most studies, Fe-doping modulates the toxicity of NM, but the mechanisms, biodistribution, and biotransformation could not be elucidated. This points out the need of using models NM with accurate control of Fe-doping to study potential specific effects. A simple biological model, as bacteria, with robust indicators of Fe regulation (homeostasis) in cells is also required.

From a biological standpoint, Fe is an essential nutrient for life that is implied in many biological processes. In bacterial metabolism, Fe is used in many enzymatic reactions (as in the Krebs cycle, nitrogen fixation or in DNA and metabolites synthesis). [42], [43] Fe bioavailability is then critical for bacterial growth. Some microorganisms uptake hemic Fe [44] or even directly ferrous Fe [45], while under Fe-limiting conditions others produce Fe chelators known as siderophores. Siderophores are low molecular weight polypeptides (400-1000 Da) with a high affinity for Fe. They are implied in Fe(III) chelation transport, internalization and solubilization within cells [46]. In the meantime, Fe can be a source of hazard for microorganisms because of the Fe(II) -triggered Fenton/Haber-Weiss reaction. During this reaction, Fe(II) oxidation into Fe(III) produces ROS such as the highly reactive hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$). Therefore, a fine regulation of Fe level within the cell is needed to promote growth, without being toxic for cells through the production of ROS. Fe homeostasis involves complex genetic regulation that have been partly elucidated in several bacteria species. In most cases, the Fur (Ferric Uptake Regulator) protein as been identified as a regulator of genes encoding for Fe uptake [47], Fe-using proteins [48] or protection against oxidative stress [49]. Recently, it was shown for *Pseudomonas* species that this Fur regulation is indirect and occurs *via* the repression of the non-coding RNAs (ncRNA) PrrF1 and PrrF2. [47] Consequently, *prrf1* and *prrf2* genes are transcribed in bacteria during Fe starvation. [8], [47], [50], [51]

Our study aims at elucidating the effects of NM Fe-doping on its toxicity to bacteria. As a model NM, we used Ge-imogolite nanotubes that are analogues of naturally occurring alumino-silicate nanotubes. These Si-imogolites are implied in the carbon cycle and in trace element mobility in andosols. [52], [53] However, the difficulty of synthesizing Si-imogolite in large quantities[11] orientated the studies towards the use of their analogues Ge-imogolite for ecotoxicity tests.

Ge-imogolite nanotubes are made of dioctahedral Al layer in the outside, and tetrahedral Ge sites in the inside. These nanotubes are a good model for ecotoxicity studies, since their synthesis is made in water and by-product free. Moreover, understanding of the formation mechanisms allows to vary one at a time the length [54], the diameter [14] or the structural defects [13] of this Ge-imogolites only by varying the initial reactant concentrations. Moreover, Ge-imogolites have already been used as a model to study the effect of their length variation toward epidermal cells [55] and the effect of diameter variations on mice lungs. [56] Concerning our study, Fe-doping of imogolites (Fe-imo) was recently achieved by structurally substituting 1% of Al atoms by Fe. [57] To observe the effects on toxicity due to this slight modification in imogolite chemistry, we used *Pseudomonas brassicacearum* (NFM421 strain). *P. brassicacearum* is a Gram-negative soil bacteria, isolated from the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*, where it is the dominant culturable bacteria. [58] These bacteria are perfectly relevant for this study as an environmental model for which the main mechanisms of Fe uptake and homeostasis have been identified. Indeed, *P. brassicacearum* can secrete siderophores. [59] Moreover, *prrf1* and *prrf2* genes encoded in *P. brassicacearum* genome have recently been described (data not published). In view of finely understand Fe-doping imogolite effects on *P. brassicacearum*, bacterial growth, ROS generation, Fe homeostasis, biotransformation and biodistribution were studied using a multidisciplinary approach.

3.2.2 Materials and methods

3.2.2.1 Imogolite synthesis

Ge-imogolite and 0.46 % (w/w) Fe-doped Ge-imogolite nanotubes (called respectively imo and Fe-imo) were synthesized, dialyzed and characterized by X-Ray Absorption Spectroscopy (XAS), X-Ray Diffraction (XRD), Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and Atomic Force Microscopy (AFM). [57] Tetraethyl orthogermanate was added to an aluminum perchlorate solution (imo synthesis) implemented with Fe perchlorate (Fe-imo synthesis). The $([Al]+[Fe])/[Ge]$ ratio was set at 1.75, with an initial $[Al]+[Fe]$ concentration of 0.5 mol.L^{-1} . Al, Fe and Ge were slowly hydrolyzed by the addition of a 0.5 mol.L^{-1} NaOH, a growth step was performed at 95°C for seven days and the resulting suspension was dialyzed in ultrapure water.

The synthesis resulted in imogolite nanotubes of about 70 nm in length and a diameter of 3.5 nm. Fe was structurally incorporated within the Fe-imo structure, substituting 1% of the aluminum atoms, as confirmed by EXAFS at Fe K-edge. This led to the creation of Al vacant sites in the Fe neighborhood. No co-precipitated forms of Fe (as Fe oxy/hydroxide) were

found in the Fe-imo suspension. More details about imo and Fe-imo synthesis and characterization are available in Avellan *et al.* (2014). [57]

3.2.2.2 Bacterial strain and culture

P. brassicacearum wild type NFM421 [58] were used to obtain NFM421 ::*rfp* that were genetically tagged with the red fluorescent protein (rfp) using a minTn5 cassette. This strain was used in previous study [59], and no modification in bacterial physiology was observed. NFM421 ::*rfp* harbouring transcriptional *prfF1-gfp* fusion was obtained by inserting the pOT1e plasmid [60] presenting a gene coding for the green fluorescent protein (gfp) under the regulation of *prfF1* promoter region. Green fluorescence of the bacteria should then be directly related to the level of *prfF1* transcription. [61]

Strains from frozen stock (-80°C) were grown on tenfold diluted tryptic soil broth, solidified with 15 g.L⁻¹ agar (TSA 1/10). A single colony was then suspended in ten-fold diluted tryptic soil broth media (TSB 1/10) at 28°C, 150 rpm, until a concentration of 1.10⁹ bacteria.mL⁻¹ was reached to be used as a pre-culture.

3.2.2.3 NPs exposure and bacterial growth

The pre-culture suspensions were diluted at a concentration of 1.10⁷ bacteria.mL⁻¹ into the Fe limited casaminoacid (CAA) culture medium (5g.l⁻¹ casamino acids, 1.18g.l⁻¹ dipotassium phosphate and 0.25g.l⁻¹ magnesium sulfate). These bacteria were then exposed to 50mg.L⁻¹ Imo or Fe-imo, 100μmol.L⁻¹ FeCl₃, or not exposed (control group) using different scenarios:

- Direct contact (DC): cultures were made in (i) 200μl in 96-well microplates (Greiner 96 flat bottom black polystyrene) for following bacterial growth or *prfF1* transcription or (ii) in 150ml erlenmeyer vessels for chemical analysis studies.
- Non direct contact (NDC): Imo or Fe-imo were mixed in 10 ml CAA media and placed into a dialysis bag (DB) of 10 kDa pore size. This bag was then immersed into 140 ml of CAA solution containing bacteria.

Cultures were incubated at 28°C, 150 rpm for 24h. All experiments were performed in triplicate.

Bacterial growth was followed by counting the Colony Forming Units (CFU) and by measuring suspension adsorption at 600nm (as a control of the CFU).

3.2.2.4 Toxicity mechanisms

Iron homeostasis

Fe homeostasis was evaluated by following *prf1* transcription modulations using the strain of NFM421 ::*rfp* harbouring transcriptional *prf1-gfp* fusion, in both the DC and NDC scenario. Green fluorescence of each sample (λ_{ex} : 473nm; λ_{em} : 510nm) was measured using TECAN i-control spectrofluorimeter and was normalized by the number of CFU.mL⁻¹. The green fluorescence intensity per cell was then expressed as a percentage of the control group.

Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS accumulation in cells was semi-quantified using the non-fluorescent DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) probe. Pre-cultures of NFM421 ::*rfp* were centrifuged at 12 000×g for 2 min, washed 3 times with CAA and finally suspended in 500 µl CAA containing 500 µmol.L⁻¹ DCFDA.[62] The suspension was electroporated in a 1 mm width cuvette at 25 µF, 2.5 kV and 200 ohm for 5 ms (Multiporator, Eppendorf, Germany). The electroporated cells were divided into fractions, diluted to 10⁷ cells.mL⁻¹ in CAA and incubated with 25 mmol.L⁻¹ H₂O₂ (positive control), 50 mg.L⁻¹ of imo, 50 mg.L⁻¹ of Fe-imo, or 100 µmol.L⁻¹ of FeCl₃ at 28°C for 15 min.

When passing through the membranes, DCFDA acetate groups are removed by intracellular esterase. If cells contain ROS, the probe will be oxidized and will turn into the green-fluorescent form (DCF). Samples were then observed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV10i), where DCF (λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 527 nm) and RFP (λ_{ex} = 559 nm, λ_{em} = 569 nm) signals were monitored. At least 1000 red or green cells were counted on at least 5 different images using ImageJ 1.49 software.[63] DCF-labelled cells ratio were then calculated.

3.2.2.5 Biodegradation and biodistribution

Chemical analysis

The low Ge concentration in the growth medium allowed the use of this element as a reporter of imo and Fe-imo dissolution. NM inside the dialysis bag and culture in contact or not with bacteria were sampled. Overnight acid digestion was performed using HNO₃ 70% 3:1 (v/v) and stored at 4°C prior to analysis. Samples were then diluted with ultra-pure water and analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrophotometer (ICP-MS, NexION 350X, Perkin Elmer) for Ge and Fe concentration measurements.

Interaction studies

NM-bacteria interactions were studied using enhanced darkfield microscope (Olympus BX51) equipped with a CytoViva Hyperspectral Imaging System (HSI, Auburn, AL). A drop (20 µl) of sample was deposited on a clean glass slide and covered with a coverslip for imaging.

Pictures were made using 75% light magnification and 0.25s acquisition time per line. Hyperspectral signal acquisition was processed for each pixel following light absorption for wavelengths from 400 to 1000 nm with a 1.3 nm step. Each pixel thus contains information modulated by the nature of the material.[64] A hyperspectral library was build using pictures of NM in abiotic culture media after 24h. These libraries were used to process a spectral angle mapper (SAM) on pictures using a maximum angle of 0.085 rad. Analyses were performed using ENVI 5.1 software (exelis). Each pixel on pictures containing the nanoparticles hyperspectral signature was then labeled with a chosen color (red for Imo and green for Fe-imo). More information concerning hyperspectral library specificity and all the controls made are available in the supporting information (S.I., Figure S.1).

3.2.3 Results and discussion

3.2.3.1 Imogolite-bacteria interactions and toxicity

The growth of *P. brassicacearum* was measured by counting the colony forming units (CFU) per ml of culture after 24h exposure for the 2 scenarios (DC and N.D.C) (Figure 9). Bacteria were cultivated in CAA, which is a Fe-limited media, for 24h. We observed one order of magnitude difference between the two controls. Indeed, adding FeCl_3 improved Fe content in the media, potential bioavailable Fe for the bacteria, and thus bacterial growth. [65]

Bacterial growth was modulated by the NM and the scenarios chosen. When direct contact occurred with Imo, *P. brassicacearum* growth was reduced by an order of magnitude vs controls, while no significant inhibition was observed in the NDC setup. This suggests that the adsorption of imo on bacterial cells may damage membranes or lower growth rate by impairing bacterial physiology. This is consistent with previous studies, arguing that NM toxicity occurs in case of close contact between NM and cells. [38], [66]–[68] Enhanced dark-field microscopy coupled to Hyperspectral imaging (HSI, Figure 10) confirmed the interaction between bacteria and imo. Indeed, we observed that imo and bacteria formed hetero-aggregates.

In the NDC setup, the growth of bacteria exposed to Fe-Imo was not significantly affected as compared to the control grown in enhanced-Fe media ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ of FeCl_3). Unlike the Imo system, bacterial growth was not significantly affected compared to the control (FeCl_3) in the DC setup. Indeed, if bacterial growth decreased when bacteria were directly exposed to Imo, it increased when directly exposed to Fe-imo. Moreover, similarly hetero-aggregates of Fe-imo and bacteria were observed using HSI (Figure 10). This indicates that the differences observed in bacterial growth between Imo and Fe-imo setups were not due to changes in

interactions between cells and NMs. However, there were differences between spectral signatures of imo vs Fe-imo (Figure 10(a) and (b)). Indeed, the intensities of the spectral libraries are much higher and more heterogeneous in the case of imo than Fe-imo. As already explored in the literature, these could be because of differences in size, in aggregation states or in element adsorption. [64] Viewing the length and height repartitions made with AFM [57] there is no significant change in length and height size repartition. It is then likely that the differences in spectral libraries observed are due to different aggregation states and/or adsorption of specific elements on its surface.

Those results point out different conclusions: (i) In presence of Fe, similar growth was observed regardless of the Fe origin and speciation (Fe-imo or FeCl_3 probably precipitated into FeOOH phases). This observation implies that the bacteria were able to use the Fe structurally incorporated in the Fe-imo. (ii) In the DC setup, the presence of Fe in the Fe-imo structure inhibits the toxicity that was observed in the Imo system. (iii) In the NDC setup, retrieval of Fe in Fe-imo-bacteria interaction was likely, as bacterial growth was identical than the FeCl_3 control.

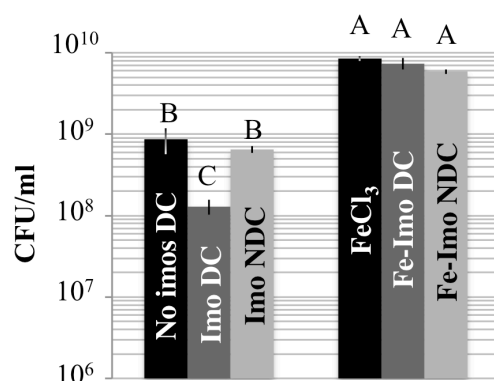


Figure 9: Bacterial growth in CAA media using CFU counting after 24h growth), exposed to 50 mg.L^{-1} imogolite (imo), Fe-imogolite (Fe-imo) or to FeCl_3 ($100 \text{ }\mu\text{Mol.L}^{-1}$). Contacts between the nanotubes and the bacteria were direct (DC) or non-direct (NDC). Groups showing different letters are significantly different. (ANOVA, followed by Tuckey's HSD test, $p < 0.05$). Error bars are confidence interval ($\alpha = 0.05$).

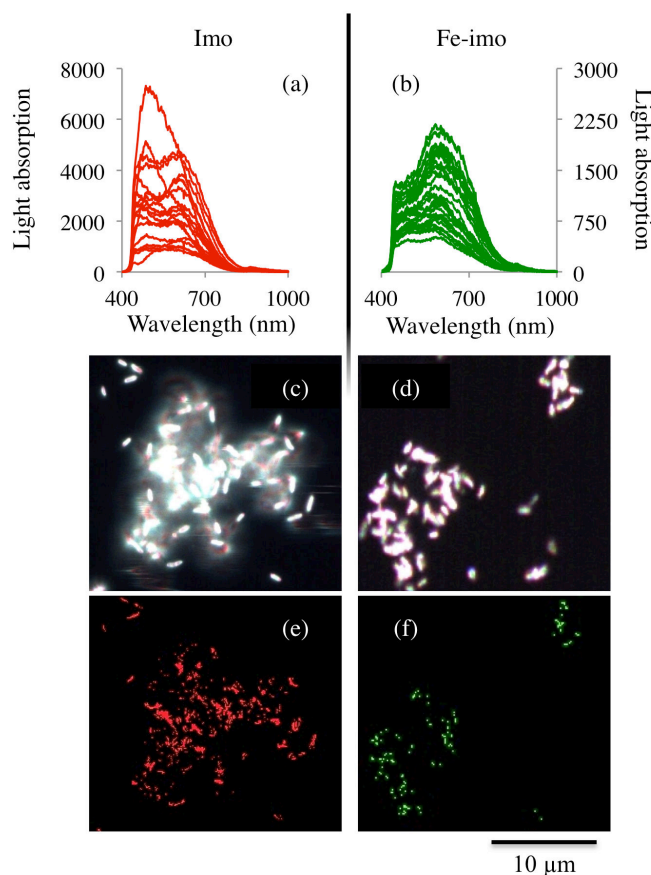


Figure 10: Hyperspectral imaging (HSI) of 50mg.L⁻¹ imo and Fe-imo in direct interaction with *Pseudomonas brassicacearum*. Images were acquired using 100X objective/1.3 oil iris. Scale bar is 10 μ m. Reference spectral libraries created from imo (a) and Fe-imo (b) in an abiotic culture media. Note that y-axis values are much lower in imo spectra than Fe-imo spectra. Hyperspectral scanned images of bacteria exposed to imogolites for 24h. (c) Localization of imo (e) and Fe-imo (f) with Spectral Angle Mapper (0.085rad). Illuminated pixels have spectral signatures identical to the respective spectral libraries.

Growth inhibition results suggest that Fe plays a key role in the toxicity of imo in *P. brassicacearum*. To go further in understanding of the interaction mechanisms, we examined Fe homeostasis in cells exposed (DC or NDC) to imo or Fe-imo.

3.2.3.2 Iron homeostasis in bacteria exposed to imogolites

Fe homeostasis in *Pseudomonas* species is dependent on the Fur binding protein and the ncRNA PrrF1 and PrrF2. PrrF1 and PrrF2 can be base-paired with specific genes promoters regions, inhibiting the transcription of genes encoding for non-essential Fe-using proteins consequently sparing the Fe. [48] Indeed, when Fe(II) content in the cell is high, Fe(II) will complex with the Fur protein. The Fe(II)-Fur complex represses the expression of genes required for Fe uptake, [48], [49] including genes *prrf1* and *prrf2*. [8], [47], [50] Consequently, the Fur protein represses the expression of *prrfs* under high Fe(II) content. At

the opposite, *prrf*s genes transcription is overruled under Fe limitation, leading to their expression. Thus, ncRNA PrrFs could be used as markers of Fe content in cells. We used the NFM421 *::rfp* harbouring transcriptional *prrf1-gfp* fusion strain, in which gene encoding for the green fluorescent protein (gfp) was under the regulation of *prrf1* promoter. Then, following the green fluorescence signal per cell indicates the modulations of *prrf1* promoter regulation (Figure 11).

Supplementing CAA media with 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of FeCl_3 led to a decrease in the GFP fluorescence per cell. FeCl_3 in this range of concentrations can be available for *Pseudomonas* species. [65] Then *prrf1* transcription was repressed when the Fe(II) concentration in the cell was high. This is consistent with the promotion of growth observed when adding FeCl_3 to the culture media. This confirms that *prrf1* expression is a good indicator of Fe(II) homeostasis in the cells.

Imo in ND contact had no effect toward the *prrf1* transcription modulation (GFP level per cell 90%). Interestingly, a slight increase of *prrf1* transcription occurred once the direct contact with bacteria and imo is not prevented. This suggests a lower intracellular Fe content. On the opposite, the exposure of bacteria to Fe-imo led to a drastic decrease of GFP fluorescence intensity, even if the direct contact was avoided. Then, Fe(II) concentration in the cells increased when Fe-imo were added to the system. Since Fe in the Fe-imo structure is the only Fe source, bacteria were able to take up the Fe atoms from the Fe-imo. This uptake occurred even if the Fe-imo were isolated from bacteria in a dialysis bag (NDC scenario) showing the uptake can occur remotely. Because CAA is Fe-limited, Fe uptake by bacteria led to an increase of bacterial growth. It is noteworthy that Fe was initially within the imogolite structure, and that no Fe-bearing secondary phases were present. [57]

Remote Fe uptake from the Fe-imo structure by *P. brassicacearum* can occur via two processes: (i) the dissolution of Fe-imo in the culture media as previously observed in the case of Fe-ZnO doping[5], or (ii) bacterial promotion of siderophores that chelate the Fe and transport it into the cells. Both processes suggest that bacteria are able to transform and alter the Fe-imo structure. To rule out which hypothesis is the most probable, degradation of the NM in both biotic and abiotic media was measured.

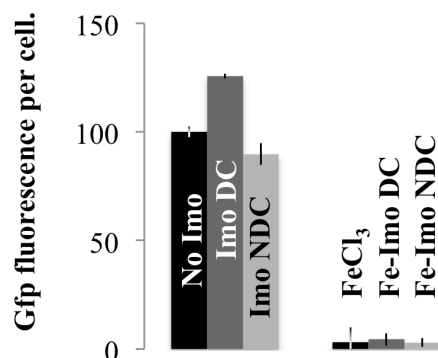


Figure 11: *Prrf1* expression modulation in NF421::*rfp* harbouring transcriptional *prrF1-gfp* fusion. Gfp signal was normalized by the number of bacteria per ml. Results are expressed in percentage of the control (No Imo). Bacteria were exposed to 50 mg.L⁻¹ of imo, Fe-imo following the direct (DC) or the non-direct contact (NDC) scenarios and to 100 µmol.L⁻¹ of FeCl₃ for 24h.

3.2.3.3 Fe-imo transformation in biotic and abiotic media.

The degradation of Fe-imo in both biotic and abiotic media compare to Imo were evaluated by ICP-MS when using the NDC scenario. Ge and Fe concentrations inside and outside the dialysis bag were followed and used as a degradation proxy. Further characterization of NM biodegradation was made with HIS (Figure 12).

In CAA culture media, initial Ge and Fe concentrations were low (around 5 and 1 µmol.L⁻¹, respectively). In abiotic media, Ge level outside the dialysis bag (DB) was about 13% for Imo and 8% for Fe-imo. For Imo, adding bacteria outside the dialysis bag did not change this degradation, with 11% of the Ge outside the DB. At the opposite, in biotic media Fe-imo was degraded for 36% of them. Interestingly, this Fe-imo degradation was associated with the release of 90% of the Fe outside the DB. This had not been observed in abiotic media.

These Ge and Fe concentration measurements highlighted that while Fe-imo was not degraded significantly in the abiotic culture media, adding *P. brassicacearum* led to a strong Fe-imo degradation (passing through the 10kDa membrane pores). Imogolites nanotubes still persisted inside the dialysis bag, but almost the totality of the Fe got outside the DB. This phenomenon is likely due to siderophore emission by bacteria. Siderophores emitted by the bacteria chelated the Fe(III) within the Fe-imo structure, passing through the dialysis membrane (10 kDa pore size) and bringing the Fe into the cells. This Fe uptake in NM by siderophore had already been described in studies looking at nano-hematite dissolution by bacterial siderophores. [69], [70] Indeed, a good indicator of the siderophore chelation power is the stability constant (K) of the Fe(III)-siderophore complex created with the Fe. The stability constant determines the metal(M)-(L)ligand bounds stability; and is calculated as follow : $K = [ML]/[M][L]$. Then, the measured stability constant of Fe(III)-siderophore was

32.5 for Desferri-ferrioxiamin [71] and even higher than 32 for catecholate siderophores (data only semi-quantified) [72]. As a comparison, the stability constant of Fe(III)-EDTA is 25.7. [71]

We studied the effects of Fe uptake on Fe-imo when in DC with bacteria, or in the dialysis bag analyzing Fe-imo hyperspectral signatures (Figure 12). In both scenarios we observed pixels having a signal contained in the Fe-imo hyperspectral library. However, in line with the degradation, some pixels having a signature similar to the Imo spectral library were also found. This confirms that part of the Fe is released from the imogolite while preserving its structure. It is important to note that the initial Fe-Imo exhibited a spectral signature different from the Imo one (see S.I. Figure S1).

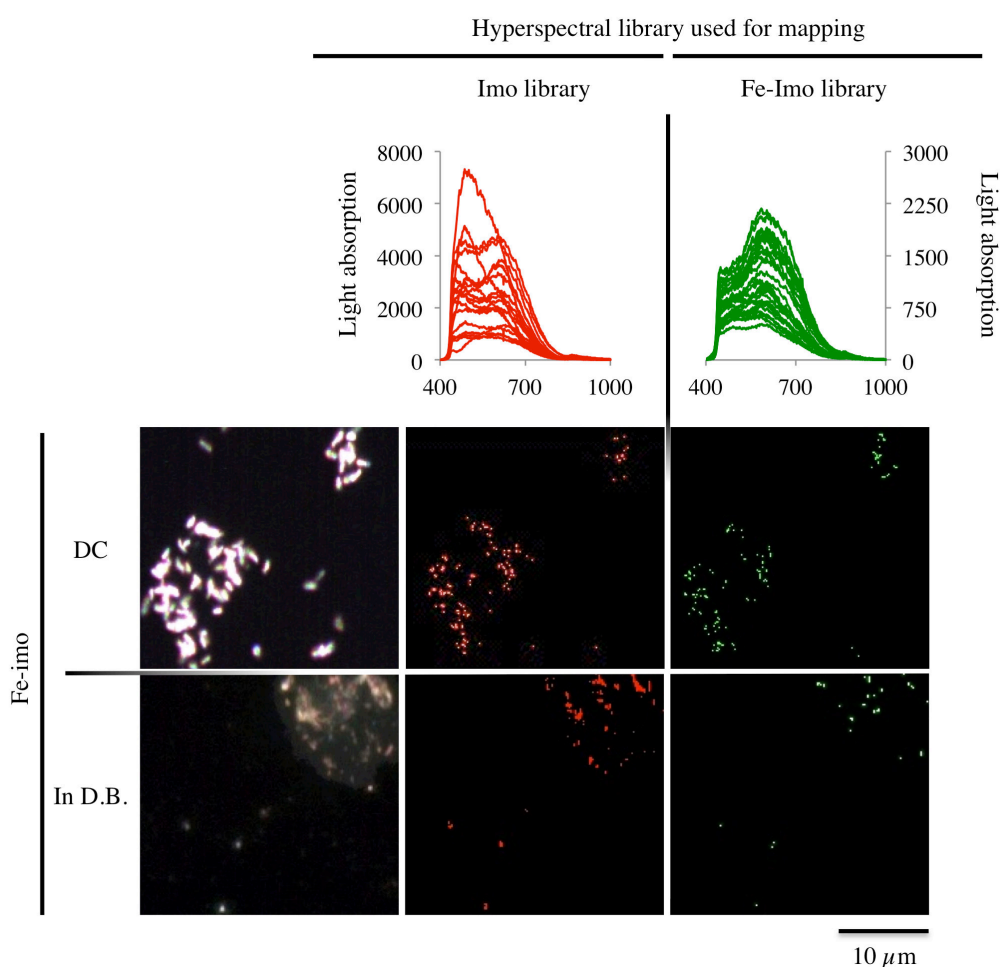


Figure 12: Fe-imogolite (Fe-imo) alteration after 24h exposure to bacteria following the DC and NDC scenarios. HSI of Fe-imo (i) in direct contact with bacteria (DC) or (ii) inside (In DB) and outside the dialysis bag (ODB). Hyperspectral library of imogolite (imo; in red) or of Fe-imo (in green) were used for spectral angle mapper analysis. Illuminated pixels show spectral signatures similar to imogolite libraries.

One previous study [57] looked at the atomic environment around the Fe atoms in Fe-imo using EXAFS at Fe K-edge. They observed that adding Fe atoms into imogolite structure led

to Al vacancy in its neighborhood due to longer Fe-Al distances than Al-Al distances. It is likely that these Al atoms missing in Fe neighborhood induce a lower chemical stability of the tubes. We hypothesized that Fe being chelated by the siderophores close to lacunar sites induced a Fe-imo breakage due to broken atomic Fe-O(H)-Al bounds. This led to the incongruent dissolution of Fe and to remaining non-doped imogolites.

3.2.3.4 ROS generation in *P. brassicacearum* exposed to imogolite

ROS accumulation was detected in *P. brassicacearum* cells by confocal microscopy, using the fluorogenic dye DCFDA. Viable cells were visualized by their RFP fluorescence while ROS accumulation in the cells was visualized as green DCF-labelled cells (Figure 13). 70 ± 7 % of the living bacteria treated with hydrogen peroxide (H_2O_2 , positive control) were green, meaning they contained ROS. Only 19 ± 3 % of bacteria cultivated in CAA without nanotubes (negative control) were DCF-labeled. After direct exposure to imo the number of bacteria containing ROS increased up to 50 ± 15 %. The addition of Fe in the system (coming from FeCl_3 or Fe-imo) led to a lower percentage of DCF-labeled cells (respectively 16 ± 5 and 15 ± 4 %). These results indicate that imo could induce ROS generation inside the cells when directly exposed to bacteria membranes.

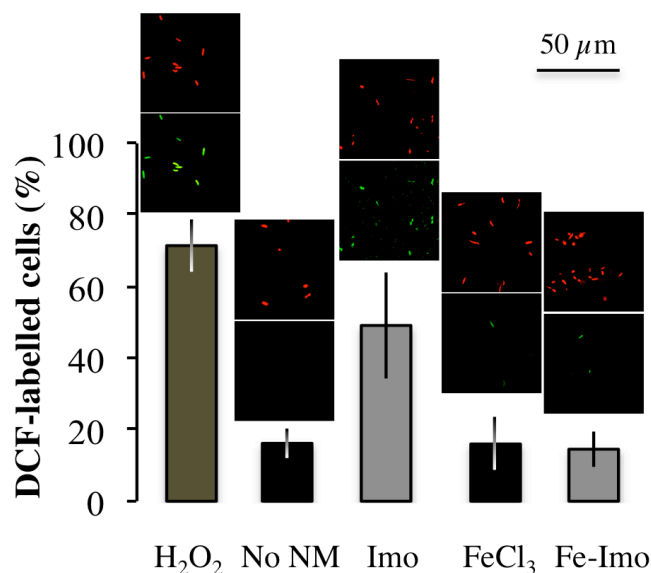


Figure 13: ROS semi-quantification inside bacteria using DCFDA probe. All bacteria produce rfp fluorescence (red). DCFDA becomes green in the presence of ROS. Bacteria exposed to $25 \text{ mmol.L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, 50 mg.L^{-1} of imogolites (DC) or $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1} \text{FeCl}_3$ for 15 min. Error bars are confidence intervals ($\alpha=0,05$).

This likely induced toxicity *via* oxidative stress which has already been observed in numerous other nanotoxicity studies [38], [73]. This conclusion is also supported by the higher expression of *prrf1* in bacteria exposed to imo. This could be consistent with a defense

mechanism against the ROS generation. Indeed, releasing Fe(II) outside the cell or stopping Fe(III) acquisition could protect the bacteria against more ROS accumulation due to the Fenton reaction. Interestingly, this ROS generation was not observed when Fe atoms were added to the imogolite structure, showing that the Fe doping can modulate the NM behavior towards bacteria and may deeply modify their fate in the environment.

3.2.4 Conclusion

This study demonstrates the power of using ncRNA as PrrFs to follow instantaneous alteration of Fe homeostasis in cells after exposure to NM. Moreover, HSI analysis has proved a useful tool for the characterization of the interactions between bacteria and nanotubes and the resulting biotransformations. A previous study already came to the same conclusion concerning NM transformation study using HSI in abiotic natural media. [64]

Altogether, these data suggest that non-doped imogolites are toxic to *P. brassicacearum* by inducing ROS and by decreasing their growth. However, adding Fe into the imo structure led to its uptake *via* its chelation by bacterial siderophores and a reduction of the toxic effects. As a result, 90% (w/w) of Fe was taken up from the structure, 40% (w/w) of the Fe-imo was degraded and the resulting breakage of Fe-O(H)-Al bounds in the imogolite structure led to remaining non-doped imogolites.

In a larger context of safer nanoparticle by-design, doping nanomaterials with Fe is promising to induce their biodegradation once released into the environment. Indeed, this study highlights that siderophore emission by microorganisms was able to modify the NM structure, resulting in its non-toxicity. To date, little knowledge is available regarding biodegradation of NMs by siderophores emitted by microorganisms [74] except concerning Fe nanoparticle [69], [75]–[77] (probably due to the high abundance of naturally occurring nano-sized Fe oxides). However siderophores are emitted by other organisms as plants [78] or fungus [79] and could be implicated in the chelation of other metals and nutrients [78], [80], [81] , potentially strongly modifying NM environmental persistence and fates.

3.2.5 Supporting information

Hyperspectral libraries were built from nanomaterial images in abiotic media.

Library specificity was controlled by looking at pixels that were identical using spectral angle mapping (SAM) (Figure 14). The angle chosen for SAM was 0.085rad to be as specific as possible for the NM mapping.

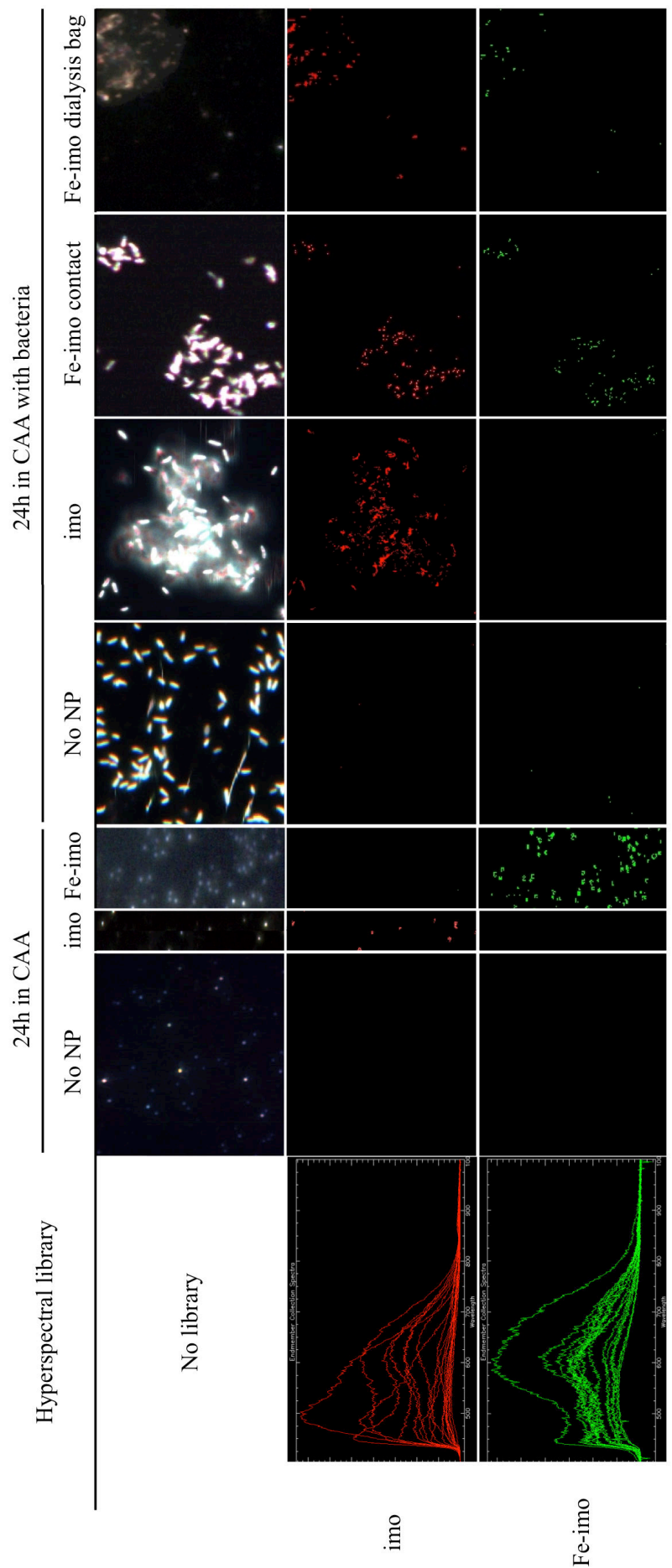


Figure 14 : Imogolite (imo) and Fe- doped imogolite (Fe-imo) mapping on images of (i) CAA with or without 50mg.L⁻¹ of Fe or Fe-imo, 100µm (ii) *Pseudomonas brassicacearum* with or without 50mg.L⁻¹ of Fe or Fe-imo. Hyperspectral library of imogolite (in red) or of Fe-imo (in green) were used for spectral angle mapper analysis (0,085rad). Illuminated pixels have spectral signatures similar to imogolite libraries.

4 Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre nous avons (i) développé un nouveau protocole permettant la substitution de 1% des atomes d'Al par des atomes de Fe dans la structure des Ge-imogolites et (ii) relié cette modification chimique à la modification des effets induits sur la souche NFM421 de *P. brassicacearum*. Il a ainsi été montré que

- La substitution des atomes d'Al par des atomes de Fe est possible pour des pourcentages de substitution faibles (<1%). Cette substitution induit la création de sites d'Al vacants dans le voisinage des atomes de Fe.
- Les Ge-imogolites, initialement délétères pour la croissance de *P. brassicacearum* deviennent une source de Fe promotrices de croissance lorsqu'elles sont dopées en Fe.
- La souche NFM421, cultivée dans un milieu pauvre en Fe, est capable de récupérer 90% du Fe présent dans les Ge-imogolites dopées en fer, même à distance, via l'émission de sidérophores. Ceci entraîne l'augmentation de la croissance des bactéries et du niveau intracellulaire de Fe(II).
- Les Ge-imogolites dopées en fer, fragilisées par la présence de site d'Al vacants dans le voisinage des atomes Fe, sont dégradées à hauteur de 40% lorsque le Fe est chélaté par les sidérophores.

Ces mécanismes sont résumés dans la Figure 15.

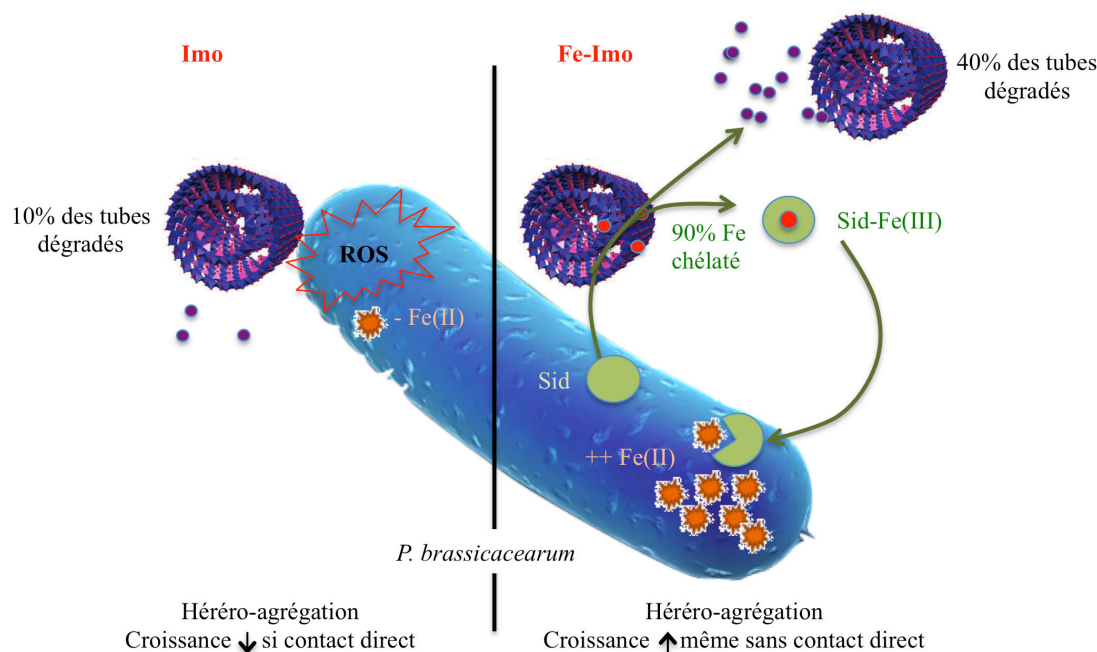


Figure 15 : Schéma illustrant la modification des réponses de la souche NFM421 de *P. brassicacearum* exposée aux Ge-imogolites en fonction de leur dopage en fer (Fe-Imo, à droite) ou non (Imo, à gauche). Sid : Sidérophore. ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène. Les niveaux élevés de Fe(II) dans la cellule sont notés « ++ », les niveaux plus bas « - »

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, et K. Donaldson, « Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study », *Nature Nanotechnology*, vol. 3, n° 7, p. 423–428, juill. 2008.
- [2] K. Donaldson, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, et A. Alexander, « Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety », *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 92, n° 1, p. 5–22, juill. 2006.
- [3] F. Turci, M. Tomatis, I. G. Lesci, N. Roveri, et B. Fubini, « The iron-related molecular toxicity mechanism of synthetic asbestos nanofibres: a model study for high-aspect-ratio nanoparticles », *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, vol. 17, n° 1, p. 350–358, janv. 2011.
- [4] S. George, S. Pokhrel, T. Xia, B. Gilbert, Z. Ji, M. Schowalter, A. Rosenauer, R. Damoiseaux, K. A. Bradley, L. Mädler, et A. E. Nel, « Use of a Rapid Cytotoxicity Screening Approach To Engineer a Safer Zinc Oxide Nanoparticle through Iron Doping », *ACS Nano*, vol. 4, n° 1, p. 15–29, janv. 2010.
- [5] M. Li, S. Pokhrel, X. Jin, L. Mädler, R. Damoiseaux, et E. M. V. Hoek, « Stability, Bioavailability, and Bacterial Toxicity of ZnO and Iron-Doped ZnO Nanoparticles in Aquatic Media », *Environmental Science & Technology*, vol. 45, n° 2, p. 755–761, janv. 2011.
- [6] G. Veréb, L. Manczinger, G. Bozsó, A. Sienkiewicz, L. Forró, K. Mogyorósi, K. Hernádi, et A. Dombi, « Comparison of the photocatalytic efficiencies of bare and doped rutile and anatase TiO₂ photocatalysts under visible light for phenol degradation and *E. coli* inactivation », *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 129, p. 566–574, janv. 2013.
- [7] L. Schlur, S. Begin-Colin, P. Gilliot, M. Gallart, G. Carre, S. Zafeiratos, N. Keller, V. Keller, P. Andre, J.-M. Greneche, B. Hezard, M.-H. Desmonts, et G. Pourroy, « Effect of ball-milling and Fe-/Al-doping on the structural aspect and visible light photocatalytic activity of TiO₂ towards *Escherichia coli* bacteria abatement », *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, vol. 38, p. 11–19, mai 2014.
- [8] E. Sonnleitner et D. Haas, « Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species », *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 91, n° 1, p. 63–79, juill. 2011.
- [9] V. C. Farmer et A. R. Fraser, « Synthetic Imogolite, A Tubular Hydroxyaluminium Silicate », in *Developments in Sedimentology*, vol. Volume 27, M.M. Mortland and V.C. Farmer, Éd. Elsevier, 1979, p. 547–553.
- [10] S. Wada et K. Wada, « Effects on substitution of germanium for silicon in imogolite », *Clays and Clay Minerals*, vol. 30, n° 2, p. 123–128, janv. 1982.
- [11] C. Levard, J. Rose, A. Masion, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, C. Dominici, O. Grauby, J. C. Woicik, et J.-Y. Bottero, « Synthesis of Large Quantities of Single-Walled Aluminogermanate Nanotube », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n° 18, p. 5862–5863, mai 2008.
- [12] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)₃Al₂O₃Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n°

- 96, p. 11284–11286, nov. 2013.
- [13] C. Levard, A. Masion, J. Rose, E. Doelsch, D. Borschneck, L. Olivi, P. Chaurand, C. Dominici, F. Ziarelli, A. Thill, P. Maillet, et J. Y. Bottero, « Synthesis of Ge-imogolite: influence of the hydrolysis ratio on the structure of the nanotubes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, n° 32, p. 14516–14522, août 2011.
 - [14] P. Maillet, C. Levard, E. Larquet, C. Mariet, O. Spalla, N. Menguy, A. Masion, E. Doelsch, J. Rose, et A. Thill, « Evidence of double-walled Al-Ge imogolite-like nanotubes. a cryo-TEM and SAXS investigation », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 4, p. 1208–1209, févr. 2010.
 - [15] A. Thill, P. Maillet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi, et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780–3786, févr. 2012.
 - [16] Y. Arai, M. McBeath, J. R. Bargar, J. Joye, et J. A. Davis, « Uranyl adsorption and surface speciation at the imogolite–water interface: Self-consistent spectroscopic and surface complexation models », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 70, n° 10, p. 2492–2509, mai 2006.
 - [17] L. Denaix, I. Lamy, et J. Y. Bottero, « Structure and affinity towards Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ of synthetic colloidal amorphous aluminosilicates and their precursors », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 158, n° 3, p. 315–325, nov. 1999.
 - [18] J. B. Harsh, S. J. Traina, J. Boyle, et Y. Yang, « Adsorption of cations on imogolite and their effect on surface charge characteristics », *Clays and Clay Minerals*, vol. 40, n° 6, p. 700–706, 1992.
 - [19] S. Imamura, Y. Hayashi, K. Kajiwarra, H. Hoshino, et C. Kaito, « Imogolite: a possible new type of shape-selective catalyst », *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 32, n° 4, p. 600–603, avr. 1993.
 - [20] S. Imamura, T. Kokubu, T. Yamashita, Y. Okamoto, K. Kajiwarra, et H. Kanai, « Shape-Selective Copper-Loaded Imogolite Catalyst », *Journal of Catalysis*, vol. 160, n° 1, p. 137–139, avr. 1996.
 - [21] M. Ookawa, « Synthesis and Characterization of Fe-Imogolite as an Oxidation Catalyst », in *Clay Minerals in Nature - Their Characterization, Modification and Application*, M. Valaskova, Éd. InTech, 2012, p. 2708.
 - [22] M. Suzuki, S. Suzuki, M. Maeda, S. Tomura, et T. Mizota, « Hydration rate of allophane and imogolite by hydration heat measurement: Using as heat exchange absorbents for lower temperature heat source and speedy drying desiccant », *Nippon seramikku kyokai gakujutsu ronbunshi*, vol. 109, n° 10, p. 874–881.
 - [23] W. C. Ackerman, D. M. Smith, J. C. Huling, Y. W. Kim, J. K. Bailey, et C. J. Brinker, « Gas/vapor adsorption in imogolite: a microporous tubular aluminosilicate », *Langmuir*, vol. 9, n° 4, p. 1051–1057, avr. 1993.
 - [24] P. I. Pohl, J.-L. Faulon, et D. M. Smith, « Pore Structure of Imogolite Computer Models », *Langmuir*, vol. 12, n° 18, p. 4463–4468, janv. 1996.
 - [25] M. A. Wilson, G. S. H. Lee, et R. C. Taylor, « Benzene Displacement on Imogolite », *Clays and Clay Minerals*, vol. 50, n° 3, p. 348–351, janv. 2002.
 - [26] D.-Y. Kang, N. A. Brunelli, G. I. Yucelen, A. Venkatasubramanian, J. Zang, J. Leisen, P. J. Hesketh, C. W. Jones, et S. Nair, « Direct synthesis of single-walled aminoaluminosilicate nanotubes with enhanced molecular adsorption selectivity », *Nature Communications*, vol. 5, févr. 2014.

- [27] B. Bonelli, M. Armandi, et E. Garrone, « Surface properties of alumino-silicate single-walled nanotubes of the imogolite type », *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, vol. 15, n° 32, p. 13381–13390, août 2013.
- [28] N. Arancibia-Miranda, M. Escudey, C. Pizarro, J. C. Denardin, M. T. García-González, J. D. Fabris, et L. Charlet, « Preparation and characterization of a single-walled aluminosilicate nanotube-iron oxide composite: Its applications to removal of aqueous arsenate », *Materials Research Bulletin*, vol. 51, p. 145–152, mars 2014.
- [29] F. Alvarez-Ramírez, « First Principles Studies of Fe-Containing Aluminosilicate and Aluminogermanate Nanotubes », *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 5, n° 12, p. 3224–3231, déc. 2009.
- [30] B. Ravel et M. Newville, « *ATHENA* , *ARTEMIS* , *HEPHAESTUS* : data analysis for X-ray absorption spectroscopy using *IFEFFIT* », *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 12, n° 4, p. 537–541, juill. 2005.
- [31] C. A. Schneider, W. S. Rasband, et K. W. Eliceiri, « NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis », *Nature Methods*, vol. 9, n° 7, p. 671–675, juill. 2012.
- [32] A. Masion, D. Tchoubar, J. Y. Bottero, F. Thomas, et F. Villieras, « Chemistry and Structure of Al(OH)/Organic Precipitates. A Small Angle X-ray Scattering Study. 1. Numerical Procedure for Speciation from Scattering Curves », *Langmuir*, vol. 10, n° 11, p. 4344–4348, nov. 1994.
- [33] A. F. Wells, *Structural inorganic chemistry*. Clarendon Press, 1984.
- [34] E. Doelsch, J. Rose, A. Masion, J. Y. Bottero, D. Nahon, et P. M. Bertsch, « Hydrolysis of Iron(II) Chloride under Anoxic Conditions and Influence of SiO₄ Ligands », *Langmuir*, vol. 18, n° 11, p. 4292–4299, mai 2002.
- [35] C. Levard, J. Rose, A. Thill, A. Masion, E. Doelsch, P. Maillet, O. Spalla, L. Olivi, A. Cognigni, F. Ziarelli, et J.-Y. Bottero, « Formation and Growth Mechanisms of Imogolite-Like Aluminogermanate Nanotubes », *Chemistry of Materials*, vol. 22, n° 8, p. 2466–2473, avr. 2010.
- [36] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, et M. R. Wiesner, « Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective », *Nature Nanotechnology*, vol. 4, n° 10, p. 634–641, oct. 2009.
- [37] A. D. Maynard, R. J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M. A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S. S. Tinkle, L. Tran, N. J. Walker, et D. B. Warheit, « Safe handling of nanotechnology », *Nature*, vol. 444, n° 7117, p. 267–269, nov. 2006.
- [38] A. B. Djurišić, Y. H. Leung, A. M. C. Ng, X. Y. Xu, P. K. H. Lee, N. Degger, et R. S. S. Wu, « Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts », *Small*, vol. 11, n° 1, p. 26–44, janv. 2015.
- [39] S. M. Hussain, L. K. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, R. C. Murdock, K. O. Yu, D. M. Mattie, J. J. Schlager, et M. Terrones, « Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges », *Advanced Materials*, vol. 21, n° 16, p. 1549–1559, avr. 2009.
- [40] M. C. Jaurand, A. Renier, et J. Daubriac, « Mesothelioma: Do asbestos and carbon nanotubes pose the same health risk », *Part Fibre Toxicol*, vol. 6, n° 1, 2009.
- [41] C. L. Tran, S. M. Hankin, R. J. Aitken, A. D. Jones, K. Donaldson, V. Stone, et R. Tantra, « An outline scoping study to determine whether high aspect ratio nanoparticles (HARN) should raise the same concerns as do asbestos fibers. Report on Project CB0406 », 13 2008.
- [42] S. C. Andrews, A. K. Robinson, et F. Rodríguez-Quñones, « Bacterial iron

- homeostasis », *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, n° 2-3, p. 215-237, juin 2003.
- [43] R. J. Kadner, « Regulation by iron: RNA rules the rust », *Journal of Bacteriology*, vol. 187, n° 20, p. 6870-6873, oct. 2005.
- [44] C. Wandersman et I. Stojiljkovic, « Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 3, n° 2, p. 215-220, avr. 2000.
- [45] M. L. Cartron, S. Maddocks, P. Gillingham, C. J. Craven, et S. C. Andrews, « Feo - Transport of ferrous iron into bacteria », *Biometals*, vol. 19, n° 2, p. 143-157, avr. 2006.
- [46] F. Pattus et M. A. Abdallah, « Siderophores and Iron-Transport in Microorganisms », *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 47, n° 1, p. 1-20, févr. 2000.
- [47] P. J. Wilderman, N. A. Sowa, D. J. FitzGerald, P. C. FitzGerald, S. Gottesman, U. A. Ochsner, et M. L. Vasil, « Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n° 26, p. 9792-9797, juin 2004.
- [48] K. Hantke, « Iron and metal regulation in bacteria », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 4, n° 2, p. 172-177, avr. 2001.
- [49] G. Becerra, F. Merchán, R. Blasco, et M. I. Igeño, « Characterization of a ferric uptake regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 », *Journal of Biotechnology*, vol. 190, p. 2-10, nov. 2014.
- [50] E. Massé, H. Salvail, G. Desnoyers, et M. Arguin, « Small RNAs controlling iron metabolism », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, n° 2, p. 140-145, avr. 2007.
- [51] A. A. Reinhart, D. A. Powell, A. T. Nguyen, M. O'Neill, L. Djapgne, A. Wilks, R. K. Ernst, et A. G. Oglesby-Sherrouse, « The prrF-Encoded Small Regulatory RNAs Are Required for Iron Homeostasis and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* », *Infection and Immunity*, vol. 83, n° 3, p. 863-875, janv. 2015.
- [52] I. Basile-Doelsch, R. Amundson, W. E. E. Stone, C. A. Masiello, J. Y. Bottero, F. Colin, F. Masin, D. Borschneck, et J. D. Meunier, « Mineralogical control of organic carbon dynamics in a volcanic ash soil on La Réunion », *European Journal of Soil Science*, vol. 56, n° 6, p. 689-703, 2005.
- [53] C. Levard, J. Rose, A. Masion, E. Doelsch, I. Basile-Doelsch, et J. Y. Bottero, « Role of natural nanoparticles (imogolite and allophane) on the mobility of trace metals in soils from La Reunion island : [Abstract] », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 71, n° 15, p. 564, 2007.
- [54] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)₃Al₂O₃Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284-11286, déc. 2013.
- [55] W. Liu, P. Chaurand, C. di-giorgio, M. De Meo, A. Thill, M. Auffan, A. Masion, D. Borschneck, F. Chaspoul, philippe Gallice, A. Botta, J.-Y. Bottero, et J. C. Rose, « Influence of the length of imogolite-like nanotubes on their cytotoxicity and genotoxicity towards human dermal cells », *Chemical Research in Toxicology*, sept. 2012.
- [56] S. van den Brule, E. Beckers, P. Chaurand, W. Liu, S. Ibouaaden, M. Palmi-Pallag, F. Uwambayinema, Y. Yakoub, A. Avellan, C. Levard, V. Haufroid, E. Marbaix, A. Thill, D. Lison, et J. Rose, « Nanometer-long Ge-imogolite nanotubes cause sustained lung inflammation and fibrosis in rats », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 11, n° 1, p. 67, déc. 2014.

- [57] A. Avellan, C. Levard, N. Kumar, J. Rose, L. Olivi, A. Thill, P. Chaurand, D. Borschneck, et A. Masion, « Structural incorporation of iron into Ge-imogolite nanotubes: a promising step for innovative nanomaterials », *RSC Advances*, vol. 4, n° 91, p. 49827-49830, oct. 2014.
- [58] W. Achouak, L. Sutra, T. Heulin, J. M. Meyer, N. Fromin, S. Degraeve, R. Christen, et L. Gardan, « *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, n° 1, p. 9-18, janv. 2000.
- [59] W. Achouak, S. Conrod, V. Cohen, et T. Heulin, « Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy », *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 17, n° 8, p. 872-879, août 2004.
- [60] D. Allaway, N. A. Schofield, M. E. Leonard, L. Gilardoni, T. M. Finan, et P. S. Poole, « Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes », *Environmental Microbiology*, vol. 3, n° 6, p. 397-406, juin 2001.
- [61] M. Utratna et C. P. O'Byrne, « Using enhanced green fluorescent protein (EGFP) promoter fusions to study gene regulation at single cell and population levels », *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1157, p. 233-247, 2014.
- [62] A. J. Moyano, R. A. Tobares, Y. S. Rizzi, A. R. Krapp, J. A. Mondotte, J. L. Bocco, M.-C. Saleh, N. Carrillo, et A. M. Smania, « A Long-Chain Flavodoxin Protects *Pseudomonas aeruginosa* from Oxidative Stress and Host Bacterial Clearance », *PLoS Genet*, vol. 10, n° 2, p. e1004163, févr. 2014.
- [63] M. D. Abramoff, P. J. Magalhães, et S. J. Ram, « Image processing with ImageJ », *Biophotonics international*, vol. 11, n° 7, p. 36-42, 2004.
- [64] A. R. Badireddy, M. R. Wiesner, et J. Liu, « Detection, Characterization, and Abundance of Engineered Nanoparticles in Complex Waters by Hyperspectral Imagery with Enhanced Darkfield Microscopy », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 18, p. 10081-10088, sept. 2012.
- [65] J. E. Loper et S. E. Lindow, « A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. », *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, n° 6, p. 1934-1941, juin 1994.
- [66] A. Thill, O. Zeyons, O. Spalla, F. Chauvat, J. Rose, M. Auffan, et A. M. Flank, « Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism », *Environmental Science & Technology*, vol. 40, n° 19, p. 6151-6156, oct. 2006.
- [67] G. Applerot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkash, Y. Nitzan, R. Lubart, et A. Gedanken, « Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury », *Advanced Functional Materials*, vol. 19, n° 6, p. 842-852, mars 2009.
- [68] W. Jiang, K. Yang, R. W. Vachet, et B. Xing, « Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy », *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 26, n° 23, p. 18071-18077, déc. 2010.
- [69] C. A. Dehner, L. Barton, P. A. Maurice, et J. L. DuBois, « Size-Dependent Bioavailability of Hematite (α -Fe₂O₃) Nanoparticles to a Common Aerobic Bacterium », *Environmental Science & Technology*, vol. 45, n° 3, p. 977-983, févr. 2011.

- [70] L. E. Barton, A. N. Quicksall, et P. A. Maurice, « Siderophore-Mediated Dissolution of Hematite (α -Fe₂O₃): Effects of Nanoparticle Size », *Geomicrobiology Journal*, vol. 29, n° 4, p. 314–322, mai 2012.
- [71] T. E. Furia, *CRC Handbook of Food Additives, Second Edition - Chapter 6 - Sequestrants in Foods*. CRC Press, 1973.
- [72] S. L. Brantley, L. Liermann, et T. D. Bullen, « Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids », *Geology*, vol. 29, n° 6, p. 535, 2001.
- [73] N. von Moos et V. I. Slaveykova, « Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps », *Nanotoxicology*, vol. 8, n° 6, p. 605–630, sept. 2014.
- [74] L. Pereira, F. Mehboob, A. J. M. Stams, M. M. Mota, H. H. M. Rijnaarts, et M. M. Alves, « Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation », *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 35, n° 1, p. 114–128, mars 2015.
- [75] B. Yan, B. A. Wrenn, S. Basak, P. Biswas, et D. E. Giammar, « Microbial Reduction of Fe(III) in Hematite Nanoparticles by *Geobacter sulfurreducens* », *Environmental Science & Technology*, vol. 42, n° 17, p. 6526–6531, sept. 2008.
- [76] J. Bosch, K. Heister, T. Hofmann, et R. U. Meckenstock, « Nanosized iron oxide colloids strongly enhance microbial iron reduction », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 1, p. 184–189, janv. 2010.
- [77] C. Dehner, N. Morales-Soto, R. K. Behera, J. Shrout, E. C. Theil, P. A. Maurice, et J. L. Dubois, « Ferritin and ferrihydrite nanoparticles as iron sources for *Pseudomonas aeruginosa* », *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 18, n° 3, p. 371–381, mars 2013.
- [78] V. Römheld, « The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach - Springer », *Plant and Soil*, vol. 130, n° 1, p. 127–134, 1991.
- [79] J. C. Renshaw, G. D. Robson, A. P. J. Trinci, M. G. Wiebe, F. R. Livens, D. Collison, et R. J. Taylor, « Fungal siderophores: structures, functions and applications », *Mycological Research*, vol. 106, n° 10, p. 1123–1142, oct. 2002.
- [80] T. Baramov, K. Keijzer, E. Irran, E. Mösker, M.-H. Baik, et R. Süssmuth, « Synthesis and Structural Characterization of Hexacoordinate Silicon, Germanium, and Titanium Complexes of the *E. coli* Siderophore Enterobactin », *Chemistry – A European Journal*, vol. 19, n° 32, p. 10536–10542, août 2013.
- [81] T. C. Johnstone et E. M. Nolan, « Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores », *Dalton Transactions*, vol. 44, n° 14, p. 6320–6339, mars 2015.

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules

SOMMAIRE

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules.....	195
1 Introduction et objectifs du chapitre	195
2 Etude des interactions entre des nanomatériaux d'or et des racines de plantes grâce à l'imagerie hyperspectrale.....	198
2.1 La construction des bibliothèques spectrales spécifiques aux nanomatériaux	199
2.2 La cartographie des nanomatériaux sur les images de racines exposées.....	202
3 La nanotomographie aux rayons X et la visualisation en 3 dimensions des nanomatériaux dans les cellules exposées.	205
3.1 La normalisation des histogrammes des volumes reconstruits.....	206
3.2 L'internalisation des NM dans les racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	207
3.3 Hypothèses sur les mécanismes d'internalisation et de transfert des nanomatériaux d'or dans les racines.....	210
3.4 Tester les limites de résolution spatiale de la nanotomographie aux rayons X en imageant les cellules de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	212
4 Conclusion du chapitre.....	214
Références bibliographiques	216

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules

L'étude de la modification de la toxicité des Ge-imogolites à paramètres physico-chimiques contrôlés envers *Pseudomonas brassicacearum* a permis d'identifier des mécanismes de toxicité spécifiques. Il est intéressant de noter que la modification de ces toxicités est corrélée à des taux de dégradation variables des Ge-imogolites. Si les Ge-imogolites bien cristallisées se dégradent à hauteur de 5 à 10% dans les milieux de cultures, ce taux augmente pour les Ge-imogolites présentant des défauts structuraux (20%) et ceux dopés en fer (40%). Le devenir des résidus de tubes n'a pas pu être caractérisé et représente potentiellement un danger à plus long terme pour les organismes étant donné leur petite taille par rapport aux imogolites initiales. En effet, la dégradation partielle des imogolites peut favoriser le transfert des résidus à travers les parois cellulaires. Il est donc nécessaire de pouvoir identifier le devenir de ces résidus et en particulier leur potentielle internalisation. Ce chapitre explore les possibilités qu'offrent deux techniques encore très peu utilisées pour l'étude de l'internalisation de nanomatériaux dans des organismes : **l'imagerie hyperspectrale** et la **nanotomographie aux rayons X**. Le système *Pseudomonas*/imogolite étant complexe, la faisabilité de chacune des deux techniques a été testée sur des systèmes plus favorables à l'observation de l'internalisation.

1 Introduction et objectifs du chapitre

Dans les chapitres précédents nous avons mis en évidence l'importance des interactions entre nanomatériaux (NM) et cellules dans l'induction d'événements toxiques. L'internalisation des NM dans les cellules bactériennes est aujourd'hui toujours en débat, puisque très peu d'outils permettent, de façon claire, de distinguer l'adsorption de NM en surface des cellules de leur internalisation. Comme détaillé dans l'introduction, plusieurs articles concluent à une internalisation probable de NM dans des cellules. Dans ces études, les observations sont le plus souvent faites grâce à la fixation, la coloration, l'inclusion en résine puis l'observation de coupes minces de cellules en microscopie électronique à transmission (MET).

Cependant, ces conclusions restent spéculatives. En effet, l'utilisation du MET sans caractérisation chimique peut mener à de mauvaises interprétations sur la localisation des NM au niveau des cellules. Plusieurs phénomènes peuvent induire la présence de particules électroniquement denses de formes et de tailles similaires aux NM investigués. Par exemple,

certaines cellules peuvent contenir du CaCO_3 , ou encore des phytolites ($\text{SiO}_2\text{-nH}_2\text{O}$). [1], [2] De plus, les agents contrastants utilisés pour l'observation des tissus que sont principalement le tétraxide d'osmium, le cacodylate, le citrate de plomb, l'acétate d'uranyle ou les ferri-ferro-cyanures peuvent former des précipités masquant les NM. [3]

Certains auteurs, pour pallier à la contamination des échantillons du fait de l'ajout d'agents contrastants, étudient les interactions NM/cellules en couplant les observations au MET avec des analyses chimiques réalisées à l'aide d'un détecteur EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy) ou en réalisant des cartographies chimiques par micro-spectroscopie de fluorescence X (micro-XRF). Cependant ces analyses chimiques sont également sujet à des artefacts de mesures principalement liés à la préparation des échantillons. En effet, la préparation de coupes minces nécessite une abrasion mécanique des cellules ce qui risque de les déformer, ou de déplacer les NM induisant de mauvaises interprétations des images.

Ces techniques, basées sur la visualisation en deux dimensions (2D) des cellules ne permettent pas d'établir de conclusions indiscutables sur l'internalisation des NM dans les cellules. Il y a aujourd'hui un réel besoin de développement d'outils analytiques permettant de localiser sans ambiguïté les NM dans les cellules et les tissus afin de mieux comprendre la translocation des NM dans les cellules et leur transport dans les organismes. [2]

Idéalement, ces outils devront fournir une information sur la localisation des NM dans les cellules en 3 dimensions (3D). De plus, les étapes de préparation des échantillons devront être minimales pour éviter les artefacts de préparation (cités précédemment). Enfin, pour avoir un sens environnemental, ces outils devront être très sensibles et avoir une limite de détection des NM basse (de l'ordre du $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Dans ce contexte, ce chapitre a pour but global de comparer les performances de deux outils encore très peu exploités pour suivre la potentielle internalisation des NM dans des cellules. Ces deux outils sont (i) le microscope à champ sombre couplé à de l'imagerie hyperspectrale (HSI pour l'acronyme anglais Hyperspectral System Imaging) et (ii) la nanotomographie aux rayons X (nano-CT pour nano-Computed Tomography). Pour tester ces outils, nous avons utilisé des NM modèles, à savoir des NM d'or (NM-Au) (faible solubilité, bon pouvoir absorbant des rayons X et signature spectrale particulière). La taille des NM utilisés, (12 nm de diamètre), a été sélectionnée car elle semble être un diamètre de NM d'or favorable à leur internalisation dans les cellules procaryotes [4] et eucaryotes [5]. La charge de surface étant un paramètre clé gouvernant les interactions NM-vivant, nous avons utilisé des NM d'or enrobées avec du citrate, (NM chargés négativement, nommés NPAu- dans la suite du

rapport) ou avec du polyéthylèneimine branché (NM chargés positivement, nommés NPAu+ par la suite) afin d'identifier un potentiel effet de la charge sur l'internalisation dans les cellules et leur transport *in situ*.

Nous avons étudié l'internalisation des NM dans des cellules de tailles différentes ; (i) les racines d'*Arabidopsis thaliana* composées de cellules de quelques μm de diamètre, et (ii) les cellules bactériennes de *Pseudomonas brassicacearum* en forme de bâtonnets de 500nm de diamètre et 1 à 2 μm de long.

Les paragraphes suivants décrivent les résultats obtenus pour l'étude des interactions entre les NM-Au et les cellules avec chacun de ces outils.

2 Etude des interactions entre des nanomatériaux d'or et des racines de plantes grâce à l'imagerie hyperspectrale

L'imagerie hyperspectrale (HSI) est une technique assez récente qui a été développée il y a une dizaine d'années. Le principe est d'associer à une image 2D une troisième dimension qui comporte la spectrophotométrie; pour chaque pixel, le spectre d'absorption sur une gamme de longueur d'onde de 400 à 1000nm est enregistré. Les images RGB reconstituées sont très proches des images visibles dans les oculaires du microscope. En réalisant une bibliothèque de spectres des matériaux de référence, il est possible de rechercher ces signatures spectrales sur une autre image hyperspectrale pour y identifier les matériaux d'intérêt. L'autre innovation de cette technique est l'utilisation d'un microscope à champ sombre amélioré, avec un condensateur qui focalise très efficacement la lumière sur l'échantillon et un dispositif qui maximise la récupération de la lumière diffusée. Il en résulte des images sur lesquelles les échantillons sont plus brillants qu'avec un microscope à champ sombre classique, ce qui permet de visualiser la lumière diffusée par des objets nanométriques.

Avec le HSI, il est possible de détecter et de distinguer des NM mélangés dans des matrices complexes [6], pour peu qu'ils n'aient pas subi de transformations par rapport à l'état initial modifiant leur signal spectral. Dans le cadre de l'étude des interactions des NM avec le vivant, cet outil est très prometteur puisqu'il permet de réaliser des études *in situ* en s'affranchissant des inconvénients et des artefacts des observations au MET cités plus tôt. Plusieurs travaux, récemment publiés, ont utilisé le HSI pour l'étude de l'interaction NM/vivant dans différents systèmes biologiques, tels que (i) des lignées cellulaires comme par exemple l'étude de l'interaction de NM d'or et d'argent avec des kératinocytes [7] ou d'or dans plusieurs lignées cellulaires[8], (ii) des organismes unicellulaires, avec la démonstration de l'internalisation de différents types de NM dans des protozoaires [9], ou des NM d'Ag avec des bactéries [10] et (iv) des organismes entiers, comme la visualisation *in vivo* de l'internalisation de NM d'Ag dans les tissus de poissons [11] ou de vers de terre [12]. Si cette liste de publication n'est pas exhaustive, elle illustre bien l'efficacité que présente cette technique dans la détection, la localisation, la caractérisation et la semi-quantification des NM en contact avec le vivant.

Dans notre étude, les NM d'or (NPAu⁺ et NPAu⁻) ont été mélangés à un gel d'Hoagland/2 solidifié par du phytigel (7%) sur lequel *Arabidopsis thaliana* a été cultivée pendant 10 jours.

Les NM et les apex de racines ont ensuite été imagées en HSI. Les spectres d'absorption de chacun des matériaux ont ensuite été extraits de ces images pour en constituer des bibliothèques spectrales intrinsèques aux NM. Ces bibliothèques ont servi à cartographier les pixels comportant des NM dans les images de racines exposées. Le détail de ces étapes est présenté dans le Chapitre II : Matériels et Méthodes (page 53).

2.1 La construction des bibliothèques spectrales spécifiques aux nanomatériaux

Les bibliothèques spectrales des NM doivent avoir un signal spécifique afin d'éviter les faux positifs (i.e ; identifiant comme NM d'autres matériaux que des NM). Aussi, les précautions pour l'extraction des bibliothèques et les contrôles de leur spécificité ont été nombreuses. La première étape consiste en l'extraction de la bibliothèque spectrale correspondant aux objets initialement présents dans le gel sans les NM (appelée plus tard bibliothèque du gel). Nous avons ensuite vérifié que toutes les particules présentes dans le gel étaient cartographiées par leur propre bibliothèque (Figure 1).

La bibliothèque du gel ainsi obtenue contient des spectres de faibles intensités (intensité maximale de 500). En effet, le gel contient des objets (certainement des sels ou des particules du polymère utilisé pour gélifier le milieu) absorbant peu la lumière.

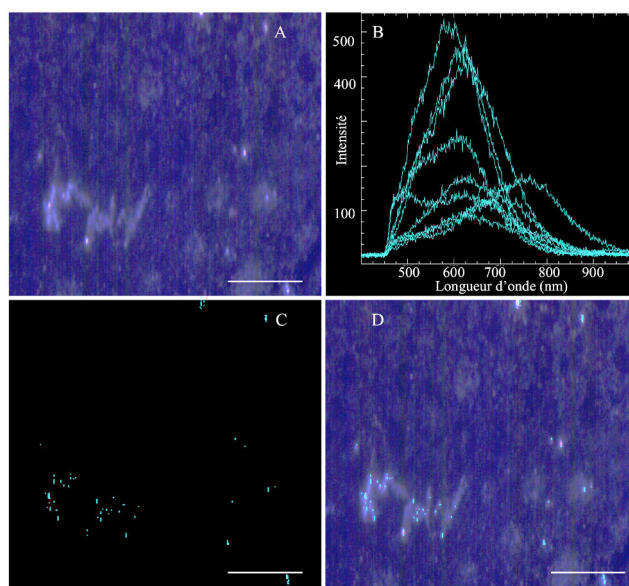


Figure 1 : Construction de la bibliothèque spectrale correspondant aux matériaux présents dans le phytigel sans nanomatériaux. L'image du gel (A) est utilisée pour en extraire la bibliothèque spectrale (B). Les pixels de l'image contenant l'information spectrale présente dans la bibliothèque du gel sont mis en évidence par la couleur cyan (C) et superposés à l'image d'origine (D). Echelle 1µm.

Les **bibliothèques spectrales des NM** sont ensuite construites de la même façon pour chaque type de NM d'or (NPAu⁺ et NPAu⁻). Cependant, elles peuvent contenir des spectres

correspondant aux objets contenus dans le gel. Aussi, une double cartographie des pixels est réalisée sur l'image initiale avec (i) la librairie du gel et (ii) la librairie du NM. Ainsi, les librairies des NM sont rendues plus spécifiques en éliminant les spectres de la librairie du gel. Ensuite, les librairies des NM sont utilisées pour la cartographie des pixels des images (i) du gel sans NM, (ii) des gels contenant les différents types de NM et (iii) de racines non exposées aux NM. Il est ainsi vérifié que les librairies sont spécifiques aux NM et qu'aucun pixel de la racine témoin ne présente le même signal que ceux contenus dans la librairie des NM, comme attestent les résultats présentés en Figure 2.

Ces résultats indiquent que les librairies spectrales des deux NM obtenues sont différentes. Le décalage des pics d'absorption principaux des spectres de la librairie NPAu- (centrés sur 630nm) par rapport aux spectres de la librairie NPAu+ (centrés sur 600nm) peut être le reflet d'une agrégation plus importante des NPAu+ dans le gel que les NPAu-. La cartographie de la librairie NPAu+ sur leur image dans le gel va d'ailleurs dans ce sens. Les différences d'intensité des spectres (intensité maximale de 1200 pour NPAu- et de 3200 pour NPAu+) sont certainement dûes aux différences d'enrobage [6].

Concernant les contrôles (gel sans NM, apex et cellules de bordures de la racine non exposée aux NM), **aucune image ne présente un signal spectral identique aux librairies de NM.** Les mêmes contrôles ont été réalisés sur deux autres plantes témoins avec un résultat similaire.

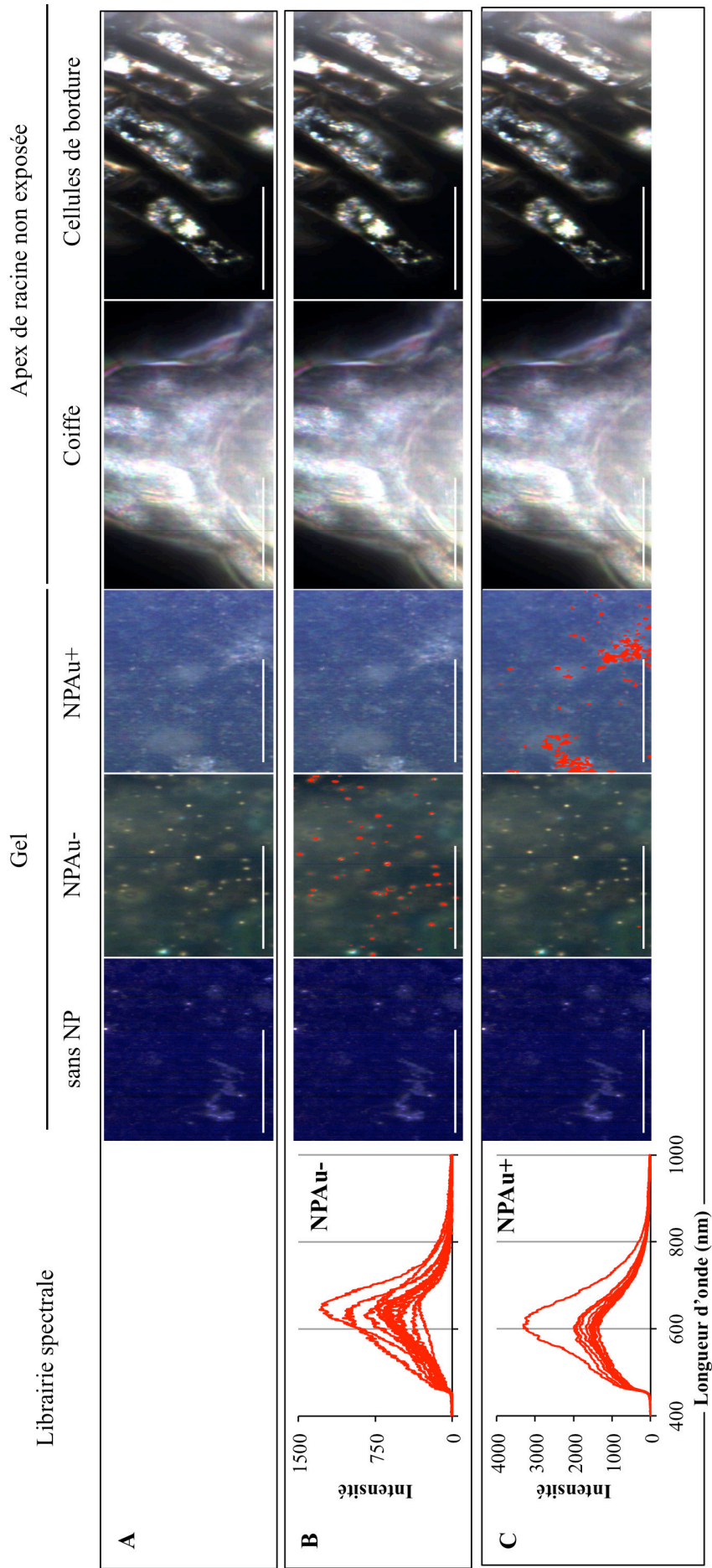


Figure 2 : Cartographie des pixels présentant une signature spectrale identique à celle des nanoparticules d’or NPAu- (B) et NPAu+ (C) sur différentes images de gel et d’apex de racines non exposées aux NM (A). Les pixels en rouge ont une signature spectrale identique aux NPAu- (ligne B) et aux NPAu+ (ligne C). La cartographie a été réalisée en utilisant la technique des angles spectraux avec un angle de 0,085rad. Echelle 2µm. Les images de la première et des deux dernières colonnes ne présente aucun signal hyperspectral identique aux NM.

2.2 La cartographie des nanomatériaux sur les images de racines exposées.

Les bibliothèques spectrales de NM ainsi obtenues correspondent donc **spécifiquement** au signal des NM d'or, et aucun signal faux positif n'a été observé dans les conditions contrôles. Il est à présent possible de les utiliser pour réaliser des cartographies sur des échantillons de racines exposées.

Pour étudier les interactions entre les NM d'or et les racines d'*Arabidopsis thaliana*, différents types de compartiments cellulaires racinaires ont été observés. Leur nom et localisation sont schématisés en Figure 3.

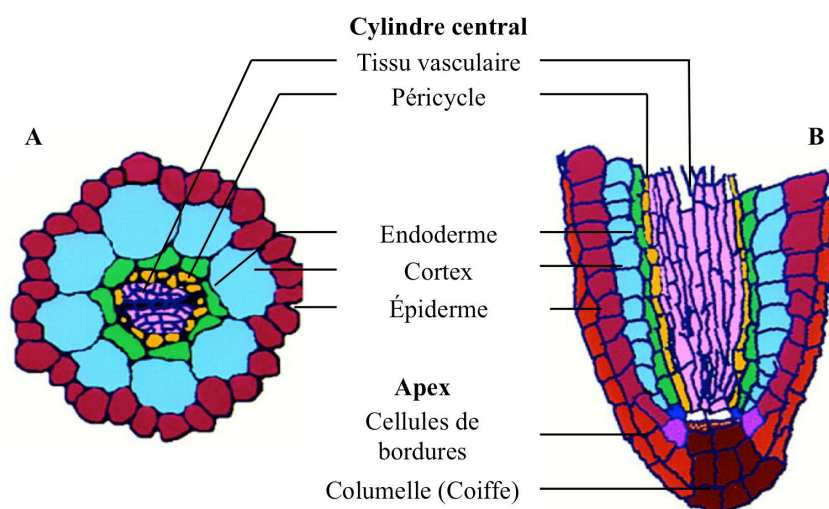


Figure 3 : Schéma représentant les différentes cellules composant les tissus d'une racine d'*Arabidopsis thaliana*. Vues en coupe (A) transversale et (B) longitudinale. Adapté de Di Lorenzo et coll. 1996. [13]

Les voies d'entrées potentielles des NM dans les racines n'étant pas clairement identifiées dans la littérature, chacune des localisations (apex, écorce et cylindre central) ont été observées au microscope pour le traitement HSI. Pour se faire, les racines d'*Arabidopsis thaliana* ont été récoltées après 10 jours de culture sur phytigel contenant 1mg.L^{-1} de NM NPAu- ou NPAu+. Les racines ont été rincées 3 fois à l'eau ultra pure puis observées entre lame et lamelle pour l'acquisition d'images. Les plans focaux des images ont été choisis pour sonder le centre des racines et des cellules. Les bibliothèques spectrales des NM ont été cartographiées sur ces images (résultats en Figure 4).

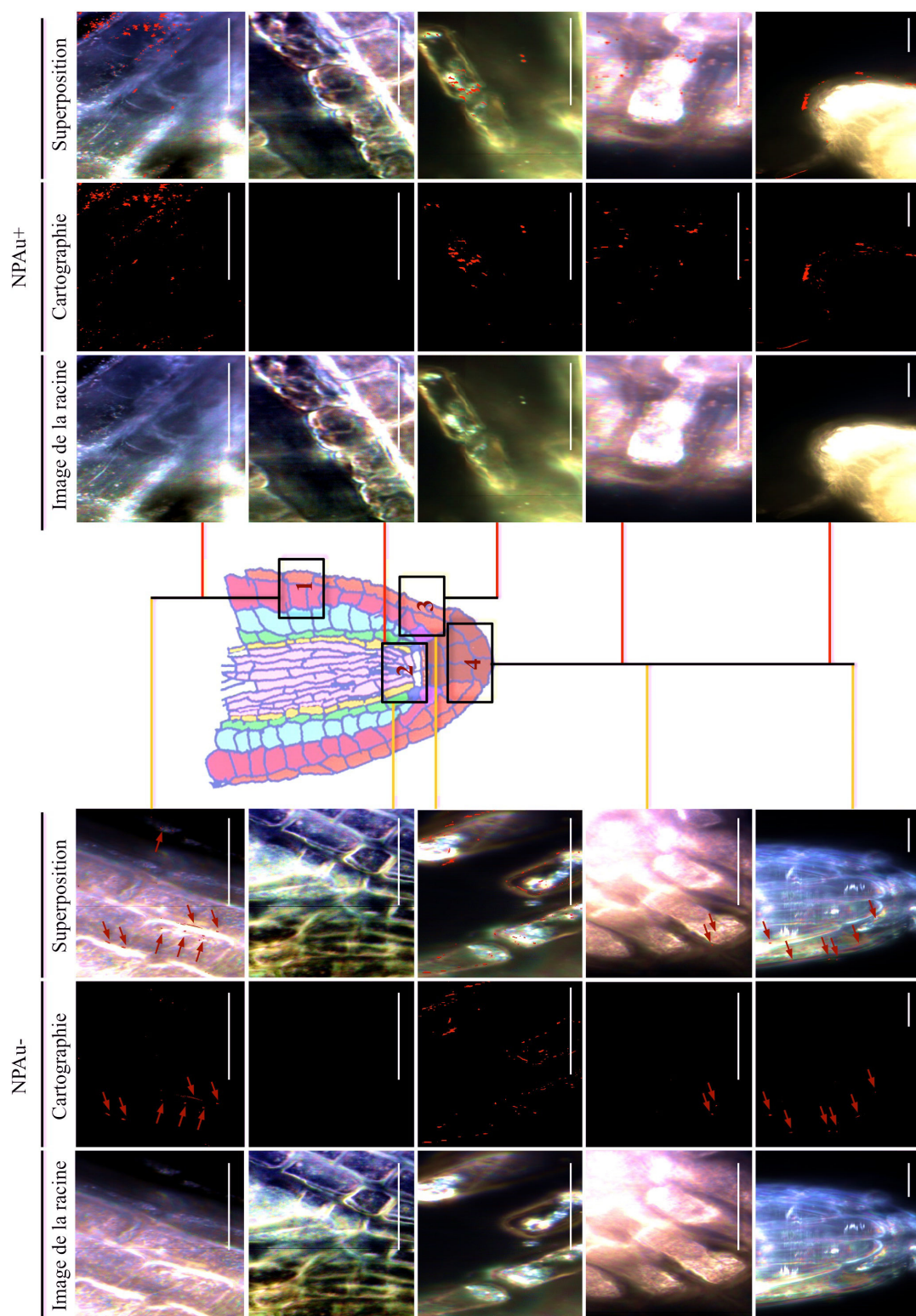


Figure 4 : Cartographie des NM d'or sur différents tissus de racines d'*Arabidopsis thaliana* exposées à 1mg.L^{-1} de NPAu- (à gauche) ou NPAu+ (à droite). Les librairies spectrales des NM ont été cartographiées sur les différentes images *via* la méthode de l'angle spectral (angle $0,085^\circ$ rad). Les pixels colorés en rouge ont un signal spectral identique à celui des NM. Zone 1 : coiffe latérale. 2 : Pericycle. 3 : cellules de bordure. 4 : columelle. Echelle : $2\mu\text{m}$.

Sur les images de plus faible grossissement (dernière ligne de la Figure 4), il est observé pour les NPAu⁺ une grande accumulation de NM dans une matrice transparente et brune, qui est le mucilage de la racine. Le mucilage est un ensemble d'exsudats composés de polypeptides et polysaccharides excrétés par les cellules de bordures (sur l'apex) des racines [14]. Cette accumulation est moins observée dans le cas des NPAu⁻. Ces résultats suggèrent une **immobilisation des NPAu⁺ dans le mucilage de l'apex** du fait d'attractions électrostatiques avec les composants du mucilage.

Concernant les images à plus fort grossissement, aucune des images du système vasculaire central traitées ne contient de pixels identifiés comme composés de NM, quel que soit la nature de l'enrobage. Par contre, les compartiments correspondant aux cellules de l'épiderme du cortex, de bordures ou de la coiffe de l'apex présentent tous des pixels dont la signature spectrale est conforme à celles des NM. Ceci indique que les deux types de NM d'or, interagissent fortement avec les cellules racinaires d'*Arabidopsis thaliana*.

Si les compartiments cellulaires en interaction avec les NM sont identiques, des différences dans leurs localisations sont observées. En effet, les NPAu⁻ sont principalement localisées en bordure de cellules. Plusieurs images montrent clairement que **les NPAu⁻ sont accumulées au niveau des membranes plasmiques et/ou dans l'apoplasme des cellules. Quelques NPAu⁻ ont également été localisées dans le cytosol.** A l'inverse, si les NPAu⁺ s'accumulent également au niveau des membranes plasmiques, il apparaît clairement sur plusieurs images que les NPAu⁺ sont également **présentes dans le cytosol** des cellules.

Grâce à la microscopie à champ sombre couplée au HSI, nous avons ici pu mettre en évidence **l'internalisation des NPAu⁻ et des NPAu⁺ dans les membranes plasmiques ou les apoplasmes de cellules épidermales du cortex, de la coiffe ou de la columelle de l'apex** de racines d'*Arabidopsis thaliana*.

De plus, il faut garder à l'esprit que les bibliothèques utilisées contiennent le signal spectral des NM identifiés dans les gels de culture. Les NM peuvent subir plusieurs modifications physico-chimiques (dissolution du matériel d'enrobage, agrégation, adsorptions d'éléments sur la particule...) lors de leurs interactions avec les cellules. Ceci peut modifier leur signature spectrale, diminuer l'intensité, déplacer le pic d'absorption maximale, élargir le spectre.

Ces résultats ne sont donc pas quantitatifs et il est possible (et certainement probable) que des NM transformés présents dans les tissus de racines cartographiés ne soient pas détectés. De plus, l'internalisation ne peut être observée que dans les cellules imagées dans un champ de vision restreint et en deux dimensions. Nous avons donc testé un deuxième outil

complémentaire qui est la nanotomographie aux rayons X (nano-CT) qui permet de caractériser un plus grand volume en 3 dimensions permettant d'avoir des informations plus globales sur les processus d'internalisation dans les cellules et de translocation dans les tissus.

3 La nanotomographie aux rayons X et la visualisation en 3 dimensions des nanomatériaux dans les cellules exposées.

Si la micro-tomographie aux rayons X existe depuis plusieurs années (limite de résolution spatiale de l'ordre du μm), la nanotomographie aux rayons X (nano-CT) est plus récente [15] et permet de réaliser de l'imagerie 3D avec une résolution spatiale à l'échelle nanométrique.

Si l'étude des interactions NM/tissus a l'aide de la nano-CT a déjà été réalisée sur des appareils développés en synchrotron[16], cette étude est, à notre connaissance, la première réalisée avec une nano-CT de laboratoire. Ces travaux ont pu être réalisés grâce à l'installation de la plateforme nationale d'imagerie 3D au CEREGE en octobre 2012 dans le cadre du projet équipex NanoID. Les résolutions spatiales offertes par le nano-tomographe UltraXRM-L200 (de chez Zeiss-Xradia) de cette plateforme (150 et 50 nm) sont uniques en France.

Nous avons ainsi utilisé la nano-CT pour l'imagerie en 3D et la détection de NM dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* ou dans des cellules bactériennes de *Pseudomonas brassicacearum* ou exposées à 10 ou 1 mg.L^{-1} de NPAu- ou NPAu+.

Les images 3D des organismes exposés (racines et bactéries) ont été obtenues à partir d'un jeu de 901 projections 2D, enregistrées à différents angles de -90° à 90° autour de l'axe de rotation de l'échantillon.

Deux grandissements (i.e. résolution spatiale) ont été utilisés :

- (i) Pour imager les racines, les images ont été acquises avec un grossissement de 200x, ce qui correspond à un champ de vision de $65 \times 65 \times 65 \mu\text{m}^3$ et une taille de voxel (pixel en 3D) isotropique de 63,5 nm ($x=y=z$) (mode LFOV pour l'acronyme anglais Large Field Of View). Le temps de comptage était de 60s par image.
- (ii) Les bactéries ont été imagées avec un grossissement de 800x, correspondant à un champ de vision de $16 \times 16 \times 16 \mu\text{m}^3$ et un voxel de $16 \times 16 \times 16 \text{ nm}^3$, avec un temps de comptage de 250s par image (mode HRes pour High Resolution).

Les éventuels mouvements de l'échantillon durant l'analyse ont été corrigés via l'utilisation d'une bille d'or de 900nm de diamètre comme repère. Les images ont ensuite

été reconstruites en 3D, et le nombre de voxels pour chaque niveau de gris (i.e. les histogrammes des volumes reconstruits) ont été extraits. Le Chapitre II, Matériels et Méthodes page 53 comporte plus de détails concernant ces analyses, leur principe, et la préparation des échantillons.

3.1 La normalisation des histogrammes des volumes reconstruits

Les volumes 3D reconstruits sont représentés en niveaux de gris ; du sombre pour les matériaux peu absorbants (l'air, les cellules) au clair pour les matériaux très absorbants des rayons X (les NM Au). Les histogrammes (i.e ; le nombre de voxels par niveau de gris) des volumes reconstruits de chaque échantillon ont été extraits, normalisés et comparés entre eux dans le but d'identifier un seuil de niveau de gris (i.e. absorption des RX) au-delà duquel les voxels contiennent des NM. Cette étape d'analyse d'image est appelée seuillage.

Afin de mieux comprendre la contribution des différents matériaux présents dans les échantillons (avec des niveaux d'absorption des RX différents) l'histogramme du volume total (comprenant les contributions des cellules, de l'air, des nanoparticules d'or éventuelles et des billes d'or utilisées comme calibrant) est comparé aux histogrammes de plusieurs sous-volumes extraits : (i) volume total sans les billes d'or (nommé plus tard sub-total), (ii) volume de 700x250x250 voxels de l'air et (iii) petit volume 25x25x25 voxels de la bille d'or.

Tous ces histogrammes ont ensuite été tracés sur le même graphique pour chaque échantillon (exemple d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* exposée aux NPAu⁺ en Figure 5.A). Aussi, le pic principal de l'histogramme total est dû à la contribution de l'air.

Afin de normaliser les histogrammes, la distribution des niveaux de gris correspondant à l'air a été utilisée comme calibrant. Cette contribution due à l'absorption de l'air est une distribution des niveaux de gris que l'on peut reproduire à l'aide d'une fonction gaussienne. Les gaussiennes utilisées pour reproduire les distributions de l'air pour chaque échantillon ont été extraites puis normalisées entre elles par rapport à leurs largeurs à mi-hauteur et centrées par rapport au maximum des pics. Les mêmes corrections ont ensuite été appliquées aux histogrammes du sous-volume (sub-total), permettant ainsi leur comparaison (Figure 5.B). Sur ces histogrammes normalisés, tous les niveaux de gris supérieurs au seuil de la borne maximale de l'échantillon témoin (trait noir sur la Figure 5) sont identifiés comme des voxels contenant des NM.

Concernant les histogrammes des sous-volumes (sub-total) issus des échantillons de bactéries (Figure 5.C), l'histogramme de l'échantillon NPAu⁺ montre une absorption des rayons X sur une gamme qui n'est pas identique aux témoins et à l'échantillon exposé à NPAu⁻. Ceci

indique que ces échantillons ont pu bouger durant l'analyse. Il est ainsi possible que la reconstruction du volume soit erronée, et les niveaux de gris (contrastes d'absorption) de ces échantillons ne soient plus identiques aux autres. Leur interprétation devra être considérée avec précaution.

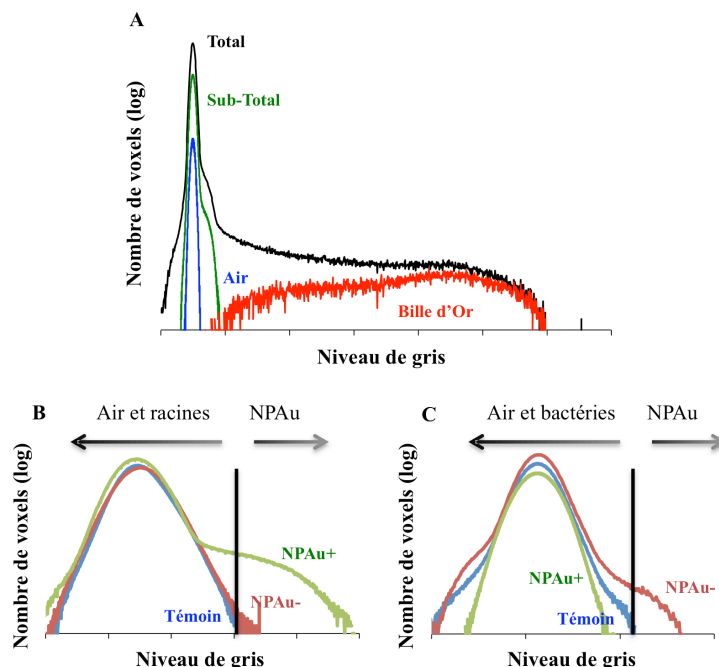


Figure 5 : Etapes de normalisation des histogrammes des volumes reconstruits de *Pseudomonas brassicacearum* exposés aux NM d'or (NPAu). (A) Les histogrammes totaux (contributions des absorptions RX de la bille d'or, des cellules, de l'air, et des nanoparticules éventuelles), Sub-totaux (sans les billes d'or), des cellules, de l'air et d'une bille d'or ont été extraits et superposés pour chaque échantillon. Les pics d'absorption des rayons X de l'air ont été normalisés à mi-hauteur puis centrés. Les mêmes corrections ont été appliquées aux histogrammes des sub-totaux pour pouvoir les comparer. Histogrammes normalisés des images 3D de racines (B) ou de bactéries (C). Le seuil d'adsorption (valeur seuil) dû aux NM a été placé à la borne haute de l'histogramme du témoin (trait noir).

3.2 L'internalisation des NM dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*

Tous les voxels présentant des niveaux de gris supérieurs au seuil défini après normalisation des histogrammes sont donc composés en partie de NPAu et indiquent la distribution des NPAu dans les échantillons. Ces voxels ont été mis en évidence en rouge sur les volumes reconstruits ainsi que sur des coupes 2D virtuelles (extraites des volumes) des racines d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 6). Les coupes 2D de ces volumes permettent de mettre en évidence les cellules des racines, et il est possible de distinguer les cellules de la coiffe de l'apex et du système vasculaire. Nous avons donc pu étudier les mêmes compartiments cellulaires qu'en HIS.

Pour les plantes exposées au NPAu⁻, aucun NM n'a été identifié dans les cellules du cylindre central. Il est cependant possible de distinguer des NM localisés dans les membranes plasmiques des cellules constituant (i) le cortex avec des NM observés dans les cellules de l'épiderme et (ii) l'apex de la racine avec l'internalisation de NM dans les cellules de bordures et de la coiffe. Ces observations confirment les observations en HSI. Cependant, le fait que l'on retrouve des NPAu⁻ sur toute la longueur de la racine indique certainement une grande mobilité des NPAu⁻.

Concernant les plantes exposées aux NPAu⁺, nous voyons très bien l'internalisation d'agrégats de NM dans les cellules de bordure et de coiffe de l'apex. Ces agrégats ont un volume plus important que ceux observés lors de l'internalisation des NPAu⁻. Cependant il s'agit du seul compartiment dans lequel a été identifié l'internalisation des NPAu⁺, même si leur sorption sur l'extérieur de la racine a été identifiée en plusieurs localisations. Cette localisation préférentielle des NPAu⁺ indique une forte interaction avec l'apex de la racine limitant ainsi leur mobilité dans la racine.

Cette étude nous permet d'identifier très clairement, et sans ambiguïté, que les NM d'or de 12nm, quel que soit leur charge (positive ou négative), sont internalisées dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. Il semble que l'unique voie d'entrée des NPAu⁺ soit les cellules de l'apex, où elles sont immobilisées. Concernant les NPAu⁻, leurs voies d'entrée dans les racines n'ont pas pu être identifiées. Cependant, le fait qu'elles soient réparties sur toute la longueur des racines et dans tous les compartiments excepté dans le cylindre central permet d'affirmer que la mobilité de ces NM est plus grande que celle des NPAu⁺ et/ou que leurs voies d'entrées dans les racines sont multiples.

Des hypothèses sur les mécanismes d'internalisation et de transport des NPAu en fonction de leur charge dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* sont proposées dans la partie suivante.

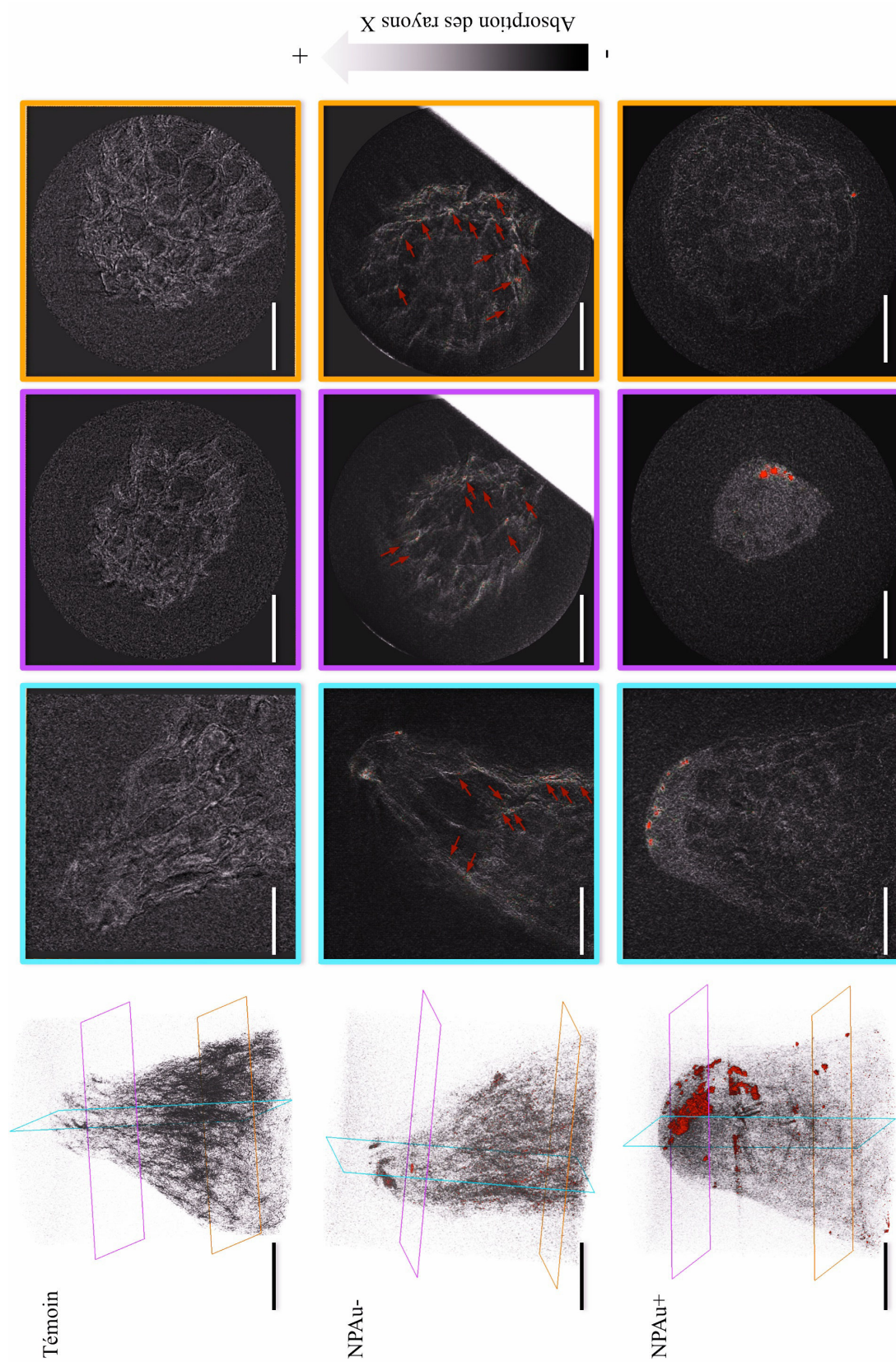


Figure 6 : Volumes reconstruits, coupes transversales (bleu) et longitudinales (violet et orange) de racines d'*Arabidopsis thaliana* exposées à 10mg.L^{-1} de NM d'or (NPAu- et NPAu+). Images obtenues en nanotomographie aux rayons X avec un voxel de $63,5\text{ nm}$. Les voxels en rouges indiquent la distribution des NPAu. Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$

3.3 Hypothèses sur les mécanismes d'internalisation et de transfert des nanomatériaux d'or dans les racines

Deux articles étudient le transport de NM d'or de 10nm de diamètre, enrobées de différentes molécules pour leur conférer des charges positives ou négatives, dans plusieurs espèces de plantes. Ces études observent l'accumulation d'or dans les compartiments racinaires et aériens des plantes *via* une exposition racinaire en réalisant des analyses chimiques. Ces deux études concluent à **des accumulations et des transferts différents** si les NM d'or sont enrobés de molécules chargées positivement ou négativement.

Lorsque les NM d'or sont chargés négativement, ces études observent une légère accumulation des NM dans les racines de différentes espèces de plantes ainsi qu'une grande mobilité. [5], [17] Pour comprendre plus en détail les mécanismes de cette accumulation d'or dans les racines et leurs voies d'entrées, Judy et ses collaborateurs [5] ont réalisé une cartographie chimique de l'or, du zinc et du fer sur des coupes ultrafines de racine en utilisant la microscopie à fluorescence X (micro-XRF). Cependant ils n'ont pu observer d'internalisation des NM dans les racines, certainement du fait de la limite de résolution spatial de cet outil et du faible rayonnement fluorescent issu de la désexcitation de la couche L de l'or.

Pour les NM chargés positivement, une accumulation importante en surface des racines, une faible accumulation à l'intérieur des racines et une moindre mobilité ont été observées. [5], [17] Ces études émettent l'hypothèse d'une interaction électrostatique forte entre les charges positives de NPAu⁺ et les groupements carboxyles des polysaccharides composant les membranes cellulaires [18], diminuant ainsi leur mobilité.

Nos travaux confirment les résultats de la littérature. De plus, nous avons obtenu des informations sur l'internalisation différenciée des NPAu⁻ et NPAu⁺ dans les cellules en HSI, ainsi que sur leur répartition (eg. leur mobilité) le long des premiers millimètres de la racine grâce à la nano-CT. Grâce aux travaux existants et aux résultats obtenus, nous proposons un scénario d'internalisation et de transfert des NPAu dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* (schématisé en Figure 7).

(i) Les NPAu traversent le mucilage, excrété par les cellules de bordures. Composé de polysaccharides, le mucilage peut immobiliser les NPAu⁺ (Figure 7 Ia) via des interactions électrostatiques, alors que les NPAu⁻ peuvent plus facilement diffuser (Figure 7, Ib). L'influence des charges des NM sur leur capacité à traverser le mucilage a été décrit dans [17], [19]. L'accumulation des NPAu⁺ dans le mucilage a été confirmée en HSI.

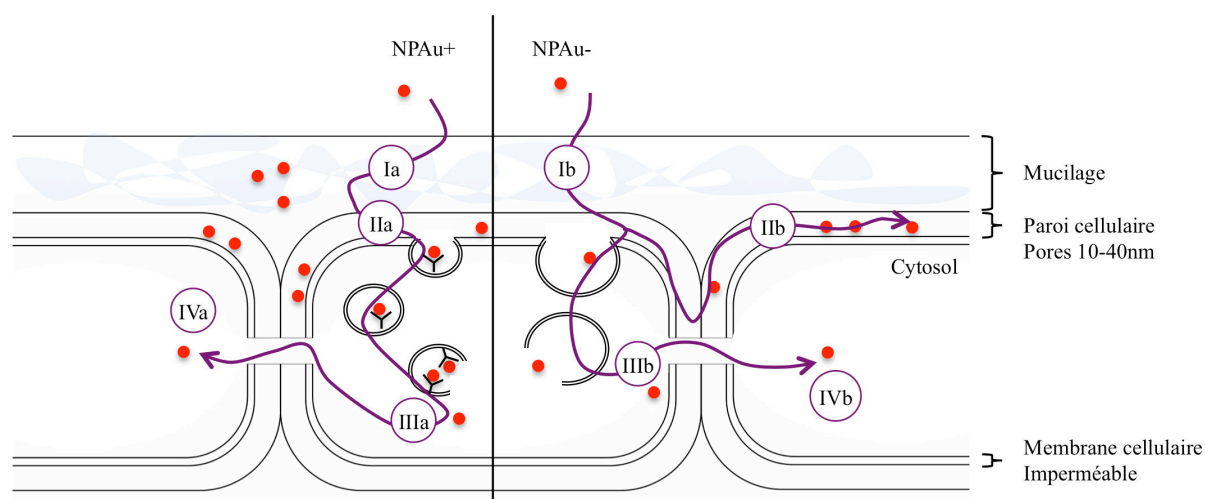


Figure 7 : Schéma hypothétique des mécanismes de transfert, d'accumulation et de mobilité des nanomatériaux d'or chargés positivement ou négativement dans l'épiderme d'une racine d'*Arabidopsis thaliana*. Ces hypothèses sont basées sur nos observations en HSI et en nano-CT.

(ii) Les parois cellulaires présentent des pores de 5 à 20nm [20] permettant la diffusion des NM de taille inférieure. Les membranes cellulaires étant totalement imperméables aux molécules, les NPAu s'accumulent dans la paroi cellulaire après avoir franchi le mucilage [21]. C'est pourquoi nous avons observé une grande quantité de NPAu (+ et -) localisées dans la paroi cellulaire en HSI, confirmé en nano-CT. Les NPAu+ peuvent alors interagir électrostatiquement avec les phospholipides [21] et s'immobilisent à la frontière de la membrane cellulaire (Figure 7, IIa). Les parois cellulaires étant totalement imperméables aux molécules, les NPAu- ne peuvent pas diffuser à travers. Cependant, chargées négativement, leur transfert par voie apoplasmique est possible (Figure 7, IIb) [2]. Ces mécanismes expliqueraient les différences de répartition que nous avons observé en nano-CT entre les NPAu- (très localisées dans l'apex) et les NPAu+ (réparties de manière plus homogène).

(iii) L'internalisation des NPAu+ que nous avons observée dans le cytosol des cellules peut être réalisée *via* une endocytose (Figure 7, IIIa). En effet, les nanomatériaux positivement chargés peuvent être spécifiquement internalisés par des vésicules CFPE (pour Clarithrin-dependant Fluid Phase Endocytosis) [2], [22]–[24]. Cette endocytose est réalisée par des vésicules qui contiennent des récepteurs spécifiques favorisant l'internalisation de matériaux positivement chargés, et est très fréquente. L'endocytose FPE (Fluide Phase Endocytosis) qui peut permettre l'internalisation des NM négativement chargés [25], est beaucoup moins fréquente [22], [24]. Ceci expliquerait la plus grande accumulation cytoplasmique des NPAu+ que les NPAu- que nous avons observé en HSI.

(iv) Enfin, la mobilité des NPAu internalisés peut être réalisée par voie symplasmique (i.e. de cytoplasme à cytoplasme) pour les deux types de NM (Figure 7, IVa et b). Cependant, ce type de transport nécessite de traverser les *plasmodesmata* (i.e les pores entre cytoplasmes). Or, il a été démontré dans une étude regardant le transport de NM d'or que des petites tailles (15nm) étaient suffisantes pour induire un blocage de ces accès [26]. Ceci expliquerait la faible mobilité des NPAu+ que nous avons observé en nano-CT.

3.4 Tester les limites de résolution spatiale de la nanotomographie aux rayons X en imageant les cellules de *Pseudomonas brassicacearum*.

Pour définir les limites de résolution spatiale de la nanotomographie aux rayons X dans l'étude des interactions des NM avec les cellules, nous avons également essayé de caractériser des organismes unicellulaires après exposition aux NMs avec des tailles de cellule inférieures à celles des racines d'*Arabidopsis thaliana*. Pour cela nous avons exposé *Pseudomonas brassicacearum* aux NPAu+ et NPAu- à 1mg.L^{-1} dans le milieu CAA pendant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées et séchées supercritiquement (se référer au chapitre II Matériels et méthodes pour plus de détails). L'acquisition des images a été réalisée en mode Haute Résolution (HRes) avec une taille de voxel de 16 nm et un temps de comptage relativement long (250s par projections 2D). Malgré cela, les images résultantes sont très peu contrastées et les reconstructions 3D peu informatives, mais l'étude des histogrammes et des coupes 2D virtuelles reste intéressante. En effet, les coupes 2D permettent de visualiser la membrane de la bactérie et de distinguer l'intérieur des cellules.

Comme illustré plus haut, l'histogramme normalisé de l'échantillon NPAu+ est différent des deux autres (échantillon témoin et bactéries exposées aux NPAu-). En effet l'histogramme ne présente pas la même contribution à faible niveau de gris. Mais aucune contribution correspondant à des voxels plus brillants (forte absorption des RX) n'apparaît. Il semble donc que les NMAu+ ne sont pas détectés, ni localisés (soit car non présents dans les cellules, soit présents mais dispersés et ne créant donc pas de contraste d'absorption des RX mesurable).

Nous nous attendions pourtant à une forte interaction électrostatique des NPAu+ avec les membranes cellulaires bactériennes, et donc à une accumulation des NPAu+. Il est très probable que ces interactions aient été modifiées durant les étapes de déshydratation et de séchage en point supercritique des échantillons.

L'histogramme normalisé du volume reconstruit des bactéries exposées aux NPAu- montre l'apparition d'une contribution avec un niveau de gris plus élevé, par rapport à l'histogramme du volume de l'échantillon témoin (voir Figure 5.C.). On peut attribuer la brillance de ces

voxels à la présence de NM qui absorbent plus fortement les RX que les bactéries ou l'air. Cependant, cette contribution reste faible et la normalisation de l'histogramme n'est pas pleinement satisfaisante (notamment à cause de la contribution à faible niveau de gris), il est donc possible que la contribution à niveau de gris élevé soit dû à un artefact de reconstruction des volumes et non à la présence de NPAu- dans les voxels.

Dans une première approche exploratoire, les voxels correspondant à des valeurs d'absorption des rayons X supérieurs au seuil défini sur les histogrammes normalisés ont tout de même été représentés en rouge (Figure 8). Si ces voxels correspondent bien aux NM, ils sont tous localisés dans les membranes bactériennes et semblent être présents dans leur périplasme (i.e. espace entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe des bactéries Gram négatif). Des observations similaires avec des NM d'or enrobés avec des molécules cationiques en contact avec des bactéries Gram négatif ont été faites par d'autres auteurs. [27] Cependant, nos doutes sur la qualité de la reconstruction des échantillons au vue des histogrammes normalisés ne permettent pas, à ce stade, de conclure de façon claire quand à l'internalisation des NPAu dans les cellules bactériennes de *Pseudomonas brassicacearum*. Pour des cellules de cette taille, il semble nécessaire d'améliorer encore le protocole d'acquisition des données en nano-CT en utilisant par exemple un support différent, en réalisant des temps de comptage plus courts, ou en améliorant le procédé de reconstruction des volumes.

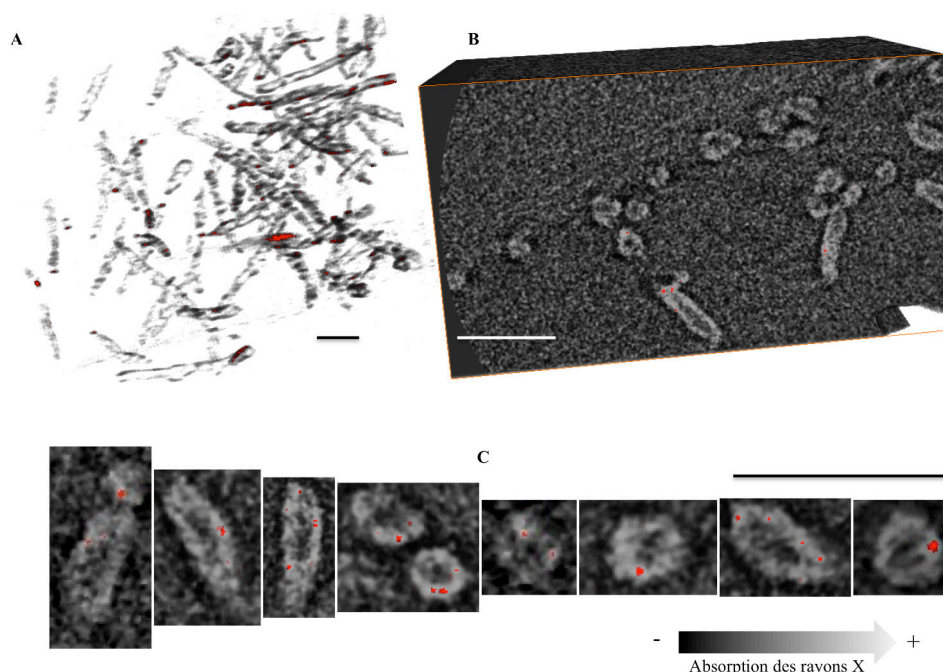


Figure 8 : (A) Reconstruction volumique de *Pseudomonas brassicacearum* exposées aux NPAu-. Image obtenue en nanotomographie aux rayons X en très haute résolution (50 nm). La distribution des NPAu- au sein des bactéries est représentée par les voxels seuillés et colorés en rouges. Des coupes 2D virtuelles extraites de (A) sont représentées en (B) et (C). Echelles 2µm.

4 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre consacré à l'étude des interactions entre des NPAu d'or de 12 nm avec les racines d'*Arabidopsis thaliana* et les cellules de *Pseudomonas brassicacearum*, nous avons montré que

- L'imagerie hyperspectrale (HSI) permet d'observer l'internalisation de NM. La résolution spatiale et spectrale de cette technique permettent de différencier l'accumulation des NPAu dans la paroi cellulaire de leur internalisation dans le cytoplasme.
- La nanotomographie aux rayons X (nano-CT) permet de visualiser en 3D des organismes et de faire des coupes virtuelles en 2D pour imager les architectures cellulaires.
- La nano-CT a permis de montrer l'internalisation de tous les types de NPAu dans le modèle racinaire. Le champ de vision relativement grand offert par la nano-CT, sa résolution spatiale et la visualisation en 3D de l'échantillon nous ont permis d'observer des mobilités différentes entre NPAu- et NPAu+.
- Il est possible d'imager en 3D et à l'échelle nanométrique des cellules bactériennes à l'aide de la nano-CT. L'absence d'étape de coloration et sans autre préparation que le séchage permettent de minimiser les artefacts
- Une internalisation des NPAu- semble avoir été observée dans le periplasme des membranes bactériennes, mais ces observations restent à confirmer.

Chacun de ces deux outils présente des avantages et des inconvénients détaillés ci-dessous.

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques techniques de la microscopie à champs sombre couplée à de l'imagerie hyperspectrale (HSI) et de la nanotomographie aux rayons X (nano-CT).

Caractéristiques		HIS	Nano-CT
Préparation des échantillons	Séchage (temps)	aucun	Oui (plusieurs heures)
	Risque de modification des échantillons	Non	Oui (déshydratation + séchage)
	Destruction de l'échantillon analysé	Non (mais risque de séchage durant l'analyse et de perte de l'intégrité sous lamelle)	Non, mais échantillon sec.
Caractéristiques techniques	Temps d'acquisition des données	Plusieurs minutes	Plusieurs dizaines d'heures
	Résolution spatiale	Une dizaine de nm (seul le signal de diffusion de la lumière est détecté)	Environ 300 nm en LFOV et 150 nm en HRes
	Information en 3D	Développé depuis peu, basés sur l'acquisition d'image en plusieurs plans focaux	Oui, et permet de réaliser des coupes 2D virtuelles de l'échantillon (en post-traitement)
	Spécificité du signal lié aux NM	Oui (tellement spécifique que faux négatifs probables)	Non (tellement général que risque de faux positifs)

La HSI a le très grand avantage de ne nécessiter **aucune préparation de l'échantillon** autre que le rinçage des racines et leur mise sous lame et lamelle. Ses très bonnes limites de résolution spatiale et spectrale permettent de visualiser et de détecter des NM individuels dans des matrices complexes. De plus, la cartographie de composés grâce à l'analyse spectrale donne une indication robuste (pour peu que les bons contrôles soient réalisés) de la composition des matériaux observés. Cependant, cette cartographie est limitée aux spectres connus choisis préalablement à l'étude, et les transformations chimiques, les agglomérations, l'adsorption (...) des NM peut induire de mauvaises interprétations. Une autre méthode de détection des NM basée sur l'acquisition de spectres dans des régions d'intérêt pourrait être envisagée. Enfin, des améliorations récentes de la HSI permettent une reconstruction numérique 3D de volumes après l'acquisitions d'images en plusieurs plan focaux.

La nano-CT a pour avantage de fournir une information en 3 dimensions des volumes étudiés. Les coupes 2D virtuelles des tissus, extraites en post-traitement, sont un outil puissant pour l'étude du vivant. De plus, cette technique, en comparaison avec le MET, permet d'obtenir des images sans étapes de coloration (utilisée pour rehausser le contraste), de mise en résine et de coupe en lame mince des échantillons. Si la nano-CT est moins sensible aux NM individuels que le HSI, elle permet d'obtenir une vision globale et en volume de l'échantillon.

Ce chapitre démontre que ces deux techniques récentes sont de puissants outils complémentaires pour étudier les interactions NM-vivant, qui nous ont permis de différencier des comportements d'internalisation et de mobilité des NPAu en fonction de leur charge dans les racines d'*A. thaliana*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] E. J. Petersen, T. B. Henry, J. Zhao, R. I. MacCuspie, T. L. Kirschling, M. A. Dobrovolskaia, V. Hackley, B. Xing, et J. C. White, « Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements », *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 8, p. 4226-4246, avr. 2014.
- [2] F. Schwab, G. Zhai, M. Kern, A. Turner, J. L. Schnoor, et M. R. Wiesner, « Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review », *Nanotoxicology*, p. 1-22, juin 2015.
- [3] J. Ayache, L. Beaunier, J. Boumendil, G. Ehret, et D. Laub, « Artifacts in Transmission Electron Microscopy », in *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*, Springer New York, 2010, p. 125-170.
- [4] S. P. Ravindranath, K. L. Henne, D. K. Thompson, et J. Irudayaraj, « Surface-Enhanced Raman Imaging of Intracellular Bioreduction of Chromate in *Shewanella oneidensis* », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 2, p. e16634, févr. 2011.
- [5] J. D. Judy, J. M. Unrine, W. Rao, S. Wirick, et P. M. Bertsch, « Bioavailability of Gold Nanomaterials to Plants: Importance of Particle Size and Surface Coating », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 15, p. 8467-8474, août 2012.
- [6] A. R. Badireddy, M. R. Wiesner, et J. Liu, « Detection, Characterization, and Abundance of Engineered Nanoparticles in Complex Waters by Hyperspectral Imagery with Enhanced Darkfield Microscopy », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 18, p. 10081-10088, sept. 2012.
- [7] R. C. Murdock et S. M. Hussain, « Radio Frequency Controlled Stimulation of Intracellular Gold or Silver Nanoparticle Conjugates for Use as Potential Sensors or Modulators of Biological Function », sept. 2010.
- [8] M. A. Vetten, N. Tlotleng, D. Tanner Rascher, A. Skepu, F. K. Keter, K. Boodhia, L.-A. Koekemoer, C. Andraos, R. Tshikhudo, et M. Gulumian, « Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, p. 50, 2013.
- [9] M. Mortimer, A. Gogos, N. Bartolomé, A. Kahru, T. D. Bucheli, et V. I. Slaveykova, « Potential of Hyperspectral Imaging Microscopy for Semi-quantitative Analysis of Nanoparticle Uptake by Protozoa », *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 15, p. 8760-8767, août 2014.
- [10] A. R. Badireddy, J. Farner Budarz, S. M. Marinakos, S. Chellam, et M. R. Wiesner, « Formation of Silver Nanoparticles in Visible Light-Illuminated Waters: Mechanism and Possible Impacts on the Persistence of AgNPs and Bacterial Lysis », *Environmental Engineering Science*, vol. 31, n° 7, p. 338-349, juin 2014.
- [11] K. W. H. Kwok, M. Auffan, A. R. Badireddy, C. M. Nelson, M. R. Wiesner, A. Chilkoti, J. Liu, S. M. Marinakos, et D. E. Hinton, « Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Effect of coating materials », *Aquatic Toxicology*, vol. 120-121, p. 59-66, sept. 2012.
- [12] J. N. Meyer, C. A. Lord, X. Y. Yang, E. A. Turner, A. R. Badireddy, S. M. Marinakos, A. Chilkoti, M. R. Wiesner, et M. Auffan, « Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans* », *Aquatic Toxicology*, vol. 100, n° 2, p. 140-150, oct. 2010.
- [13] L. Di Laurenzio, J. Wysocka-Diller, J. E. Malamy, L. Pysh, Y. Helariutta, G. Freshour, M. G. Hahn, K. A. Feldmann, et P. N. Benfey, « The SCARECROW Gene Regulates an

- Asymmetric Cell Division That Is Essential for Generating the Radial Organization of the Arabidopsis Root », *Cell*, vol. 86, n° 3, p. 423-433, août 1996.
- [14] A. Driouich, M.-L. Follet-Gueye, M. Vicré-Gibouin, et M. Hawes, « Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense », *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 16, n° 4, p. 489-495, août 2013.
- [15] P. Bleuet, P. Cloetens, P. Gergaud, D. Mariolle, N. Chevalier, R. Tucoulou, J. Susini, et A. Chabli, « A hard x-ray nanoprobe for scanning and projection nanotomography », *Review of Scientific Instruments*, vol. 80, n° 5, p. 056101, mai 2009.
- [16] P. A. Midgley, E. P. W. Ward, A. B. Hungria, et J. M. Thomas, « Nanotomography in the chemical, biological and materials sciences », *Chemical Society Reviews*, vol. 36, n° 9, p. 1477-1494, juill. 2007.
- [17] Z.-J. Zhu, H. Wang, B. Yan, H. Zheng, Y. Jiang, O. R. Miranda, V. M. Rotello, B. Xing, et R. W. Vachet, « Effect of Surface Charge on the Uptake and Distribution of Gold Nanoparticles in Four Plant Species », *Environmental Science & Technology*, vol. 46, n° 22, p. 12391-12398, nov. 2012.
- [18] N. R. Meychik et I. P. Yermakov, « Ion exchange properties of plant root cell walls », *Plant and Soil*, vol. 234, n° 2, p. 181-193, juill. 2001.
- [19] J. Wang, Y. Yang, H. Zhu, J. Braam, J. L. Schnoor, et P. J. J. Alvarez, « Uptake, translocation, and transformation of quantum dots with cationic versus anionic coatings by *Populus deltoides* × *nigra* cuttings », *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 12, p. 6754-6762, juin 2014.
- [20] null Fleischer, null O'Neill, et null Ehwald, « The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II », *Plant Physiology*, vol. 121, n° 3, p. 829-838, nov. 1999.
- [21] G. Sarret, E. A. H. Pilon Smits, H. Castillo Michel, M. P. Isaure, F. J. Zhao, et R. Tappero, « Use of synchrotron-based techniques to elucidate metal uptake and metabolism in plants », *Adv. Agron*, vol. 119, p. 1-82, 2013.
- [22] E. Etxeberria, P. Gonzalez, E. Baroja-Fernandez, et J. P. Romero, « Fluid Phase Endocytic Uptake of Artificial Nano-Spheres and Fluorescent Quantum Dots by Sycamore Cultured Cells », *Plant Signaling & Behavior*, vol. 1, n° 4, p. 196-200, 2006.
- [23] A. Moscatelli, F. Ciampolini, S. Rodighiero, E. Onelli, M. Cresti, N. Santo, et A. Idilli, « Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold », *Journal of Cell Science*, vol. 120, n° Pt 21, p. 3804-3819, nov. 2007.
- [24] J. Šamaj, Éd., *Endocytosis in Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [25] E. Onelli, C. Prescianotto-Baschong, M. Caccianiga, et A. Moscatelli, « Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold », *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, n° 11, p. 3051-3068, août 2008.
- [26] G. Zhai, K. S. Walters, D. W. Peate, P. J. J. Alvarez, et J. L. Schnoor, « Transport of Gold Nanoparticles through Plasmodesmata and Precipitation of Gold Ions in Woody Poplar », *Environmental Science & Technology Letters*, vol. 1, n° 2, p. 146-151, févr. 2014.
- [27] Z. V. Feng, I. L. Gunsolus, T. A. Qiu, K. R. Hurley, L. H. Nyberg, H. Frew, K. P. Johnson, A. M. Vartanian, L. M. Jacob, S. E. Lohse, M. D. Torelli, R. J. Hamers, C. J. Murphy, et C. L. Haynes, « Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria », *Chemical Science*, vol. 6, n° 9, p. 5186-5196, août 2015.

Chapitre VII : Conclusions générales et perspectives

SOMMAIRE

Chapitre VII : Conclusions générales et perspectives	223
1 La synthèse de Ge-imogolites à caractéristiques contrôlées	223
1.1 Variation de la longueur, du nombre de parois et de la cristallinité.....	223
1.1 Synthèse de tubes micrométriques et réduction du temps de croissance	224
1.1 L'incorporation de Fe dans la structure.....	225
1.2 Perspectives	225
2 Les interactions NM/cellules.....	225
2.1 La modification des effets toxiques des Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques contrôlées	225
2.1.1 La morphologie	226
2.1.2 Les défauts structuraux.....	227
2.1.3 Le dopage en fer	227
2.2 Les mécanismes d'internalisations des NM dans les organismes	228
2.3 Perspectives	229
Références bibliographiques	232

Chapitre VII : Conclusions générales et perspectives

Les études qui essaient de prédire les effets toxiques des nanomatériaux se heurtent à de grandes quantités de données, parfois contradictoires, souvent non comparables entre elles. L'hétérogénéité des résultats est le plus souvent due à la variation des conditions expérimentales, à l'observation de réponses biologiques différentes, et/ou d'échantillons de nanomatériaux aux caractéristiques physico-chimiques mal définies, variables ou présentant des contaminations (de présence de précurseurs, de résidus de synthèse, de cosynthèse de produits...).

Partant de ce constat, cette étude a pour but d'étudier si, dans un système bien contrôlé, il est possible de suivre des modifications de toxicités liées à des paramètres physico-chimiques particuliers. Certains paramètres de l'étude ont été fixés, tels que les conditions de culture (temps d'exposition, milieu de culture, températures...) et le type d'organisme étudié (la bactérie des sols *Pseudomonas brassicacearum*). Un nanomatériau modèle, les Ge-imogolites, a été choisi pour l'étude des toxicités induites. Ce choix a été orienté par la bonne connaissance des conditions de synthèse permettant l'obtention de nanotubes à caractéristiques physico-chimiques contrôlées. L'objectif principal de cette étude était de traiter de cette problématique :

Peut-on relier certaines propriétés physico-chimiques des NMs à des effets biologiques spécifiques ?

Pour répondre à cette question, ce travail s'est articulé autour de deux étapes d'études principales ; (i) la synthèse et la caractérisation de Ge-imogolites en se basant sur des études déjà existantes, ou en élaborant de nouveaux protocoles pour l'obtention de nouvelles structures (ii) l'étude des réponses biologiques et des interactions avec les bactéries des sols exposées à ces Ge-imogolites.

1 La synthèse de Ge-imogolites à caractéristiques contrôlées

1.1 Variation de la longueur, du nombre de parois et de la cristallinité

Nous avons montré dans les travaux de cette thèse la bonne connaissance des conditions de synthèse et des structures de Ge-imogolites qui en résultent. Aussi, nous avons synthétisé, en nous basant sur les travaux issus de la littérature, des Ge-imogolites à simple paroi (SW) bien

cristallisées ou lacunaires (SWlac) ainsi qu'à doubles parois (DW). Ces composés ont ensuite été purifiés afin d'enrichir des sous-fractions en particules longues et courtes (seuil de filtration à 200nm).

La caractérisation multi-échelle de ces composés montre qu'il est possible de contrôler le nombre de parois, la longueur et la cristallinité des Ge-imogolites, et de faire varier ces paramètres un à un.

Il a été identifié dans la littérature que le rapport d'aspect des NM, ainsi que la présence d'impuretés métalliques dans leurs structures pouvaient être impliqués dans la modification des toxicités des matériaux. Aussi, nous avons cherché à établir de **nouveaux protocoles** pour synthétiser des Ge-imogolites (i) de longueurs micrométriques et (ii) à chimie variable en dopant la structure en fer.

1.1 Synthèse de tubes micrométriques et réduction du temps de croissance

Au début de cette étude, les protocoles de synthèse publiés permettaient d'obtenir des Ge-imogolites d'une longueur maximale d'une centaine de nanomètres maximum et nécessitaient *a minima* 4 jours de chauffe. Aussi, nous cherchions un nouveau protocole permettant d'améliorer la cinétique de fermeture des proto-imogolites et/ou d'augmenter les probabilités de rencontre de tubes courts, permettant (i) de synthétiser des tubes plus longs et (ii) en des temps plus courts. La croissance des proto-imogolites sous irradiation micro-onde a permis l'obtention de tubes micrométriques en des temps très courts. Nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes d'accélération de la cinétique de croissance sont (i) l'alignement des particules sous champs électriques permettant une plus grande probabilité de chocs efficaces entre les tubes, (ii) l'augmentation de la réactivité et de la mobilité des proto-imogolites, s'assemblant avec les bords de tubes et favorisant leur élongation.

En parallèle de cette étude, des DW de tailles micrométriques (DW μ m) avec une étape d'hydrolyse à l'urée a été décrite [1]. Pour des raisons pratiques, c'est ce protocole qui a été utilisé pour les tests de toxicités.

Réaliser l'étape de croissance des Ge-imogolites sous irradiation micro-ondes a permis l'obtention de nanotubes de longueur micrométriques en seulement 2h.

1.1 L'incorporation de Fe dans la structure

La stratégie pour l'incorporation de fer dans la structure des Ge-imogolites était de les substituer à des atomes d'Al en ajoutant du Fe(II) monomérique à la suspension de réactifs initiale. L'étude de la spéciation du fer a montré que pour 1% de substitution des atomes d'Al par du Fe, tout le fer était inclus dans la structure des Ge-imogolites, sans co-précipitation de phases secondaires telles que des oxy-hydroxydes de fer. Il a également été démontré que l'inclusion de ces atomes de Fe dans la structure entraîne la création d'une lacune d'Al dans son voisinage.

Il a été obtenu des Ge-imogolite dopées en fer à hauteur de 1% de substitution des atomes d'aluminium.

Augmenter la concentration initiale de Fe(II) permet jusqu'à 3% de substitution des atomes d'Al par du Fe, mais est associé à la co-précipitation d'oxy-hydroxydes de fer.

1.2 Perspectives

Du point de vue des propriétés des Ge-imogolites, ces matériaux sont prometteurs. Plusieurs études, aujourd'hui en cours de réalisation, essaient d'orienter et d'assembler les Ge-imogolites dans le but de concevoir des membranes de filtration aux porosités contrôlées, permettant une rétention physique et chimique des polluants. Ces chercheurs cherchent à mettre à profit les caractéristiques morphologies des Ge-imogolites (notamment le contrôle de leur diamètre [2]) et la grande capacité d'adsorption spécifique de certains métaux (comme démontré dans le cas des Si-imogolites avec le Cd, le Cu, le Zn ou le Pb [3], [4]).

Notre nouveau protocole de croissance sous irradiation MW permettant leur synthèse rapide ouvre une nouvelle voie pour faciliter leur utilisation et exploiter leurs propriétés.

2 Les interactions NM/cellules

2.1 La modification des effets toxiques des Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques contrôlées

Un schéma présentant un résumé des résultats obtenus et des mécanismes biologiques principaux est proposé en Figure 1.

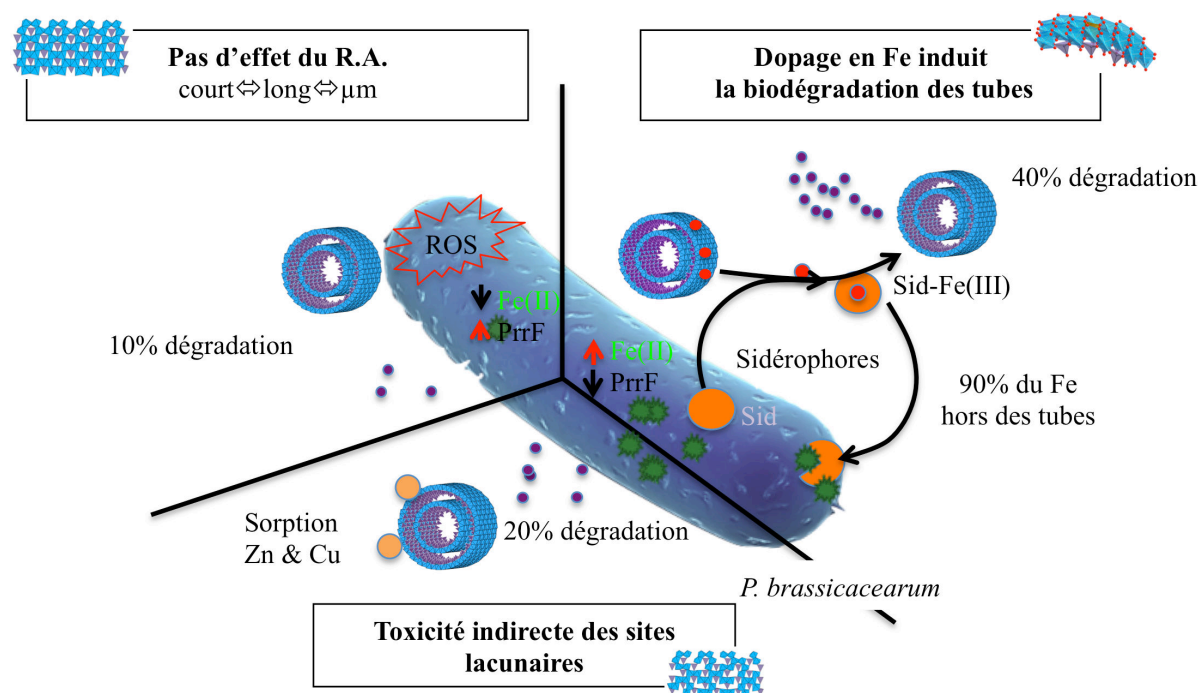


Figure 1 : Schéma des mécanismes de toxicités modifiés par certains paramètres physico-chimiques des Ge-imogolites chez *Pseudomonas brassicacearum*. ROS : Reactive Oxygen Species.

2.1.1 La morphologie

L'utilisation de protocoles de synthèse issus de la littérature ou de l'élaboration de nouveaux protocoles a permis d'obtenir des lots de Ge-imogolites à (i) nombre de parois (SW et DW), (ii) longueurs (nanométriques courtes et longues ou micrométriques), (iii) cristallinité (lacunes) et (iv) compositions chimiques (dopage en fer) différentes. Les modifications de toxicité des Ge-imogolites dues aux variations de ces paramètres étudiés un à un, ont été monitoré sur la bactérie des sols *Pseudomonas brassicacearum*.

Pour des systèmes bien cristallisés, nous avons montré que les DW interagissent fortement avec *P. brassicacearum*, formant des hétéro-agrégats. Ce contact induit une plus grande production d'espèces réactives de l'oxygène, un relargage du Fe hors de la cellule et une diminution (d'environ un ordre de grandeur pour les plus grandes concentrations) de la croissance des bactéries.

La comparaison des effets de Ge-imogolites bien cristallisées à nombre de parois et à longueurs variables indique que **ni le nombre de parois, ni la longueur des tubes** n'influe sur la croissance de *P. brassicacearum*. Seul le **nombre de tubes** auxquelles sont exposées *P. brassicacearum* diminue cette croissance. Etant donné que cette diminution de croissance n'est pas directement corrélée à la surface (i.e proportionnelle à la concentration) de tubes auxquelles les bactéries sont exposées, nous en avons déduit que

Pour des Ge-imogolites bien cristallisées, la croissance de *Pseudomonas brassicacearum* est modifiée par la quantité de bordures de tubes, qui portent les sites les plus réactifs.

2.1.2 Les défauts structuraux

Nous avons ainsi voulu étudier l'influence de ce type de sites réactifs sur la toxicité des Ge-imogolites. Lorsque des défauts structuraux sont présents dans les tubes (30% de sites lacunaires dans la couche de gibbsite) la croissance bactérienne est stoppée, et le nombre de bactéries après 24h est le même que celui de l'inoculum de départ. L'agrégation des tubes et des bactéries n'est plus observée, malgré l'augmentation du nombre de sites chargés positivement sur les parois des tubes. Le haut taux de lacunes induit une fragilité des tubes et 20% de dégradation. De plus, des éléments nutritifs essentiels à la croissance des bactéries, comme le zinc et le cuivre sont sorbés sur les Ge-imogolites lacunaires. Les concentrations notamment en cuivre non associé aux SWlac sont proches de celles pour lesquelles une carence en Cu pour d'autres espèces de bactéries a été observée. Nous avons ainsi démontré que

Les forts effets toxiques et/ou d'inhibition de la croissance de *P. brassicacearum* dus aux tubes lacunaires sont indirects, induits par l'appauvrissement du milieu en éléments nutritifs essentiels et certainement à un stress dû à l'Al et/ou au Ge dissous.

2.1.3 Le dopage en fer

Enfin, lorsque les tubes sont dopés en fer (Fe-imogolites), la croissance de *P. brassicacearum* est améliorée d'un ordre de grandeur. La production de ROS dans la cellule n'augmente pas, et le taux de fer dans la cellule est optimal. Ceci est corrélé à la récupération de 90% du Fe initialement présent dans les Fe-imogolites par les bactéries, et à une dégradation de 40% des tubes. Il n'a cependant pas été possible de déterminer si cette dégradation induit une dissolution et/ou la destruction des Ge-imogolites en tubes courts. Ces effets sont observés même si le contact direct entre les Ge-imogolites dopées en Fe et les bactéries est évité. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que *P. brassicacearum* est capable de chélater le fer présent dans les Fe-imogolites à distance et de l'utiliser pour son métabolisme *via* l'émission de sidérophores.

Les Fe-imogolites deviennent source de Fe pour *P. brassicacearum*, et promoteur de sa croissance. Il en résulte une biodégradation des nanotubes.

A notre connaissance, cette étude est la première à faire varier tous ces paramètres physico-chimiques un à un pour étudier leur influence dans l'induction d'effets biologiques d'un nanomatériau. Cette étude montre que **maîtriser finement la synthèse de nanomatériaux, et donc contrôler leur structure permet l'étude précise de leurs effets toxiques (ou bénéfiques)**. Si ces résultats ne sont pas extrapolables à d'autres nanomatériaux ou à d'autres modèles biologiques, il ne fait aucun doute que cette démarche est celle à adopter pour aider, à terme, à prévoir les effets et le devenir des NM dans l'environnement.

2.2 Les mécanismes d'internalisations des NM dans les organismes

Ces études de la toxicité des Ge-imogolites pour *P. brassicacearum* illustrent l'importance qu'ont les interactions NM/cellules dans l'induction d'effets toxiques. Et si nous avons montré dans plusieurs cas l'interaction forte des Ge-imogolites avec les cellules bactériennes, nous n'avons pas pu aller plus avant dans les mécanismes d'interaction. A ce jour, les outils pour la visualisation de l'internalisation des NM dans les cellules et des mécanismes de leur transfert dans les organismes est sujet à débat, puisque les outils pour leur visualisation nécessitent des étapes de préparation lourdes qui peuvent induire l'apparition d'artefacts.

Dans ce contexte, la microscopie à champ noir couplée à l'analyse hyperspectrale (HSI) ainsi que la nanotomographie aux rayons X (nano-CT) ont été utilisées pour tester la visualisation de l'internalisation des NM et de leur transfert dans les organismes. Pour tester ces outils, des conditions expérimentales simples i.e. l'utilisation de plants d'*Arabidopsis thaliana* (grosses cellules, rigides) et de nanoparticules d'or de 12nm (contrastant avec les rayons X et avec une signature hyperspectrale particulière) de charges différentes. Cette étude nous a permis de montrer que ces deux outils **permettent de visualiser les NM dans les racines et de les localiser dans des compartiments cellulaires particuliers**

La HSI permet la **visualisation de l'accumulation de NM** dans la paroi cellulaire et/ou dans le cytoplasme des cellules

La nano-CT permet l'étude d'un grand volume d'échantillon et permet d'avoir des informations complémentaires sur **la mobilité des nanomatériaux dans les tissus**.

Les études en HSI des interactions Ge-imogolites/cellules bactériennes réalisées dans plusieurs des études décrites dans ce manuscrit ne permettent pas de visualiser une internalisation des NM, du fait de la trop petite épaisseur des cellules bactériennes. Il n'était pas possible de réaliser des plans focaux au milieu des cellules. Cependant, la nano-CT a permis l'étude de l'interaction des NM d'or avec *Pseudomonas brassicacearum*. il a ainsi été montré que

La HSI ne permet pas à ce jour de distinguer l'adsorption de l'internalisation des NM dans les bactéries

La nano-CT permet la visualisation en 3 dimensions des cellules bactériennes

Dans les essais que nous avons réalisés il semble que les NM d'or chargés négativement aient été internalisés dans *P. brassicacearum*. Cependant, des mouvements pendant les scans des échantillons témoins n'ont pas pu être corrigés correctement, et il n'a pas été possible d'établir une conclusion certaine quand à cette internalisation.

Des travaux complémentaires devraient permettre de lever cette incertitude

2.3 Perspectives

L'étude de la modification de la toxicité des Ge-imogolites à paramètres physico-chimiques contrôlés envers *Pseudomonas brassicacearum* a permis d'identifier des mécanismes de toxicité spécifiques.

Nous avons constaté que la **réactivité des sites** en contact avec l'environnement, présents en bordures de tubes ou dans des défauts structuraux est déterminante dans l'induction d'évènements toxiques, **qu'ils soient directs ou indirects**.

Il est important de noter que la modification de ces toxicités est corrélée à des taux de dégradation variables des Ge-imogolites. Si les Ge-imogolites bien cristallisées se dégradent à hauteur de 5 à 10% dans les milieux de cultures, ce taux augmente pour les Ge-imogolites présentant des défauts structuraux (20%) et ceux dopés en fer (40%).

Dans le cas des SWlac, cette dégradation est associée à la sorption d'éléments nutritifs essentiels, et une potentielle toxicité de l'Al et du Ge dissous induisant une forte diminution de croissance. Pourtant, bien que plus d'atomes d'Al et de Ge traversent la membrane de dialyse dans le cas des Fe-imogolites, nous n'observons pas ces phénomènes toxiques.

Comment se fait-il que la dégradation des Ge-imogolites soit corrélée, dans un cas une forte toxicité, et dans l'autre à une promotion de la croissance de *Pseudomonas brassicacearum*?

Les taux de dégradation ont été estimés en suivant l'augmentation des concentrations des éléments Al et Ge à l'extérieur d'une membrane de dialyse de 10kDa. Cette porosité correspond à un seuil de coupure d'environ 4nm et ne permet pas de déterminer si ces éléments sont (i) sous forme dissoute, (ii) les composés de tubes courts ou dégradés, ou (iii) associés à des chélateurs comme les sidérophores.

Afin de comprendre ces effets toxiques différents, il semble indispensable d'étudier **la spéciation** des résidus de dégradation.

Sont-ils sous forme d'ions dissous ? Dans ce cas la toxicité observée des SWlac relèverait de la toxicité des ions relargués en solutions, étudiée depuis plusieurs années dans la littérature (notamment dans le cas de l'Al).

Sont-ils sous forme de tubes ? (tubes courts, ou morceaux de tubes inférieurs au seuil de coupure de 10kDa). Si tel est le cas, comment ces particules interagissent-elles avec les cellules ? Comment distinguer leur adsorption de leur internalisation pour ces gammes de tailles ? Si nous avons montré dans cette étude que de nouveaux outils permettent de répondre à certaines de ces questions, il reste des défis analytiques qui doivent être surmontés pour pouvoir étudier ces mécanismes finement, sans introduire d'artefacts.

Sont-ils complexés aux sidérophores ? Nous avons émis l'hypothèse que le Fe issu des Fe-imo était complexé (à 90%) par des sidérophores, et en partie utilisé pour le métabolisme de *Pseudomonas brassicacearum*. Il est connu que les complexe Fe(III)-sidérophores se lient à des récepteurs membranaires spécifiques induisant leur internalisation, la dissociation du Fe et des sidérophores dans le cytosol, et le recyclage des sidérophores, réémis dans l'environnement [5].

Il a également été décrit que les sidérophores étaient capable de complexer l'Al, le Si, le Ge, ou encore le Ti [6], [7]. Si les constantes d'affinité des sidérophores avec ces cations ne sont certainement pas du même ordre de grandeur, il est très probable qu'ils puissent jouer un rôle dans la dissolution des NM.

Cependant, si les sidérophores se complexent avec les Al dans la structure des Ge-imogolites et induisent leur dissolution, *quid* de leur devenir ? Sont-ils internalisés par les bactéries, devenant promoteurs d'une toxicité due à l'Al ? Si tel était le cas, nous aurions certainement observé une toxicité accrue lors de nos expériences avec Fe-imo subissant une grande dégradation en milieu biotique. Les récepteurs membranaires impliqués dans l'internalisation des complexes Fe(III)-sidérophores [8]–[10] sont-ils spécifiques à la nature du ligand lié au sidérophore ?

Ces phénomènes sont très peu étudiés dans la dégradation des NM. Pourtant les sidérophores sont ubiquitaires dans l'environnement, émis par plusieurs organismes comme les bactéries, mais également les plantes, les champignons, les levures ou certaines algues [10], [11]. Aussi les sidérophores pourraient-êtr e un paramètre important de la dégradation des NM dans l'environnement et la modification de leur toxicité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M.-S. Amara, E. Paineau, M. Bacia-Verloop, M.-E. M. Krapf, P. Davidson, L. Belloni, C. Levard, J. Rose, P. Launois, et A. Thill, « Single-step formation of micron long (OH)₃Al₂O₃Ge(OH) imogolite-like nanotubes », *Chemical Communications*, vol. 49, n° 96, p. 11284-11286, déc. 2013.
- [2] A. Thill, P. Mailliet, B. Guiose, O. Spalla, L. Belloni, P. Chaurand, M. Auffan, L. Olivi, et J. Rose, « Physico-chemical Control over the Single- or Double-Wall Structure of Aluminogermanate Imogolite-like Nanotubes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, n° 8, p. 3780-3786, févr. 2012.
- [3] L. Denaix, I. Lamy, et J. Y. Bottero, « Structure and affinity towards Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ of synthetic colloidal amorphous aluminosilicates and their precursors », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 158, n° 3, p. 315-325, nov. 1999.
- [4] C. J. Clark et M. B. McBride, « Cation and anion retention by natural and synthetic allophane and imogolite », *Clays Clay Miner*, vol. 32, n° 4, p. 291-299, 1984.
- [5] S. C. Andrews, A. K. Robinson, et F. Rodríguez-Quíñones, « Bacterial iron homeostasis », *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, n° 2-3, p. 215-237, juin 2003.
- [6] T. Baramov, K. Keijzer, E. Irran, E. Mösker, M.-H. Baik, et R. Süssmuth, « Synthesis and Structural Characterization of Hexacoordinate Silicon, Germanium, and Titanium Complexes of the E. coli Siderophore Enterobactin », *Chemistry – A European Journal*, vol. 19, n° 32, p. 10536-10542, août 2013.
- [7] C. Ferret, T. Sterckeman, J.-Y. Cornu, S. Gangloff, I. J. Schalk, et V. A. Geoffroy, « Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas* », *Environmental Microbiology Reports*, vol. 6, n° 5, p. 459-467, oct. 2014.
- [8] D. Cobessi, H. Celia, et F. Pattus, « Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa* », *Journal of Molecular Biology*, vol. 352, n° 4, p. 893-904, sept. 2005.
- [9] D. Cobessi, H. Celia, N. Folschweiller, I. J. Schalk, M. A. Abdallah, et F. Pattus, « The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution », *Journal of Molecular Biology*, vol. 347, n° 1, p. 121-134, mars 2005.
- [10] R. C. Hider et X. Kong, « Chemistry and biology of siderophores », *Natural Product Reports*, vol. 27, n° 5, p. 637-657, avr. 2010.
- [11] W. Schmidt, « Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants », *New Phytologist*, vol. 141, n° 1, p. 1-26, 1999.

Liste des Figures et des Tableaux

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Comprendre la toxicité des nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles. Etat de l'art et Objectifs.

Figure 1 : Coupe romaine de Lycurgus datant du IV ^e siècle avant J.C.	7
Figure 2 : Vers une nouvelle définition des nanomatériaux inorganiques? Il semble qu'il y ai une limite de taille de 30nm montrant (A) que la plupart des études identifient un effet nano spécifique pour des tailles inférieures à 30nm. (B) à ce seuil de taille, environ 20% des atomes à minima se trouvent être en surface. (C) dans le cas particulier de nanoparticules d'oxydes de fer, leur réarrangement atomique et leur réactivité vis-à-vis de l'arsenic est différent pour des nanoparticules de 6nm en comparaison à des tailles supérieures à 100nm. Figure adaptée de Auffan et coll. 2009 [8].....	9
Figure 3 : Production annuelle (en tonnes/an) de différents nanomatériaux dans le monde (boîtes blanches) et en Europe (boîtes grises) d'après les données collectées par Piccinno et coll. en 2012[9]. La valeur médiane et les quantiles 25/75 sont représentés....	10
Figure 4 : Etapes du cycle de vie d'un produit de construction et cibles exposées d'après Sun et coll. [10], https://www.saint-gobain.com et http://fr.123rf.com	11
Figure 5 : Illustration des mécanismes de génération de ROS par les NM dans les cellules. Figure issue de Moos et Slaveykova, 2014 [28].....	15
Figure 6 : Propriétés des nanomatériaux pouvant induire différents mécanismes physico-chimiques à la surface des nanomatériaux impliqués dans les mécanismes de toxicité (figure adaptée de Hassellöv et coll. 2008 [64] et Auffan et coll. 2009[8]). Chacune de ces propriétés physico-chimiques intrinsèques aux nanomatériaux peut influencer leur devenir dans l'environnement et les réponses toxiques qu'ils induisent.....	19
Figure 7: Structure de l'imogolite proposée par Cradwick et coll. en 1972 [77].	23
Figure 8 : Protocole et description des étapes de synthèse des Ge-imogolite comme décrit par Levard et coll. 2008 [86].	24
Figure 9 : Etapes de synthèses et mécanismes d'obtention préférentielle de SW ou de DW imogolites. Adapté de Thill et collaborateurs [88]. Après le mélange et l'hydrolyse des	

précurseurs sont formés les proto-imogolites. En fonction des concentrations initiales en réactif, ces proto-imogolites vont s'organiser en doubles tuiles ou rester isolée. Ce sont ces (non)-assemblage qui mèneront à la formation de SW ou DW. Image obtenue avec un Microscope électronique à transmission par Maillet et collaborateurs [87].....	26
Figure 10 : Modèle structural d'une Ge-imogolite mal cristallisée (à gauche) ou bien cristallisée (à droite). Bleu : octaèdres d'aluminium ; violet : tétraèdres de silicium issu de Levard et collaborateurs [89]. Ces modèles structuraux sont basés sur résultats des spectres d'absorption des rayons X (EXAFS) au seuil du germanium.	27
Figure 11 : Image AFM des Ge-imogolites micrométriquement longues, obtenues grâce au nouveau protocole de Amara et collaborateurs [90]. Utiliser de l'urée comme source d'hydroxyles et chauffer la solution à 140°C pendant 4 jours permet d'obtenir des tubes micrométriquement longs.	28
Figure 12: Distribution et fonction des bactéries de genre Pseudomonas (issu de l'étude de Silby et coll. 2011 [101].	32
Figure 13: Illustration des différence de membranes externe d'une bactérie gram + ou gram (image issues de Djurisic et coll., 2015 [35]).	33
Figure 14 : Schéma illustrant les différents types d'ARNs impliqués dans la transcription puis la traduction des gènes en protéines chez les procaryotes. ARNpol = ARN polymérase, complexe enzymatique responsable de la synthèse des ARNs. ARNm= ARN messenger traduit en protéine via les ribosomes. ARNr= ARN ribosomique qui constitue, avec d'autres protéines, une partie des ribosomes. ARNt = ARN de transfert qui est un intermédiaire à la traduction, apportant les acides aminés aux ribosomes. ARNi = ARN interférant qui régule l'expression des gènes en bloquant la transcription ou en neutralisant les ARNm an s'appariant avec eux. Les ARNsn (petit ARN nucléaire), ARNsno (petit ARN nucléolaire) et ARNm (petit ARN temporaire) n'existent que dans les cellules eucaryotes.....	35
Figure 15: Diagramme de Pourbais du fer (1 mol.L ⁻¹ , 25°C). La spéciation du fer (ion, complexe, précipité, métal) préférentielle est fonction du potentiel d'oxydo-réduction (V) et du pH du milieu dans lequel il se trouve. Typiquement, on retrouvera dans les eaux naturelles un pH autour de 7 et un potentiel redox autour de 1,5 V pour les eaux aérées [121].....	37
Figure 16 : Diagramme illustrant le transport du fer dans une bactérie à Gram négatif par un sidérophore. L'ion Fe ³⁺ (espère orange) est chélaté par le sidérophore puis reconnu par un récepteur spécifique. Une fois dans le cytoplasme le complexe est dissocié et le	

sidérophore est ainsi réutilisé (issu de Noel et coll. 2011 [127]).	38
Figure 17: Régulation de l'homéostasie du fer par la protéine Fur et l'ARNnc RyhB dans <i>Escherichia coli</i> (issus de Massé et coll. 2007) [118]. Lorsque le Fe(II) est abondant dans la cellule, Fur réprime les gènes impliqués dans l'apport du fer et active indirectement le stockage du fer via l'inhibition de la transcription de RyhB. Lorsque la cellule est en carence de fer, RyhB réprime le stockage du fer et son utilisation par des protéines non essentielles.	39
Figure 18 : Schéma des mécanismes de régulation de la traduction des ARNm impliqués dans l'homéostasie du fer <i>via</i> les ARNnc PrrF1 et PrrF2. RBS : site de fixation des ribosomes pour la traduction de l'ARNm en protéine. Les PrrF, en s'appariant aux bases de ce site, répriment la traduction des ARNm. ORF : Région codante de l'ARNm.	40

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Figure 1 : Illustration des étapes du protocole de synthèse modifiées pour l'obtention de Ge-imogolites à paramètres physico-chimiques variables.	58
Figure 2: Changement de conformation de la sonde DCFDA. En traversant la membrane la sonde est clivée par les estérases intracellulaires. En présence de ROS, elle est oxydée et change de conformation pour devenir fluorescente.	65
Figure 3 : Fusion transcriptionnelle du gène codant pour la gfp derrière le promoteur PrrF1 dans le plasmide poT1e	66
Figure 4 : Techniques de caractérisations structurales multi-échelles utilisées	67
Figure 5 : Charge et potentiels électriques d'une particules, d'après Simon-Deckers, 2008 [15]. La charge d'une particule induit l'apparition de couches chargées s'organisant autour d'elle. Le potentiel zêta correspond au potentiel présent au point de cisaillement (qui est du même coup le diamètre hydrodynamique de la particule).	69
Figure 6 : Principe de fonctionnement de l'AFM et chaîne de traitement des données. (A) acquisition de l'image. Une pointe de 10nm de diamètre sonde la surface de l'échantillon en oscillant à sa surface. (B) Les images sont extraites avec le logiciel Gwyddion. les profils de hauteur de chaque pixel d'intérêt est extrait en utilisant le logiciel Gwyddion pour en dessiner les répartitions de hauteur. L'image est ensuite traitée <i>via</i> le plug-in « tubeness » d'ImageJ afin d'obtenir des tubes bien définis sur l'image avant d'utiliser la fonction « analyse particle » pour en extraire la répartition de longueur des tubes.	71
Figure 7 : Diffractogrammes d'un échantillon DW (en vert) et SW (en rouge).	73

Figure 8. Spectre XAS de Ge-imogolite enregistré au seuil K du Ge.....	75
Figure 9. Organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS, d'après Auffan, 2007.	78
Figure 10. Schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à la XAS (ex: du montage de la ligne FAME de l'ESRF à Grenoble) (www.esrf.fr).	79
Figure 11 : Microscope confocal à champ sombre (à gauche) équipé d'un spectrophotomètre pour la détection du signal hyperspectral. L'alignement du condenseur (à droite) permet l'amélioration du contraste des images.	81
Figure 12 : Chaîne de traitement des données d'une image de nanoparticules d'or (12nm coatées citrate) (A), avec l'obtention des bandes MNF dont les trois première sont illustrées en RGB sur l'image MNF (B), la sélection des endmembers présentant les pixels les plus purs grâce au NDVI (C) et la librairie spectrale associée (D).	83
Figure 13 : Etapes pour réaliser le Spectral Angle Mapping. (A) la librairie spectrale des nanomatériaux contenant les spectres de références. (B) Angle spectral autorisé et défini pour comparer en chaque bande les spectres de références aux spectres de chaque pixel de l'image . (C) image de nanoparticules d'or NPAu- dans le Phytigel (1ppm). (D) Pixels illuminés, aillant un angle spectral inférieur à 0,085 radians par rapport aux spectres de référence. Ces pixels contiennent le signal des NM.	84
Figure 14 : Schéma du faisceau de rayons X de la nano-CT.	85
Figure 15 : Etapes d'alignement et de reconstruction 3D des tomographies 2D, exemple d'une racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> exposée à des nanoparticules d'or (12nm enrobées bPei). (A) les 901 projections 2D de l'échantillon sont collectées de -90 à 90°. (B) Les éventuels shifts entre chacune des images sont corrigés grâce au suivit d'une bille d'or préalablement déposée sur l'objet à reconstruire. (C) Reconstruction 3D de la structure. .	88

Chapitre III. Synthèses accélérées de Ge-imogolites

Figure 1 : Obtention de Ge-imogolites à différentes structures en fonction des conditions de synthèses avec des ratios n_{Al}/n_{Ge} de 2. L'encadré vert (A) correspond aux résultats de l'étude de Levard et coll. [5] qui consistait en la synthèse de Ge-imogolites en utilisant $C_{Al}=0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ et $R = [0,5 ; 1 ; 1,5 ; 1,75 ; 2 ; 2,5 ; 2,75 ; 3]$. L'encadré orange (B) correspond aux résultats obtenus dans les études qui ont fixé un $R=2$ et ont fait varier C_{Al} dans Maillet et coll. [6] avec $C_{Al}=[0,25 ; 0,5] \text{ mol.L}^{-1}$ ainsi que dans Thill et coll. [7] qui font varier $C_{Al}= [0,5 \text{ ou } 0,75] \text{ mol.l}^{-1}$	97
Figure 2 : Schéma du diagramme de phase d'un corps pur en fonction des conditions de	

pressions et de températures dans lequel il se trouve.	99
Figure 3 : Diffractogramme des échantillons de proto-imogolites après étape de chauffage dans l'eau à l'étuve ou dans le CO ₂ en conditions supercritiques.....	101
Figure 4 : Images obtenues en microscopie à force atomique des échantillons de proto-imogolites (A) dans l'eau avec une phase de croissance à l'étuve et dans l'éthanol avec une phase de croissance à 60°C, 100 bar pendant (B) 4h ou (C) 8h. 7 µl de solution diluée à 1 mg.L ⁻¹ a été déposé sur une plaque de mica clivée puis séchée à l'étuve à 40°C. Barre d'échelle : 1 µm.....	101
Figure 5 : Structure d'une onde électromagnétique. E : champ électrique. B : champ magnétique. C : célérité (m.s ⁻¹). λ : longueur d'onde.....	103
Figure 6 : Etude de l'effet de l'irradiation micro onde sur la croissance des Ge-imogolites. Si le chauffage traditionnel en étuve pendant 7 jours donne des nanotubes courts (A), l'irradiation MW permet d'obtenir des nanotubes micrométriques en 2h à 200°C (B). Echelle = 1µm.....	105
Figure 7: X-ray diffraction patterns of samples synthesized under (a) 100, (b) 150 or (c) 200°C under conventional heating (CH) or microwave (MW) heating conditions for 1h, 2h or 7 days.....	109
Figure 8: AFM images under tapping mode for samples synthesized under (a) conventional heating (CH) or (b) microwave heating (MW). Scale bar = 500nm.....	110
Figure 9: Repartition in volume percentage of Ge-imogolites nanotube lengths estimated from AFM images. At least 200 particles were considered excluding aggregates. Growth stages were performed under microwave heating at 100°C 1h (a) 2h (b), 150°C 1h (d) or 2h (e), 200°C 1h (f) or 2h (g). The maximum length obtained with conventional heating is delimited with red line.	111
Figure 10: Repartition in volume percentage and type: proto-imogolites, short tubes (<25nm) or long tubes (>25nm) estimated from AFM images, for various temperatures, growing durations and the two heating conditions. *: samples dominated by large aggregates preventing the determination of tube proportions.	112
Figure 11 : Example of height thresholding to distinguish proto-imogolites from tubes. (A) Height repartition (volumes) of particles synthesized under MW irradiations, exported using Gwyddion software from AFM pictures. (B) AFM picture of Ge-imogolite grown under MW irradiation, 150°C, 2hrs. (C) Particles highest than 2.5nm are highlighted in red.	114

Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la cristallinité des Ge-imogolites sur l'induction d'effets toxiques

- Figure 1 : Conditions de synthèses (concentrations en aluminium et rapports d'hydrolyse) pour l'obtention d'imogolites à structures variables, et séparation de taille des sous-fractions. SW : simples parois ; SWlac : simples parois lacunaires ; DW : doubles parois. NF : solution mère non filtrée. Fractions obtenues en filtration tangentielle enrichies en tubes courts (<200nm) ou longs (>200nm). μm : DW de longueurs micrométriques avec étape d'hydrolyse à l'urée. 125
- Figure 2 : Exemple de différence de hauteur des tubes (i.e. diamètre) mesurée en AFM sur les sous fractions courtes (<200nm) des échantillons simple paroi (SW) et doubles parois (DW). Les images AFM contiennent une information de hauteur en niveau de gris. Le pourcentage de pixel pour chaque taille (i.e. niveau de gris) pour 200 particules a été tracé pour obtenir les répartitions de hauteurs. 126
- Figure 3 : Diffractogrammes des échantillons de Ge-imogolites SW ($C_{\text{Al}}=0,75\text{M}$) ou DW ($C_{\text{Al}}=0,2\text{M}$) et de leurs sous fractions. Anti-cathode de cobalt ($\lambda_{\text{K}\alpha} = 1,79\text{\AA}$). 127
- Figure 4 : Répartition de longueur des Ge-imogolites simple parois (SW, en vert) et doubles parois (DW, en violet) et de leurs sous fractions enrichies en particules courtes (<200nm) ou longues (>200nm). Les DW micrométriques ($\text{DW}_{\mu\text{m}}$) sont également représentés. Les longueurs ont été mesurées par AFM en exportant les longueurs de Feret d'un minimum de 500 particules, sans prendre en compte les éventuels agrégats. . 128
- Figure 5 : Potentiels zéta calculés à partir de la mobilité électrophorétique des Ge-imogolites et de leurs sous fractions, à 50mg.L^{-1} . (pH = 6-7, conductivité= $45\text{-}50\mu\text{S.cm}^{-1}$). 130
- Figure 6 : Nombre de bactéries par ml après 24h de croissance en présence de Ge-imogolites. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration massique (à gauche) ou du nombre (à droite) de Ge-imogolite. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance ($\alpha=0,05$). Le nombre de bactéries contrôle est de $1,5.10^9$ CFU. DW : double parois. SW : Simple paroi. μm = micrométrique. <200nm : fraction courte. >200nm : fraction longue. 132
- Figure 7 : (A) AFM pictures used to measure (B) length and (C) height distribution of imogolite nanotubes. SWlac in red, SW in blue. Length and height distributions are based on at least 200 particles, excluding aggregates. 139

Figure 8 : Back-Fourier transform spectra of the pseudoradial distribution function of SW and SWlac at Ge K-edge (window $1.5 \text{ \AA} < R < 3.5 \text{ \AA}$). Above : Experimental data (lines) and best fits (dots). Under : Best fits parameters and Al/Ge molar ratio.	139
Figure 9 : bacterial number per ml. <i>Pseudomonas brassicacearum</i> was exposed to 0, 1, 1 or 50 mg/l of imogolite (SW or SWlac) during 24h in CAA media . Groups marked by letters are statistically different from each other (ANOVA, Turkey HSD test, $p < 0.05$)...	140
Figure 10: Pixel mapping of NM hyperspectral libraries on dark field microscopy images of bacteria exposed to NM. Illuminated pixels have the same composition than SW (when red) or SWlac (when blue). Maps were made using Spectral Angle Mapper method using a 0.085 rad angle.	141
Figure 11 : Element percentage sedimenting in CAA (black) containing 50 mg.L^{-1} of SW (blue) or SWlac (red).	143
Figure 12 : X-ray diffraction patterns of Ge-imogolite well cristallized (SW) or with lacunar site in its structure (SWlac).	145
Figure 13 : (A) Normalized X-ray absorption spectra (B) Extracted EXAFS spectra oscillations from (B). (C) Fourier transforms of data in the window ($2 \text{ to } 18 \text{ \AA}^{-1}$) of the EXAFS spectra. (D) Back-Fourier transform spectra of the peak ($1.5 \text{ \AA} < R < 3.5 \text{ \AA}$). Experimental data (lines) and best fits (dotles).	145
Figure 14 : Mapping results of hyperspectral libraries of (A) Single Walled (SW) or (B) SW lacunar (SWlac) on pictures of culture media (left) and bacteria (right) with or without 50 mg.L^{-1} of SW and SWlac. Mapping made using Spectral Angle Mapper ($0,085 \text{ rad}$)....	146
Figure 15 : Bilan des structures de Ge-imogolites obtenues en fonction des conditions de synthèses.	147

Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-imogolites sur les réponses de *Pseudomonas brassicacearum*.

Figure 1 : Modèle structural d'une Ge-imogolite dopées en Fe (1% w/w). Les atomes de Fe (en orange) se substituent aux atomes d'Al (en bleu). Chaque atome de fer est alors lié en moyenne à six atomes d'oxygène (en rouge) trois atomes de Ge (en violet) et deux atomes d'Al. Cette substitution induit la présence d'un site d'Al vacant (en pointillés)..	158
Figure 2: AFM observation in tapping mode for samples 0p (A) and 2p (B) and diameter height distribution (C): solid (sample 0p) and dotted line (sample 2p). Height distributions were obtained with ImageJ software[31], based on the analysis of a	

minimum of 200 nanotubes, aggregates excluded.....	161
Figure 3: EXAFS spectra $k^3\chi(k)$ (A) and Fourier transform (B) of 2p sample at Fe-K edge. Experimental (solid line) and calculated signal (dotted lines) (see table 2 for fitting details).	162
Figure 4: Model of Ge-imogolite with structural substitution of Al by Fe and interatomic distances: (a) Fe-O = 1.99 Å; (b) Fe-Ge = 3.34 Å (c) Fe-Al = 2.96 Å; Generated by using the CrystalMaker software. (blue: Al; purple: Ge; red: O; gold: Fe).....	163
Figure 5: Linear combination fitting of samples 5p and 10p and its results. A: EXAFS spectra $k^3\chi(k)$; B: Fourier transform. Solid line: experimental; dotted line: calculated. ..	164
Figure 6: Typical atomic force microscopy images of 5p (A) and 10p (B) samples, large particles observed and their respective cross-section (A' and B').....	166
Figure 7 : Tube diameter distributions from AFM data (> 100 tubes, excluding aggregates).	166
Figure 8: X-ray diffraction patterns of 0p ; 2p ; 5p and 10p Fe-Ge samples compared to DW- Ge imogolite model compounds (R2 0.5M) published in Levard <i>et al.</i> , <i>Phys. Chem. Chem. Phys.</i> , 2011.....	167
Figure 9: Bacterial growth in CAA media using CFU counting after 24h growth), exposed to 50 mg.L ⁻¹ imogolite (imo), Fe-imogolite (Fe-imo) or to FeCl ₃ (100 µMol.L ⁻¹). Contacts between the nanotubes and the bacteria were direct (DC) or non-direct (NDC). Groups showing different letters are significantly different. (ANOVA, followed by Tuckey's HSD test, p<0.05). Error bars are confidence interval (α=0.05).	176
Figure 10: Hyperspectral imaging (HSI) of 50mg.L ⁻¹ imo and Fe-imo in direct interaction with <i>Pseudomonas brassicacearum</i> . Images were acquired using 100X objective/1.3 oil iris. Scale bar is 10 µm. Reference spectral libraries created from imo (a) and Fe-imo (b) in an abiotic culture media. Note that y-axis values are much lower in imo spectra than Fe-imo spectra. Hyperspectral scanned images of bacteria exposed to imogolites for 24h. (c) Localization of imo (e) and Fe-imo (f) with Spectral Angle Mapper (0.085rad). Illuminated pixels have spectral signatures identical to the respective spectral libraries.	177
Figure 11: <i>Prrf1</i> expression modulation in NF421:: <i>rfp</i> harbouring transcriptional <i>prrf1-gfp</i> fusion. Gfp signal was normalized by the number of bacteria per ml. Results are expressed in percentage of the control (No Imo). Bacteria were exposed to 50 mg.L ⁻¹ of imo, Fe-imo following the direct (DC) or the non-direct contact (NDC) scenarios and to 100 µmol.L ⁻¹ of FeCl ₃ for 24h.	179
Figure 12: Fe-imogolite (Fe-imo) alteration after 24h exposure to bacteria following the DC and NDC scenarios. HSI of Fe-imo (i) in direct contact with bacteria (DC) or (ii)	

inside (In DB) and outside the dialysis bag (ODB). Hyperspectral library of imogolite (imo; in red) or of Fe-imo (in green) were used for spectral angle mapper analysis. Illuminated pixels show spectral signatures similar to imogolite libraries.	180
Figure 13: ROS semi-quantification inside bacteria using DCFDA probe. All bacteria produce rfp fluorescence (red). DCFDA becomes green in the presence of ROS. Bacteria exposed to 25 mmol.L ⁻¹ H ₂ O ₂ , 50 mg.L ⁻¹ of imogolites (DC) or 100 µmol.L ⁻¹ FeCl ₃ for 15 min. Error bars are confidence intervals (α=0,05).	181
Figure 14 : Imogolite (imo) and Fe- doped imogolite (Fe-imo) mapping on images of (i) CAA with or without 50mg.L ⁻¹ of Fe or Fe-imo, or (ii) <i>Pseudomonas brassicacearum</i> with or without 50mg.L ⁻¹ of Fe or Fe-imo. Hyperspectral library of imogolite (in red) or of Fe-imo (in green) were used for spectral angle mapper analysis (0,085rad). Illuminated pixels have spectral signatures similar to imogolite libraries.	183
Figure 15 : Schéma illustrant la modification des réponses de la souche NFM421 de <i>P. brassicacearum</i> exposée aux Ge-imogolites en fonction de leur dopage en fer (Fe-Imo, à droite) ou non (Imo, à gauche). Sid : Sidérophore. ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène. Les niveaux élevés de Fe(II) dans la cellules sont notés « ++ », les niveaux plus bas « - ».....	184

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules

Figure 1 : Construction de la librairie spectrale correspondant aux matériaux présents dans le phytigel sans nanomatériaux. L'image du gel (A) est utilisée pour en extraire la librairie spectrale (B). Les pixels de l'image contenant l'information spectrale présente dans la librairie du gel sont mis en évidence par la couleur cyan (C) et superposés à l'image d'origine (D). Echelle 1µm.	199
Figure 2 : Cartographie des pixels présentant une signature spectrale identique à celle des nanoparticules d'or NPAu- (B) et NPAu+ (C) sur différentes images de gel et d'apex de racines non exposées aux NM (A). Les pixels en rouge ont une signature spectrale identique aux NPAu- (ligne B) et aux NPAu+ (ligne C). La cartographie a été réalisée en utilisant la technique des angles spectraux avec un angle de 0,085rad. Echelle 2µm. .	201
Figure 3 : Schéma représentant les différentes cellules composant les tissus d'une racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> . Vues en coupe (A) transversale et (B) longitudinale. Adapté de Di Laurenzio et coll. 1996. [13]	202

Figure 4 : Cartographie des NM d'or sur différents tissus de racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> exposées à 1mg.L^{-1} de NPAu- (à gauche) ou NPAu+ (à droite). Les bibliothèques spectrales des NM ont été cartographiées sur les différentes images <i>via</i> la méthode de l'angle spectral (angle $0,085^\circ$ rad). Les pixels colorés en rouge ont un signal spectral identique à celui des NM. Zone 1 : coiffe latérale. 2 : Pericycle. 3 : cellules de bordure. 4 : columelle. Echelle : $2\mu\text{m}$.	203
Figure 5 : Etapes de normalisation des histogrammes des volumes reconstruits de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> exposés aux NM d'or (NPAu). (A) Les histogrammes totaux (contributions des absorptions RX de la bille d'or, des cellules, de l'air, et des nanoparticules éventuelles), Sub-totaux (sans les billes d'or), des cellules, de l'air et d'une bille d'or ont été extraits et superposés pour chaque échantillon. Les pics d'absorption des rayons X de l'air ont été normalisés à mi-hauteur puis centrés. Les mêmes corrections ont été appliquées aux histogrammes des sub-totaux pour pouvoir les comparer. Histogrammes normalisés des images 3D de racines (B) ou de bactéries (C). Le seuil d'adsorption (valeur seuil) dû aux NM a été placé à la borne haute de l'histogramme du témoin (trait noir).	207
Figure 6 : Volumes reconstruits, coupes transversales (bleu) et longitudinales (violet et orange) de racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> exposées à 10mg.L^{-1} de NM d'or (NPAu- et NPAu+). Images obtenues en nanotomographie aux rayons X avec un voxel de $63,5\text{ nm}$. Les voxels en rouges indiquent la distribution des NPAu. Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$.	209
Figure 7 : Schéma hypothétique des mécanismes d'accumulation et de mobilité des nanomatériaux d'or chargés positivement ou négativement dans les racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> . Ces hypothèses sont basées sur nos observations en HSI et en nano-CT.	211
Figure 8 : (A) Reconstruction volumique de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> exposées aux NPAu-. Image obtenue en nanotomographie aux rayons X en très haute résolution (50 nm). La distribution des NPAu- au sein des bactéries est représentée par les voxels seuillés et colorés en rouges. Des coupes 2D virtuelles extraites de (A) sont représentées en (B) et (C). Echelles $2\mu\text{m}$.	213

Chapitre VII : Conclusions générales et perspectives

Figure 1 : Schéma des mécanismes de toxicités modifiés par certains paramètres physico-chimiques des Ge-imogolites chez <i>Pseudomonas brassicacearum</i> . ROS : Reactive Oxygen Species. nano-CT.	226
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I : Comprendre la toxicité des nanomatériaux, la nécessité d'utiliser des modèles. Etat de l'art et Objectifs.

Tableau 1 : exemple d'études observant une internalisation de nanomatériaux, et les techniques utilisées.....	16
---	----

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Tableau 1 : Conditions de synthèses pour l'obtention de Ge-imogolites à caractéristiques physico-chimiques variables et échantillons pour lesquelles des séparations de tailles ont été réalisées. TEOG : ethoxide de germanium. DW : Doubles parois ; μ -long : longueur micrométrique ; SW : simples parois ; lac : lacunaires ; CH : chauffe conventionnelle; MW : Micro-ondes. CH : Chauffe traditionnelle. NF : Non filtré.....	61
Tableau 2 : Caractéristiques des nanoparticules d'or utilisées données par le constructeur. NA : donnée absente.....	62
Tableau 3 : Détails et caractéristiques des souches et des plasmides utilisées	63
Tableau 4 : Lignes de lumières utilisées et leur spécificité.....	80
Tableau 5 : Conditions de déshydratation et de séchage supercritique des échantillons.	86
Tableau 6 : Récapitulatif des outils utilisés pour l'étude des effets des NM sur des organismes de rhizosphères lors de cette thèse. * temps synchrotron alloué en novembre 2015.	89

Chapitre IV : Influence de la morphologie et de la cristallinité des Ge-imogolites sur l'induction d'effets toxiques

Tableau 1 : Longueurs moyennes mesurées par AFM, proportions des sous fractions dans la solution NF initiale ; masses et nombre par gramme calculés des Ge-imogolites. DW : double parois. SW : simple paroi. SWlac : SW lacunaires. NF : Non filtré ; μ m : micrométrique. <200nm : inférieur à 200nm. >200nm : supérieur à 200nm.	128
Tableau 2 : Résultats de modélisations des spectres EXAFS, et rapports Al/Ge mesurés en	

ICP-AES. R : distance radiale (Å) $\pm 0,01$ Å. N : nombre d'atomes voisins ($\pm 10\%$). σ :
facteur de Debye-Waller (Å). 129

Chapitre V : Influence du dopage en Fe des Ge-imogolites sur les réponses de *Pseudomonas brassicacearum*.

Table 1: Element recovery in the formed Ge-imogolite sample as measured by ICP-AES
and corrected for non tubular solids (samples 5P and 10p) obtained using EXAFS LCF
(see fig 4). Recovery rates are expressed as % of initial amounts X_0 162

Table 2: Structural parameters for sample 2p derived from R-space fitting (from 1.052 to
3.360 Å) using theoretical Fe-O, Fe-Al and Fe-Ge paths generated by FEFF6.2.
Amplitude factor= 0.77 ± 0.03 and $\Delta E = -2.80 \pm 0.52$; Chi-square: 1071, reduced Chi-
square: 82, R-factor: 0.014. R_x (Å): interatomic distance; N_x : number of neighbors; σ_x
(Å): Debye Waller factor. 163

Chapitre VI : les nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les cellules

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques techniques de la microscopie à champs
sombre couplée à de l'imagerie hyperspectrale (HSI) et de la nanotomographie aux
rayons X (nano-CT). 214

Relation entre structure, réactivité et interactions cellulaires de nanotubes inorganiques ; cas des imogolites

Aujourd'hui, les difficultés pour établir des liens entre caractéristiques des nanomatériaux et réponses biologiques sont principalement issues du manque de contrôle de la synthèse des nanomatériaux, ne permettant pas de faire varier leurs paramètres physico-chimiques clés une à une.

Pour identifier certains mécanismes gouvernant la toxicité des nanomatériaux nous avons utilisé un nanotube inorganique modèle dont la synthèse est bien contrôlée : les Ge-imogolites. Les effets de la longueur, du nombre de parois, de la cristallinité et de la composition chimique des Ge-imogolites ont été étudiés sur une bactérie des sols, *Pseudomonas brassicacearum*. Il a été identifié que la présence de sites réactifs (en bordure de tubes) induit une toxicité due à une interaction forte des nanotubes avec les cellules bactériennes, ainsi que la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Ajouter des sites réactifs *via* la présence de défauts structuraux augmente la dégradation des tubes ainsi que la rétention d'éléments nutritifs essentiels, ce qui augmente leur toxicité. Enfin, l'ajout de fer dans leur structure transforme les Ge-imogolites en source de fer, qui sont dégradées et deviennent promoteurs de croissance. Dans tous ces cas, les interactions entre nanomatériaux et cellules ont été identifiées comme cruciales pour comprendre et prévenir les effets des nanomatériaux. Ce travail de thèse a également permis de mettre en avant la capacité de nouveaux outils pour le suivi de l'internalisation de nanomatériaux dans les organismes.

Mots-clefs : Ge-imogolite, *Pseudomonas brassicacearum*, synthèse contrôlée, réactivité, spéciation des éléments, interactions cellules/nanomatériaux, nano-tomographie RX, imagerie hyperspectrale.

Relating structure, reactivity and cellular interactions of inorganic nanotubes; case of imogolites

Only a few studies of (eco)toxicology linked the physico-chemical properties of nanoparticles to the toxicity mechanisms or the stress they induce. Moreover, no clear conclusions can be drawn at present because of the variability of nanoparticles used in studies.

The present study used the inorganic Ge-imogolite nanotubes as a model compound. The toxic effects of length, number of walls, structural defects, and chemical composition were assessed towards the soil bacteria *Pseudomonas brassicacearum*. Several mechanisms modulating the toxicity of Ge-imogolite were then identified. Indeed, reactive sites at the tube ends induce a slight toxicity *via* a strong cell interaction and the generation of reactive oxygen species. Creating vacant sites on the surface of Ge-imogolite (and thus increasing the number of reactive sites), appears to cause a deficiency of nutrients in the culture media correlated with a higher degradation of the tubes, leading to a high bacterial growth decrease. Finally, structural iron incorporation into Ge-imogolite transforms them into an iron source, being degraded and becoming growth promoters. In this work, the new tools capacities for the study of nanomaterials/cells interaction have been studied.

Keywords : Ge-imogolite, *Pseudomonas brassicacearum*, controlled synthesis, reactivity, elements speciation, nanomaterials/cells interactions, Hyperspectral imaging system, X-ray nanotomography.