

Université de Montréal

**La bioaccumulation d'une nanoparticule d'argent (nAg) par l'algue verte
Chlamydomonas reinhardtii : distinguer la contribution de la particule de
celle de l'ion Ag⁺**

Par

Simon Leclerc

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de
l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.) en chimie

Août 2013

© Simon Leclerc, 2013

Résumé

L'explosion de la nanotechnologie a permis l'intégration d'une multitude de nanoparticules dans des produits de consommation. Les nanoparticules d'argent (nAg) sont les plus utilisées à ces fins, selon les derniers recensements disponibles. La plupart des études toxicologiques, à ce jour, ont fait état de l'implication très évidente de l'ion Ag^+ dans la toxicité aiguë des nAg; cependant, quelques études ont mis en évidence des effets toxicologiques dus aux nAg. Il y a un certain consensus à propos d'un risque de contamination des eaux douces via leur rejet par les effluents des réseaux d'aqueducs. Puisque les concentrations en Ag^+ sont généralement très faibles dans les eaux douces (de l'ordre du pg L^{-1}), de par la formation de complexes non-labiles avec des thiols (organiques et inorganiques) et des sulfures, la toxicité inhérente aux nAg pourrait ne pas être négligeable-comparativement aux tests en laboratoires. Cette étude s'intéressait donc aux mécanismes de bioaccumulation d'argent par l'algue verte *C. reinhardtii* suite à l'exposition à des nAg de 5 nm (enrobage d'acide polyacrylique). La bioaccumulation d'argent pour l'exposition à Ag^+ servait de point de comparaison; également, les abondances de l'ARNm de l'isocitrate lyase 1 (ICL1) et de l'ARNm de Copper Transporter 2 (CTR2) étaient mesurées comme témoins biologiques de la bioaccumulation de Ag^+ . Les expériences ont été menées en présence d'un tampon organique (NaHEPES, 2×10^{-2} M; Ca^{2+} , 5×10^{-5} M) à pH de 7,00. Pour des expositions à temps fixe de 2 heures, la bioaccumulation d'argent pour nAg était supérieure à ce qui était prédit par sa concentration initiale en Ag^+ ; cependant, il n'y avait pas de différence d'abondance des ARNm de ICL1 et de CTR2 entre nAg et Ag^+ . D'un autre côté, pour une exposition à temps variables, la bioaccumulation d'argent pour nAg était supérieure à ce qui était prédit par sa concentration initiale en Ag^+ et une augmentation de l'abondance de

l'ARNm de ICL1 était notée pour nAg. Cependant, il n'y avait aucune différence significative au niveau de l'abondance de l'ARNm de CTR2 entre nAg et une solution équivalente en Ag⁺. L'ajout d'un fort ligand organique (L-Cystéine; log K= 11,5) à une solution de nAg en diminuait radicalement la bioaccumulation d'argent par rapport à nAg-sans ajout de ligand. Par contre, l'abondance des ARNm de ICL1 et de CTR2 étaient stimulées significativement par rapport à une solution contrôle non-exposée à nAg, ni à Ag⁺. Les résultats suggéraient fortement que les nAg génèrent des ions Ag⁺ au contact de *C. reinhardtii*.

Mots clés : nanoparticules d'argent; *Chlamydomonas reinhardtii*; bioaccumulation; ARNm; Copper Transporter 2; cuivre.

Abstract

The recent developments in nanotechnology have given rise to a new and increasing economical market where nanoparticles are at the forefront. Recent inventories of the nanoparticles-containing products have shown that silver nanoparticle-containing products are the most frequently used consumer nanomaterial. Due to the fear of a large scale contamination-and even pollution- of the aquatic environment from silver nanoparticles (nAg), studies have been conducted to assess their toxicities, which, in many cases, have been found to be mediated by the concomitant presence of Ag^+ . Notably, few studies have found evidence of toxicity due to the nAg, per se. Since numerous non-labile complexes are formed with Ag^+ in freshwaters- especially with thiols and sulfides-, nAg toxicity might be more relevant in comparison to laboratory tests where the Ag^+ tends to dominate toxicity studies. Therefore, this study investigated the mechanisms underlying silver bioaccumulation by the green alga, *C. reinhardtii* upon exposure to solutions of nAg (nominal size of 5 nm; poly-acrylate coating). Silver bioaccumulation upon exposures to the free ion alone served for comparison. In parallel, the abundance of two mRNAs- ICL1 and CTR2- were used to better understand the mechanisms underlying the bioaccumulation of Ag^+ (and potentially nAg). The experiments were conducted in pH buffered solutions (NaHEPES, 2×10^{-2} M; Ca^{2+} , 5×10^{-5} M) at pH 7.00. For 2-hour exposures, the silver bioaccumulation for solutions of nAg exceeded what was expected from their Ag^+ content only; however, no differences were noticed in the abundance of the expression of ICL1 and CTR2. For variable time exposures, the silver bioaccumulation for solutions of nAg exceeded what was expected from their Ag^+ content only. Moreover, the expression of ICL1 was significantly higher for nAg than what was expected based upon an exposure to Ag^+ only. When exposed to nAg, expression levels of

CTR2 could be predicted from levels based solely on the Ag^+ concentrations. The addition of a large excess of L-Cysteine, which is a very strong silver ligand ($\log K = 11.5$), to a nAg solution largely decreased silver bioaccumulation, however, bioaccumulation remained significant and the expression of both ICL1 and CTR2 were significantly higher than that of the control solutions (without Ag^+). The results strongly suggest that nAg generated Ag^+ ions when in contact with *C. reinhardtii* and that the nAg released to freshwaters might exert its toxicity through organism-contact-dependant release of Ag^+ .

Key words : silver nanoparticles; *Chlamydomonas reinhardtii*; bioaccumulation; mRNA; Copper Transporter 2; copper.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Tables des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiii
<u>1. Introduction</u>	14
1.1 Mise en contexte	14
1.1.1 Les nanoparticules	14
1.1.2 Effets toxicologiques des nanoparticules métalliques	16
1.1.3 Les nAg dans l'environnement	19
1.2 La bioaccumulation de nAg dans les organismes d'eaux douces	21
1.2.1 Concepts généraux de bioaccumulation des métaux et schématisation	21

1.2.2 Bioaccumulation de nAg, paramètres clés et choix de l'organisme test	24
1.2.3 Mesure de la fraction d'ions Ag⁺ d'une solution de nAg	27
1.2.4 Marqueurs biologiques et choix des ARNm	31
1.3 Les buts de l'étude	32
<u>2. Article</u>	33
2.1 Abstract	35
2.2 Introduction	36
2.3 Materials and Methods	38
2.3.1 Materials	38
2.3.2 Quantification of dissolved Ag	38
2.3.3 Size distribution of the nAg	39
2.3.4 Algal cultures	39
2.3.5 Algal exposures to experimental solutions	40
2.3.6 Transcriptomic analysis	42
2.3.7 Darkfield microscopy/ hyperspectral analysis	42

2.3.8 Statistics	43
2.4 Results and Discussion	43
2.4.1 Characterization of nAg	43
2.4.2 Bioaccumulation of nAg and ionic silver	44
2.4.3 Mechanism of Ag uptake	45
2.4.4 Internalization of nAg	48
2.4.5 Environmental implications	50
2.4.6 Acknowledgements	51
2.5 References	51
2.6 Supporting information	55
<u>3. Résultats supplémentaires</u>	61
3.1 Détermination de la retenue passive de nAg et de	61
3.1.1 Méthodes expérimentales	61
3.1.2 Résultats et discussion	62

3.2 Détermination de l'effet de Ag ⁺ sur l'abondance relative de l'ARNm de CTR2 et sur l'accumulation de cuivre par <i>C. reinhardtii</i>	64
3.2.1 Méthodes expérimentales	64
3.2.2 Résultats et discussion	65
3.3 Effet de Ag ⁺ sur l'abondance relative des ARNm de ICL1 et de CTR2	68
3.3.1 Méthodes expérimentales	68
3.3.2 Résultats et discussion	69
3.4 Investigation sur les mécanismes de bioaccumulation de nAg par <i>C. reinhardtii</i>	71
3.4.1 Méthodes expérimentales	71
3.4.2 Résultats et discussion	72
<u>4. Conclusion</u>	74
<u>5. Bibliographie</u>	76

Liste des figures

- Figure 1.1** Schématisation du modèle d'équilibre de l'ion libre. k et k^{-1} représentent respectivement les vitesses de dissociation.....22
- Figure 1.2** Schématisation d'interactions hypothétiques d'une nanoparticule d'argent avec une surface cellulaire. A- Une nAg en équilibre.....24
- Figure 2.1** A) TEM image of the nAg deposited on a copper holey carbon grid. B)-Histogram of the distribution of the physical.....44
- Figure 2.2** A) Ag biouptake as a function of total silver concentration; B)-Ag biouptake as a function of Ag^+ concentration.....45
- Figure 2.3** A) Ag biouptake by *C. reinhardtii* (algal cell density of $100\ 000\ cell\ mL^{-1}$) following 60 min. exposures to either Ag^+47
- Figure 2.4** Darkfield microscopy of an alga cell (*C. reinhardtii*) and Ag nanoparticles. A. Image generated by nAg alone; B. Spectra.....49
- Figure 3.1** Évaluation de la retenue passive de Ag^+ et de nAg sur filtres en absence ou en présence d'algues.....62
- Figure 3.2** A)- l'accumulation de cuivre par *C. reinhardtii* en fonction de la concentration de cuivre en solution (cercles noirs).....66

Figure 3.3 A)- L'abondance relative de l'ARNm de ICL1 en fonction de la concentration en Ag^+ d'une solution soit de nAg (5 répliquas biologiques).....70

Figure 3.4 La bioaccumulation d'argent par *C. reinhardtii*, A), et l'abondance relative de l'ARNm de ICL1 en fonction du temps.....72

Figure S1 The concentration of dissolved silver (ionic silver) in the filtrate as a function of the number of ultra-filtration cycles.....55

Figure S2 A) The concentration of total silver in a solution of nAg as a function of pre-equilibration time. Black symbols represent the concentrations.....56

Figure S3 Bioaccumulated silver as a function of the rinsing volume of a solution of 5×10^{-3} M sodium thiosulfate. *C. reinhardtii*.....57

Figure S4 Time-dependant relative fold change of ICL1 following exposure to a solution of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Ag^+ . The black dashed line represents the expression.....58

Figure S5 Relative fold change of CTR2 following exposures to nAg (red circles) or Ag^+ (blue circles). The black dotted line.....59

Figure S6 Ag biouptake following exposures to solutions of $17 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag. Algae were rinsed either with a 5×10^{-3} M sodium thiosulfate.....60

Liste des abréviations

{M-S_{actif}}- activité du complexe formé par un métal (M) et un site cellulaire actif (S_{actif})

°C- degrés Celsius

AgNO₃- nitrate d'argent

Ag(S₂O₃)⁻ - thiosulfate d'argent

Ag⁺ - argent ionique

Ag₂S- sulfure d'argent

AgCl- chlorure d'argent

ARNm- acide ribonucléique messenger

BLM- modèle du ligand biotique (anglicisme de Biotic Ligand Model)

CE₅₀- concentration d'effets sous-létaux sur 50% d'une population

CL₅₀- concentration d'effets létaux sur 50% d'une population

cm² mL⁻¹- centimètre carré par millilitre

CTR1- Copper Transporter Protein 1

CTR2- Copper Transporter Protein 2

Cu²⁺ - cuivre ionique

EDTA- éthylène diaminetétraacétique

Fe₃O₄- oxyde de fer (II,III)

FIM- modèle de l'ion libre (anglicisme de Free Ion Model)

g- accélération gravitationnelle terrestre

g cm⁻³ - gramme par centimètre cube

HEPES- 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

ICL1- Isocitrate Lyase 1

ICP-MS- couplage de plasma induit par haute fréquence- spectroscopie de masse

J_{int}- flux cellulaire d'internalisation d'un métal

J_{\max} - flux cellulaire maximal
d'internalisation d'un métal

K_M - constante d'affinité entre un métal et
un site cellulaire actif

kV- kilovolt

M- moles par litre

mg- milligramme

mg L⁻¹- milligramme par litre

min.- minute

mL- millilitre

nAg- nanoparticule d'argent

nCuO- nanoparticule d'oxyde de cuivre

nm- nanomètre

nTiO₂- nanoparticule d'oxyde de titane

nZnO- nanoparticule d'oxyde de zinc

nZVI- nanoparticule de fer de valence zéro

rpm- rotations par minute

v/v- volume sur volume

TAP-Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

Zn²⁺- zinc ionique

µg cm⁻²- microgramme par centimètre
carré

µg L⁻¹- microgramme par litre

µL- microlitre

µm- micromètre

Remerciements

Je veux remercier mon directeur de recherche **Kevin J. Wilkinson** de m'avoir donné la chance de faire ma maîtrise au sein de son groupe de recherche. Je vous remercie sincèrement de votre écoute et de votre ouverture d'esprit. La latitude dont j'ai pu jouir durant ces trois années m'aura permis de développer un bon sens de la planification et d'autocritique qui me serviront dans l'avenir. Merci beaucoup.

Je veux remercier mes parents- **Pierre Leclerc** et **Ginette Caron**- pour leur soutien sans fin. J'espère un jour être capable d'en faire autant que vous en êtes capables. Je vous admire et vous êtes inspirants. Je vous aime du fond du cœur. Merci aussi à mon frère **Pierre-Luc** et à mes deux sœurs **Marie-Christine** et **Émilie**. Je suis tellement heureux de vous voir tous réussir votre vie et de nous voir aussi unis. Vous êtes les 5 personnes les plus significantes que j'ai dans ma vie. Je vous aime tous du fond du cœur.

Je veux remercier ma copine **Marina Vicicu** dont j'ai eu l'immense chance de rencontrer il y a deux ans de cela. Tu es très significative pour moi et je suis choyé de t'avoir comme partenaire de vie.

Je veux remercier certains collègues en particulier avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et que j'apprécie beaucoup : Vlad, qui est devenu un ami proche, Madjid, Faraz, Dana et Pauline.

1. Introduction

1.1 Mise en contexte

1.1.1 Les nanoparticules

La National Nanotechnology Institute (NNI) définit la nanotechnologie comme le contrôle et la compréhension des phénomènes inhérents à la matière de taille comprise entre 1 et 100 nm (NNI, 2007). Une nanoparticule doit donc posséder une taille entre 1 et 100 nm pour au moins l'une de ses dimensions. Les nanoparticules peuvent être d'origines naturelle ou anthropique, et de formes organique ou inorganique (Nowack et al., 2007). Une explosion de la production anthropique de nanoparticules s'est produite au tournant du siècle dernier et les récents recensements annuels ont montré une tendance à l'accroissement de l'intégration de nanoparticules dans des produits de consommation (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2013). Par ailleurs, Nel et al. (2006) mentionnent que le domaine de la nanotechnologie devrait atteindre un marché économique annuel de l'ordre du trillion de dollars d'ici à 2015. Une revue de la littérature par Aitken et al. (2006) énumère les applications de quelques nanoparticules couramment rencontrées. Par exemples, les nanotubes de carbone, qui forment des fibres de diamètres de 1-2 nm (simple couche) jusqu'à 20 nm (multiples couches) et dont la longueur peut atteindre le mm, sont sujets de développement technologique pour des batteries et l'emmagasinage d'hydrogène. Les nanofils conducteurs ou semi-conducteurs à base de cobalt, d'or ou de cuivre sont exploités comme inter-connecteurs dans des appareils nanoélectroniques. Ensuite, les points quantiques, de formes sphériques et de tailles entre 2-10 nm, sont des amalgames de métaux et/ou de matériaux semi-conducteurs aux propriétés électroniques et catalytiques nouvelles. De leur côté, Nowack et al. (2007) font

état de l'utilisation à grande échelle de nanoparticules de fer (nZVI) pour la décontamination de produits organiques dans les eaux sous-terraines; également, sont mentionnées les nanoparticules d'oxydes métalliques, telles que l'oxyde de titane (nTiO₂) utilisé dans des produits cosmétiques et des procédés photocatalytiques, et l'oxyde de zinc (nZnO) utilisé dans des crèmes solaires. Une revue de la littérature par Parak et al. (2003) sur l'application des nanoparticules d'argent (nAg) fait état de l'exploitation de leurs propriétés bactéricides dans la stérilisation de produits médicaux, la fabrication de bandages antiseptiques et la fabrication de tissus textiles. De plus, les nAg- ainsi que les nanoparticules d'or- sont exploitées pour leurs propriétés plasmoniques dans la détection de molécules biologiques (Graham et al., 2009).

En plus de la variété énumérée ci-dessus quant aux différentes composantes des nanoparticules, il faut ajouter la très grande variété d'enrobages organiques qui sont impliqués directement dans la synthèse des nanoparticules métalliques ou ajoutés subséquemment afin de leur conférer une stabilité en solution. En effet, une revue par Link et al (2000) souligne la nécessité de prévenir l'agrégation des nanoparticules par une stabilisation électrostatique ou stérique. Par exemples, les nZVI, de par leur tendance à s'agréger très rapidement en solution aqueuse, sont souvent recouvertes d'un enrobage de polymère organique (Phenrat et al. 2008). De même, des enrobages organiques sont adsorbés sur des nanoparticules d'argent ou d'or pour en limiter l'agrégation; toutefois, la technique de polymérisation utilisée est très importante pour la stabilité dudit enrobage (Quaroni et al. 1999).

Finalement, il est à noter l'exploitation de différentes formes de nanoparticules et l'intégration de différents éléments aux propriétés distinctes au sein d'une même nanoparticule. Par exemple, différentes formes de nanoparticules d'argent sont exploitées pour

leurs propriétés distinctes de diffusion de la lumière (Mock et al., 2002). D'autre part, des nanoparticules aux propriétés magnétiques et plasmoniques, soit un cœur de Fe_3O_4 avec un enrobage d'or ou d'un mélange argent-or, sont synthétisées et étudiées afin de développer des techniques d'imageries médicales avancées (Xu et al. 2007).

1.1.2 Effets toxicologiques des nanoparticules métalliques

Dans leur revue de littérature sur le potentiel de toxicité des nanoparticules aux niveaux animal et humain, Nel et al., (2006) font un parallèle entre les effets pulmonaires reconnus de fines particules en suspension- incluant de l'amiante- et ceux observés pour des nanoparticules de TiO_2 ou des nanotubes de carbone. Ils établissent la taille des nanoparticules et leur surface comme des facteurs primordiaux de toxicité. Toutefois, ils insistent sur l'importance de considérer d'autres variables qui pourraient augmenter ou diminuer la toxicité des nanoparticules, et recommandent qu'une pléiade de facteurs soit prise en compte dans l'évaluation du potentiel de toxicité des nanoparticules, soient : leur taille, leur composition chimique, leur surface, leur forme et leur agrégation.

Puisque les derniers recensements (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2013) montrent que les nanoparticules métalliques sont parmi les plus utilisées dans les produits de consommation et qu'elles ont en commun la nature métallique de leurs atomes, cette partie s'est attardée à comparer les effets toxicologiques de différentes nanoparticules métalliques. La majorité des études toxicologiques menées à ce jour se sont basées sur la prémisse d'un risque accru de contamination- voire de pollution- des milieux aquatiques par les nanoparticules métalliques. Les paragraphes qui suivent mettent en lumière les mécanismes de toxicité trouvés à ce jour.

Une étude toxicologique de trois sortes de nanoparticules d'oxydes métalliques, soient nZnO, des nanoparticules d'oxyde de cuivre (nCuO) et nTiO₂, a été menée sur trois organismes, soient *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*), *Daphnia Magna* (*D. Magna*) et *Thamnocephalus platyurus* (*T. platyurus*). Pour les nZnO et nCuO, les concentrations létales – 48h d'exposition- de 50 % des populations (CL₅₀) étaient toutes bien prédites par leurs ions métalliques; par contre, bien que l'ion Cu²⁺ s'était avéré plus toxique que l'ion Zn²⁺ pour *D. Magna* et *T. platyurus*, les nZnO s'étaient avérées plus toxiques que les nCuO (Heinlaan et al., 2008). Il apparaît donc que les nZnO avaient une plus grande capacité de dissolution que les nCuO. Aucune toxicité des nTiO₂ n'était notée. D'un autre côté, une étude toxicologique de trois sortes de nAg (trois enrobages différents) sur *D. Magna* a révélé que leurs concentrations létales déterminées pour 48h d'exposition (CL₅₀) étaient bien prédites par la concentration de Ag⁺ en solution, mais que les CL₅₀ exprimées selon les concentrations totales en argent en solution différaient pour les 3 sortes de nAg (Zhao et Wang, 2012). En comparant les deux études, la CL₅₀ pour Ag⁺ était environ 1000 fois inférieure aux CL₅₀ de Zn²⁺ et Cu²⁺; les CL₅₀ des nAg étudiées étaient environ de 100 à 1000 fois inférieures aux CL₅₀ de nZnO et de nCuO. Il apparaît donc que les enrobages des nAg avaient une influence sur leur stabilité et leur oxydation. Des résultats de CL₅₀ pour Ag⁺ et différentes nAg (différentes tailles et différents enrobages) très similaires avaient été obtenus par Kennedy et al (2010) sur *D. Magna*. Les résultats de cette étude avaient aussi mis en évidence l'influence de la taille et de l'enrobage quant à l'oxydation des nAg.

Une étude toxicologique de nZnO, nCuO et nTiO₂ sur l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (*P. subcapitata*), a montré que les concentrations effectives médianes d'inhibition de croissance (CE₅₀) - expositions de 72 h- pour nZnO et nCuO étaient bien prédites par leurs

ions métalliques. Aucune différence significative n'était notée entre les CE_{50} de Cu^{2+} et de Zn^{2+} ; par contre, tel que mentionné pour la première étude, la CE_{50} de nZnO était inférieure à la CE_{50} de nCuO. Cela suggère fortement, encore une fois, que nZnO avait une plus grande capacité de dissolution que nCuO (Aruoja et al., 2009). Des résultats très similaires de CE_{50} -72 h d'exposition- pour nZnO et Zn^{2+} avaient été obtenus pour la même algue (Franklin et al., 2007).

Un mécanisme toxicologique de nAg très intéressant a été rapporté par Navarro et al. (2008). En effet, les expositions de 1 h et 2 h à des nAg avait généré des CE_{50} d'inhibition de l'appareil photosynthétique inférieures à celles prédites pour Ag^+ seulement. Des tests plus poussés leur avaient permis de conclure que les nAg étaient capables de s'oxyder en présence de l'algue et, ainsi, de générer des ions Ag^+ . Les résultats d'études étalés ci-haut font état de la grande influence de la fraction ionique des nanoparticules métalliques quant à leurs effets toxiques aigus. Des effets quant à l'enrobage, la taille et la composition (nZnO vs. nCuO) des nanoparticules sur leur oxydation ont pu être mis en évidence. Les nAg semblaient être plus toxiques que les nZnO et nCuO, de par la plus grande toxicité de l'ion Ag^+ par rapport aux ions Zn^{2+} et Cu^{2+} . Les nTiO₂ semblaient être les moins toxiques. La très grande toxicité de l'ion Ag^+ a été résumée par Ratte (1999) pour une multitude d'organismes aquatiques (eaux douces; eaux marines). La toxicité de l'ion Ag^+ était même mentionnée au second rang, derrière celle du mercure. Les mécanismes toxicologiques de l'ion Ag^+ sont souvent associés à sa forte affinité avec les groupements thiols des protéines (Feng et al., 2000). Par contre, des études plus récentes ont mis en lumière des mécanismes de toxicité dus à une augmentation de la production de radicaux libres (Holt et al., 2005; Park et al., 2009).

Les grands écarts de toxicité entre les nanoparticules métalliques et leurs ions pourraient-ils masquer des mécanismes toxicologiques à effets chroniques dus aux nanoparticules comme telles? Quelques études ont démontré des évidences en ce sens pour des nAg. Morones et al. (2005) ont montré que des nAg de tailles comprises entre 1 et 10 nm étaient bioaccumulées à l'intérieur et en surface de *Escherichia coli* (*E. coli*), et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ces mêmes nAg étaient aussi bioaccumulées en surface de *Salmonella Typhimurium* (*S. typhimurium*), et de *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*). Des imageries de bactéries *E. coli* exposées à Ag^+ montraient des zones internes de faibles densités, tandis qu'aucune de ces zones n'étaient observées chez celles exposées aux nAg; par contre, aucune mesure toxicologique n'avait été menée. De leur côté, Choi et al. (2008) ont montré que la croissance de bactéries nitrifiantes était inhibée davantage par des nAg (< 5 nm) que par une exposition à l' Ag^+ ou l'AgCl.

Finalement, plusieurs questions se posent afin de bien évaluer la pertinence de projeter les résultats obtenus en laboratoire dans un contexte environnemental. Des questions quant aux risques de retrouver des nanoparticules métalliques dans l'environnement ou bien quant à la spéciation chimique de leurs ions en sont d'ailleurs de très pertinentes. Puisque les nAg sont les nanoparticules les plus abondamment utilisées et qu'elles ont démontré une toxicité beaucoup plus importantes- toxicité inhérente aux ions Ag^+ - que les autres nanoparticules métalliques, elles sont traitées en exclusivité à partir d'ici.

1.1.3 Les nAg dans l'environnement

Selon une revue de la littérature par Lévard et al., (2012) il est estimé que la majorité des nAg libérées des produits de consommation parcourront les réseaux d'égouts municipaux

et atteindront les usines d'épuration des eaux. En ce sens, Kaegi et al. (2011) ont mené une étude très intéressante quant au devenir de nAg après leur passage par une usine pilote d'épuration des eaux. Après un traitement de 43 jours, les résultats montraient que la majorité de la masse de nAg injectée (85%) se retrouvait dans les boues sous la forme insoluble Ag_2S . Aussi, 5% de la masse d'Ag avait quitté la station d'épuration dans les effluents et 5% était restée dans l'usine comme telle. Plus intéressant encore, jusqu'à 15% de la quantité d'argent présente dans les effluents était détectée sous la forme de nAg métalliques non transformées; autrement dit, jusqu'à 2% des nAg injectées au départ se retrouvaient dans les effluents sous leur forme initiale. Il appert donc plausible de prétendre qu'une certaine quantité de nAg non transformées puisse être susceptible d'atteindre les milieux d'eaux douces par les effluents municipaux. Dans le cas échéant, qu'advierait-il des nAg?

D'une part, Hadioui et al. (2013) ont observé une relation inverse entre la concentration totale en nAg et leur oxydation sur une période de trois jours; autrement dit, pour de très faibles concentrations ($<10 \text{ ug L}^{-1}$), les nAg s'étaient presque toutes oxydées en l'espace de trois jours. D'autre part, Liu et al. (2010) ont déterminé que l'oxydation des nAg était sensible aux pH acides, à l'augmentation de la température et à la concentration en oxygène du milieu. Cependant, la présence de matières organiques, telles que les acides humiques et fulviques, conférait une protection aux nAg vis-à-vis de l'oxydation. Bref, il appert que l'oxydation des nAg en milieux naturels dépendra de plusieurs facteurs inhérents aux milieux. Par contre, dans un livre de Andren et Bober (2002) où une multitude de résultats d'études sur l'argent sont mis en contexte, il est mentionné qu'en eaux douces, l'argent dissout ($<0,45 \text{ }\mu\text{m}$) est fortement lié à des complexes à base de soufre tels que les sulfures (Ag_2S), les polysulfures et les thiols. Malgré que des ions Ag^+ puissent être générés par l'oxydation des

nAg en milieux d'eaux douces, il est fort probable qu'ils soient complexés. Puisque l'influence toxicologique aigue des ions Ag^+ devrait être très négligeable, le potentiel toxicologique inhérent aux nAg est peut-être beaucoup moins négligeable dans l'environnement naturel que dans les tests en laboratoire. En ce sens, afin d'évaluer leur potentiel de toxicité, il serait très important de déterminer leur bioaccumulation par les organismes aquatiques ainsi que les mécanismes associés.

1.2 La bioaccumulation de nAg dans les organismes d'eaux douces

1.2.1 Concepts généraux de bioaccumulation des métaux et Schématisation

Selon Campbell et al. (2002), les processus chronologiques d'interactions entre un métal et une cellule algale impliquent d'abord la diffusion dudit métal de la solution vers la surface de l'organisme. Ensuite, il y a des interactions d'adsorption-complexion avec des sites passifs (c'est-à-dire qu'ils ne participent pas à l'internalisation du métal dans la cellule) ou actifs (c'est-à-dire qu'ils participent directement à l'internalisation du métal dans la cellule). Finalement, il y a internalisation du métal à l'intérieur de la cellule par les sites actifs.

Deux modèles d'équilibre sont couramment mis à l'épreuve afin de prédire la bioaccumulation et les effets toxiques des métaux traces sur des organismes aquatiques, soient le modèle de l'ion libre (*Free Ion Model*, FIM) et le modèle de ligand biotique (*Biotic Ligand Model*, BLM). Hassler et al. (2004) en ont décrit les principales prémisses :

- 1- La vitesse de transport d'un métal à travers la membrane cytoplasmique est inférieure de beaucoup à la vitesse de diffusion du métal en solution et à la vitesse d'association avec le site actif;

- 2- La membrane cytoplasmique est le site principal d'interactions avec un métal;
- 3- Aucune modification des sites actifs de la membrane ne s'opère dans le temps;
- 4- Aucune réponse biologique ne s'effectue lors de l'adsorption d'un métal sur un site actif de la membrane;
- 5- Les sites de transports ne sont pas saturés;
- 6- L'internalisation est de premier ordre;
- 7- La membrane cytoplasmique est homogène.
- 8- La réponse biologique est proportionnelle au flux d'internalisation cellulaire d'un métal ou à la concentration métal-site actif d'une membrane.

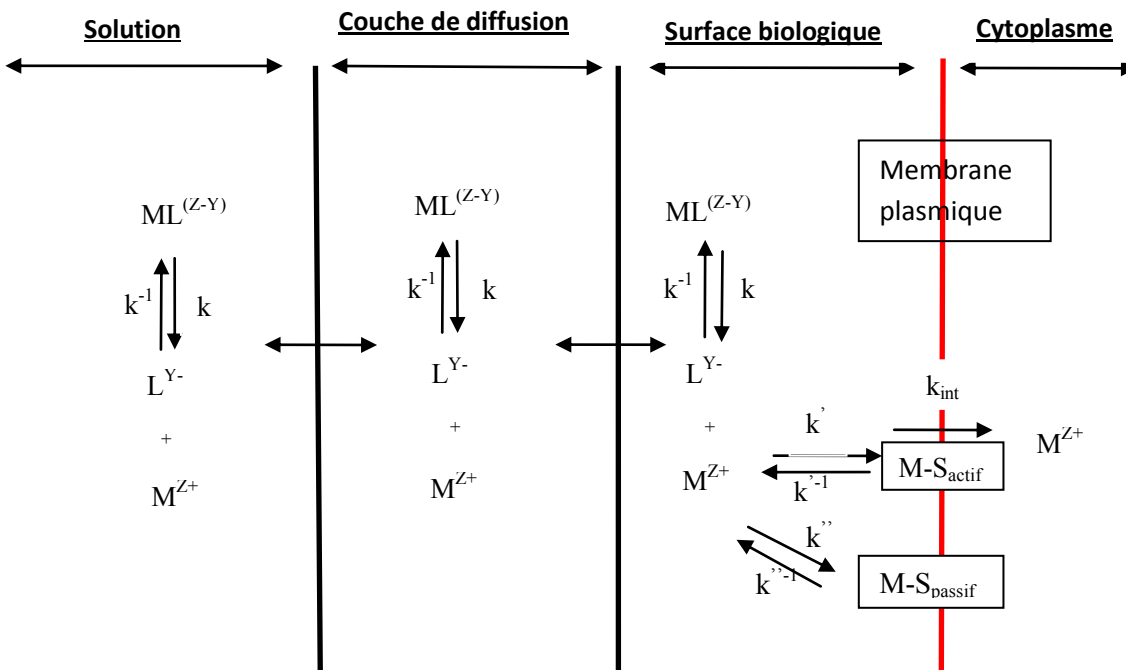


Figure 1.1 Schématisation du modèle d'équilibre de l'ion libre. k et k^{-1} représentent respectivement les vitesses de dissociation de $ML^{(Z-Y)}$ et d'association de M^{Z+} et L^{Y-} . k' combine les vitesses d'adsorption et de complexion de M^{Z+} sur S_{actif} , alors que k'^{-1} combine les vitesses de désorption et décomplexion de $M-S_{actif}$. k'' combine les vitesses d'adsorption et de complexion de M^{Z+} sur S_{passif} , alors que k''^{-1} combine les vitesses de désorption et

décomplexion de $M-S_{\text{passif}}$. k_{int} , la vitesse d'internalisation du métal, est supposé d'être inférieure à la vitesse de diffusion ($k_{\text{diffusion}}$). Inspirée de Campbell et al. (2002); Hassler et Wilkinson (2003).

La figure 1.1 illustre les concepts du FIM quant aux conditions d'équilibre entre la solution, la couche de diffusion et la surface cellulaire, et aux interactions entre un métal et un site de transport actif. Il est à noter que le modèle BLM se base sur les mêmes concepts que le FIM, à l'exception que le BLM s'intéresse à la mesure de la concentration surfacique métal-site actif plutôt qu'à la mesure de l'ion libre en solution. Puisque ces modèles ne s'intéressent qu'au mécanisme d'internalisation, des ligands de fortes affinités, tels que le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) pour l'argent (Fortin et al., 2000) ou l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pour le zinc et le cadmium (Hassler et al., 2003; Kola et al., 2005), sont utilisés afin d'enlever la fraction métallique adsorbée aux sites passifs. De ces expériences de bioaccumulation sont généralement tirées deux informations importantes, soient le flux d'internalisation du métal (J_{int}), représenté par la pente de l'internalisation en fonction du temps, et l'ordonnée à l'origine, $\{M-S_{\text{actif}}\}$, qui représente la quantité de métal adsorbée sur les sites actifs et qui est utilisée pour le BLM (Hassler et al., 2004; Slaveykova et Wilkinson, 2002). Habituellement, lorsque les prémisses sont respectées, une régression non-linéaire de type Michaelis-Menten (Éq. 1) peut être faite pour relier J_{int} et $[M^{Z+}]$ et de cette manière, une constante d'affinité métal-site actif (K_M) peut être déterminée (Kola et Wilkinson, 2005).

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} [M^{Z+}]}{K_M + [M^{Z+}]} \quad (\text{Éq. 1})$$

Quelques grandes limitations à l'applicabilité de ces modèles dans des milieux environnementaux aquatiques peuvent être mentionnées, telles que le nombre effarant de

constantes expérimentales qui doivent être déterminées en laboratoire, les effets de synergie de compétition et l'effet du temps sur les récepteurs biologiques. Toutefois, l'étude de l'applicabilité de ces modèles a permis, à ce jour, des découvertes intéressantes quant à certains mécanismes de bioaccumulation des métaux. Par exemples, Fortin et al (2000) ont montré qu'à de faibles concentrations en Ag total ($<10^{-7}$ M) la diffusion du métal en solution était limitative et que l'espèce AgCl^0 pouvait participer à l'internalisation d'argent par l'algue *C. reinhardtii*. Fortin et al. (2001) ont aussi mis en évidence l'internalisation du complexe AgS_2O_3^- via un transporteur anionique de l'algue *C. reinhardtii*. Finalement, Hassler et al. (2003) ont conclu que l'internalisation de Zn^{2+} par *Chlorella Kesslerii* était probablement mue via deux récepteurs, dont l'un était activé dans des conditions de croissance limitées en zinc.

1.2.2 Bioaccumulation de nAg, paramètres clés et choix de l'organisme test

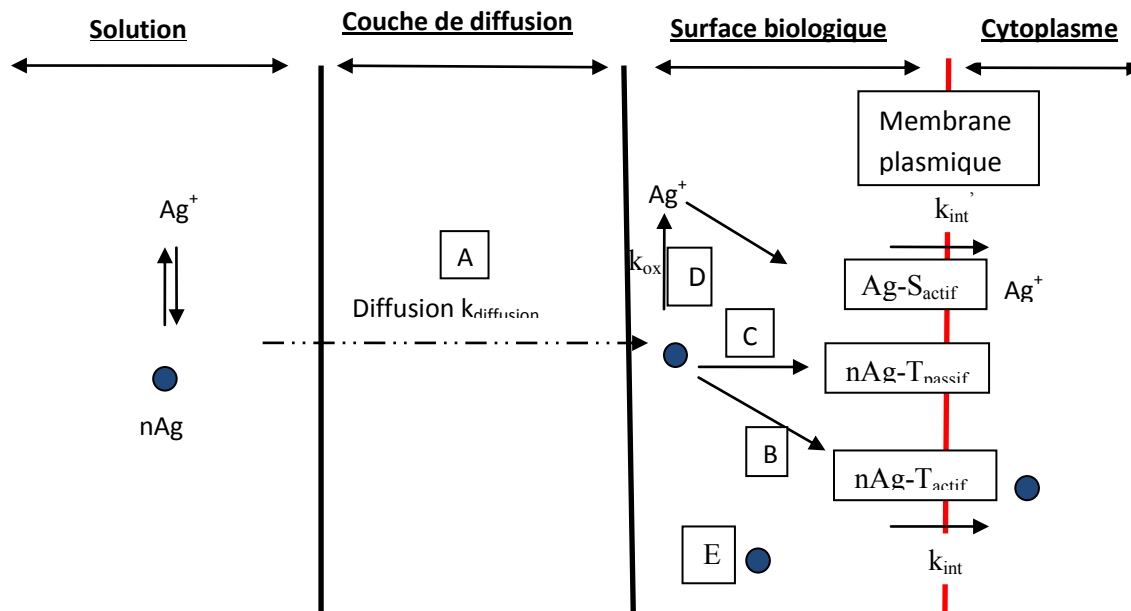


Figure 1.2 Schématisation d'interactions hypothétiques d'une nanoparticule d'argent avec une surface cellulaire.

A- Une nAg en équilibre redox avec l'ion Ag^+ diffuse vers la surface cellulaire à vitesse $k_{\text{diffusion}}$. B- La

nanoparticule s'adsorbe à un site actif (différent du site actif de l'ion), forme un complexe et est internalisée à travers la membrane plasmique. C- La nanoparticule s'adsorbe à un site passif et forme un complexe. D- La nanoparticule est oxydée en ions Ag^+ qui s'adsorbent sur un site actif, forment un complexe et sont internalisés à travers la membrane plasmique. E- La nanoparticule n'a aucune affinité pour des sites actifs, ni passifs et n'est pas oxydée. *Pour fins de simplification, seule la diffusion de la nanoparticule est représentée. Puisqu'il s'agit d'un modèle hypothétique, aucun équilibre n'a été supposé entre la solution et la surface cellulaire.

Inspirée de la figure 1.1, la figure 1.2, ci-dessus, illustre des interactions hypothétiques entre une surface cellulaire et une nAg. Une nanoparticule pourrait soit interagir avec une cellule exclusivement via l'un des trois mécanismes A, B, C; soit interagir avec une cellule via une combinaison des mécanismes A, B, C (il est implicite que cela implique plus d'une particule...) ou bien n'avoir aucune interaction avec la cellule. Il est à noter que le mécanisme C est proposé de par la découverte de l'oxydation de nanoparticules d'argent en présence de cellules algales (Navarro et al., 2008). Étant donné la propension des nAg à s'oxyder en milieux aqueux (Liu et al., 2010; Hadioui et al., 2013), des ions Ag^+ seront présents en concomitance avec des nAg. Un organisme exposé à une solution de nAg verra donc sa bioaccumulation d'argent être affectée par les deux espèces. Afin de pouvoir soustraire à la bioaccumulation totale d'argent celle due aux ions Ag^+ et, ainsi, de déterminer la bioaccumulation d'argent due aux nAg, il est nécessaire de déterminer la concentration initiale à l'équilibre en ions Ag^+ . Deux points clés sont identifiés : premièrement, il faut toujours mesurer la concentration en ions Ag^+ d'une solution de nAg avant toute expérience de bioaccumulation. Deuxièmement, il faut toujours mener une expérience de bioaccumulation parallèle sur une solution exclusive d'ions Ag^+ de concentration égale en ions Ag^+ à la solution de nAg.

Le coefficient de diffusion d'une nanoparticule sphérique peut être estimé par l'équation de Stokes-Einstein (Domingos et al., 2009).

$$C_{diffusion} = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (\text{Éq.2})$$

Le terme k représente la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T est la température (K), η est la viscosité du milieu ($\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et d est le diamètre (m). Un troisième point clé est la détermination de la taille des nanoparticules en solution. En effet, non seulement la diffusion vers la surface cellulaire en est inversement proportionnelle, mais des études ont déjà montré que la taille des nanoparticules peut avoir une influence au niveau physiologique (Morones et al., 2005; Choi et al., 2008).

Les deux premiers points clés permettent de déterminer la bioaccumulation d'argent due aux nAg comme telles. Par contre, tels qu'illustrés dans la figure 1.2, plusieurs mécanismes (A, B, C) peuvent expliquer la bioaccumulation d'argent par les nAg. Puisqu'il a été discuté précédemment de la grande toxicité de l'ion Ag^+ , il est très intéressant d'évaluer l'importance du mécanisme C par rapport aux mécanismes A et B. En ce sens, un quatrième point clé est la mesure de marqueurs biologiques (discutés dans la section 1.2.3) spécifiques à l'ion Ag^+ . En effet, les concentrations en ces marqueurs biologiques peuvent être mesurées et comparées chez un organisme exposé soit à une solution de nAg (présence des espèces nAg et Ag^+) ou soit à une solution de concentration en ions Ag^+ équivalente. Des différences de concentrations des marqueurs biologiques pourraient indiquer, par exemple, une augmentation de la bioaccumulation d'ions Ag^+ par le mécanisme C.

L'organisme aquatique qui se prête le mieux à l'étude de la bioaccumulation de nAg est l'algue verte *C. reinhardtii*. Premièrement, les algues ont un rôle écologique très important (Sigg et al., 1995). Deuxièmement, dans une revue de littérature par Ratte (1999), il est montré que les algues sont les organismes aquatiques les plus sensibles à la bioaccumulation d'argent. Troisièmement, il a été démontré à plusieurs reprises que l'algue *C. reinhardtii* bioaccumule l'argent à très grande vitesse par transport accidentel à travers un transporteur spécifique au cuivre (Fortin et Campbell, 2000 ; Lee et al., 2004). Quatrièmement, un travail colossal effectué par Merchant et al., (2007) a permis d'identifier le génome complet de *C. reinhardtii*; conséquemment, la recherche de marqueurs biologiques peut se faire beaucoup plus efficacement. Cinquièmement, parce que *C. reinhardtii* est un organisme unicellulaire, les mécanismes de bioaccumulation sont beaucoup plus simples à évaluer et les réponses toxicologiques (marqueurs biologiques) sont mesurées rapidement. Finalement, *C. reinhardtii* se cultive très bien en laboratoire et une culture fraîche se prépare en quelques jours.

1.2.3 Mesure de la fraction d'ions Ag^+ d'une solution de nAg

Tel qu'expliqué dans la dernière section, il est primordial de déterminer la concentration en ions Ag^+ d'une solution de nAg afin de bien distinguer l'apport respectif de chacune des espèces à la bioaccumulation d'argent de *C. reinhardtii*. À cette fin, plusieurs techniques peuvent être exploitées selon les contraintes expérimentales définies. Alors que certaines techniques mesurent exclusivement la fraction libre (ionique) d'une solution d'ions métalliques, d'autres en mesurent la fraction totale dissoute (soient les fractions ionique et non particulaire labile, et non labile), et d'autres en mesurent la fraction dissoute faiblement complexée (soient les fractions ionique et non particulaire labile). Une revue par Pesavento et

al. (2009) catégorise les techniques de spéciation des métaux selon qu'elles soient électrochimiques (ex. : l'électrode sélective, la voltammétrie à courant anodique, la chronopotentiométrie à courant anodique constant et la voltamétrie anodique d'équilibre Nernstien en absence de gradient) ou non électrochimiques (ex. : résines échangeuses d'ions, ultrafiltration par centrifugation). Chacune des techniques énumérées ci-haut possède des avantages et des inconvénients.

Dans la catégorie des techniques électrochimiques de mesure de spéciation, l'électrode sélective est quelque peu à part par rapport aux techniques voltamétriques en ce sens qu'elle mesure une différence de potentiel à l'interface entre son milieu interne et la solution, plutôt que de mesurer un courant d'oxydation d'ions métalliques pré-concentrés. L'interface milieu interne/solution analytique d'une électrode sélective permet la mesure de l'activité d'ions spécifiques dans des milieux à plusieurs éléments (dépendamment des interférences entre ceux-ci) et n'est sensible qu'à l'activité de la fraction libre et non pas des fractions labiles, et non labiles; de plus, l'électrode peut généralement être calibrée de façon directe (dépendamment de la complexité de la matrice). Toutefois, les limites de détection sont généralement élevées d'un point de vue environnemental (10^{-6} - 10^{-7} M; Pretsch et al. (2007)), quoique certaines avancées récentes ont permis d'abaisser ces limites (Bakker et al. (2005)). Benoit et al. (2013) ont montré l'efficacité d'une électrode sélective à l'argent pour la mesure de la fraction ionique d'argent libérée dans des sols par des nanoparticules.

Afin de diminuer les limites de détection, les techniques voltamétriques pré-concentrent les ions métalliques par réduction à une électrode de travail (électrode à goutte de mercure généralement). Ainsi, une technique comme la voltamétrie à courant anodique permet

une limite de détection plus basse (10^{-12} - 10^{-13} M; Pretsch et al. (2007)), mais elle ne s'applique qu'aux solutions d'un seul élément analyte, elle n'est pas très reproductible et elle ne permet pas de distinguer entre la fraction libre et la fraction labile dissoute, c'est-à-dire que plusieurs espèces peuvent être réduites durant la phase de pré-concentration. Aucune étude n'a été répertoriée dans la littérature quant à l'utilisation de cette technique pour mesurer la spéciation d'une solution de nanoparticules.

La chronopotentiométrie à courant anodique constant utilise également une pré-concentration des espèces métalliques (ionique et labile) à une électrode de travail, puis un faible courant anodique (courant d'oxydation) permet l'oxydation complète de la quantité de métal réduit au départ à l'électrode de travail et donne ainsi une meilleure reproductibilité quantitative que la voltamétrie à courant anodique. L'intégrale du courant de réduction en fonction du temps de déposition donne la charge accumulée dans l'électrode de travail de départ et cette charge est proportionnelle au temps de déplétion des ions métalliques lors de l'étape d'oxydation à courant constant. Une calibration directe avec une seule solution de concentration connue est nécessaire pour cette technique. Cette technique permet également de déterminer la constante d'affinité entre un métal et un complexant connu; par contre, cette tâche est fastidieuse et les résultats ne sont fiables que pour des solutions en présence d'un seul complexant. Cette technique ne peut donc être employée pour plus d'un élément à la fois. Domingos et al. (2013) ont utilisé cette technique avec succès afin de caractériser la spéciation de nanoparticules de zinc en solution.

Une des techniques voltamétriques les plus avancées est la voltamétrie anodique d'équilibre Nernstien en absence de gradient; celle-ci permet la quantification de la fraction

libre présente en concomitance avec la fraction dissoute labile et non labile du même élément. Un potentiel de réduction est appliqué à l'électrode de travail durant un temps précis afin de pré-concentrer l'élément analyte et de créer un équilibre Nernstien d'oxydo-réduction dans l'électrode. Un potentiel d'oxydation est ensuite appliqué et le courant d'oxydation mesuré est proportionnel à la concentration en ions libres (fraction libre). Les limites de détection sont similaires aux deux techniques susmentionnées. Cette technique requiert de longs temps de pré-concentration et d'équilibration, surtout pour des mesures de très faibles concentrations. Domingos et al. (2011) ont démontré l'efficacité de cette technique à mesurer la fraction libre de cadmium de solutions de Quantum dots (points quantiques); Galceran et al. (2007) ont utilisé cette technique pour mesurer les concentrations en zinc libre de l'eau de mer.

Les techniques de mesure de spéciation dites non électrochimiques sont des techniques qui séparent les fractions dissoutes et non dissoutes, fractions dont la mesure ou la quantification se fait subséquentement- à l'aide d'un ICP-MS par exemple. Les résines échangeuses d'ions permettent de séparer la fraction libre des fractions dissoutes labile et non labile. Toutefois, cette technique est limitée à un seul élément analyte et peut nécessiter de longs temps d'équilibre, et de grands volumes de solutions. Hadioui et al. (2013) ont démontré l'efficacité de cette technique à mesurer la fraction libre de solutions de nAg de faibles concentrations. Finalement, une technique très utilisée dans les publications sur les nanoparticules (Hadioui et al. (2013); Kennedy et al. (2010); Liu et al.(2010)) est l'ultrafiltration par centrifugation. Cette technique permet de séparer la fraction dissoute de la fraction particulaire de solutions de nanoparticules, dont des fractions dissoutes de concentrations inférieures à $1 \mu\text{gL}^{-1}$, et peut être utilisée pour des solutions de multiples

éléments; cependant, cette technique ne permet pas de discriminer la fraction libre de la fraction totale dissoute.

En résumé, il apert que le choix d'une technique de mesure de spéciation d'une solution de nanoparticules soit influencé d'une part par les conditions expérimentales (ex. : présence ou absence de complexants; nombre d'éléments concomitants) et d'autre part par les besoins (soit de distinguer la fraction libre de la fraction totale dissoute ou non).

1.2.4 Marqueurs biologiques et choix des ARNm

Selon Henderson et al. (1989), un marqueur biologique est un changement dans un système biologique relié à l'exposition à une molécule xénobiotique ou à tout autre type de matériel toxique. Un exemple de marqueurs biologiques spécifiques chez *C. reinhardtii* est la stimulation de phytochélatines suite à des expositions au cadmium ou au cuivre (Abboud et Wilkinson, 2013; Howe et Merchant, 1992). Par contre, avant la découverte du génome de *C. reinhardtii* (Merchant et al. 2007), aucun marqueur biologique spécifique n'avait été mis en évidence pour des expositions à l'argent.

Une analyse de la réponse transcriptomique de *C. reinhardtii* suite à des expositions à différentes nanoparticules métalliques a déterminé que l'abondance de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'enzyme Isocitrate Lyase 1 (ICL1) était fortement plus élevée suite à l'exposition à des nAg (Simon et al., 2013). L'ARNm est une molécule fille de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et sert à la synthèse des protéines au niveau cellulaire (Nature Education, 2013). Chez une cellule eukaryote (avec membrane nucléaire), telle que l'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii*, la régulation de la transcription d'ADN en ARNm est très complexe et met en jeu plusieurs protéines dites régulatrices qui vont soit stimuler ou inhiber

la transcription de l'ADN en ARNm (Nature Education, 2013). L'enzyme ICL1 fait partie du cycle Glyoxylate qui joue un rôle métabolique essentiel chez plusieurs microorganismes en permettant la croissance cellulaire à partir de l'acétate (Bedhomme et al., 2009).

Le deuxième ARNm choisit comme témoin de la bioaccumulation d'argent est celui de la protéine Copper Transporter 2 (CTR2). En effet, plusieurs études ont fait un lien des sites similaires de transports pour les ions Ag^+ et Cu^{2+} (Howe et al., 1992; Solioz et al., 1995). Fortin et Campbell (2000) ont trouvé que la bioaccumulation d'argent était de beaucoup réduite en présence de cuivre et suggérèrent aussi que les ions Ag^+ et Cu^{2+} partageraient le même transporteur. Page et Merchant (2009) ont montré que l'abondance de trois ARNm était très étroitement liée aux concentrations en Cu^{2+} dans les solutions de croissance; deux de ces ARNm correspondent à des protéines associées à la membrane plasmique, soient Copper Transporter 1 (CTR1) et CTR2. Aucune étude n'a été menée avant celle-ci sur le lien entre la bioaccumulation d'argent par *C. reinhardtii* et l'abondance de l'ARNm de CTR2.

1.3 Les buts de l'étude

Dans cette étude, l'algue *C. reinhardtii* est exposée à des solutions de nAg (taille de 5 nm; enrobage de polyacrylate) et à des solutions de Ag^+ . Les buts sont de quantifier la bioaccumulation d'argent due aux nAg comme telles et, le cas échéant, d'identifier les mécanismes sous-tendant cette bioaccumulation. Les abondances des ARNm de l'enzyme ICL1 et de la protéine CTR2 sont mesurées comme témoins à la bioaccumulation d'ions Ag^+ .

2. Article

L'article présenté ci-dessous a été publié dans la revue *Environmental Science and Technology* :
Leclerc, S. Wilkinson, K.J. Bioaccumulation of Nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*-
Nanoparticle or the Free Ion? *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48(1), p.358-364.

Je, Simon Leclerc, suis responsable de la majorité de tous les résultats présentés dans cet article, ainsi que de l'écriture de l'article, qui a été faite en étroite collaboration avec mon directeur de recherche Kevin J. Wilkinson.

Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*—
nanoparticle or the free ion?

Simon Leclerc and Kevin J. Wilkinson

Biophysical Environmental Chemistry Group
Department of Chemistry
University of Montreal
C.P. 6128
Succursale Centre-ville
Montreal, Canada H3C 3J7

Abstract

The bioavailability of a small silver nanoparticle (nAg; nominal size of 5 nm with a polyacrylate coating) by the green alga *C. reinhardtii* was investigated in order to assess the contributions of Ag^+ and nAg to cellular internalization. Upon exposure to nAg, Ag biouptake exceeded what was predicted based upon measured Ag^+ concentrations. Indeed, although Ag biouptake was greatly reduced when excess cysteine was added to the nAg, it was nonetheless significantly above control levels. For both exposures to nAg and Ag^+ , expression levels of the Copper Transport Protein 2 (CTR2) indicated that Ag biouptake could be attributed to the internalization of Ag^+ . Exposure to Ag^+ or nAg increased CTR2 expression, even when cysteine was present with the nAg. Darkfield microscopy coupled with hyperspectral imagery showed that the presence of silver nanoparticulates inside the cells was more likely due to the reduction of Ag^+ than to the internalization of nAg. The weight of evidence indicated that nAg increased Ag biouptake by locally increasing surface concentrations of Ag^+ .

Introduction

The production of engineered nanoparticles, including nanosilver (nAg), has greatly expanded in this century and is still on the rise. Nanosilver is being produced with a broad range of characteristics, e.g. size, coating, shape and surface charge, and can presently be found in over 300 consumer products¹. The inherent toxicity of silver and the increased production of nAg have resulted in increased concerns with respect to silver releases to the environment.

Nanomaterials are thought to exert their toxicity either due to the distinctive properties that result from their small sizes or through the release of the elements making up the materials^{2,3}. In that respect, studies have shown that nAg can yield significant quantities of ionic silver, mainly via particle oxidation^{4,5}. An early review on the bioavailability of dissolved Ag in the environment⁶ concluded that silver toxicity was primarily due to the concentration of free ion, although small complexes such as silver chloride and silver thiosulfate have more recently been shown to be bioavailable^{7,8}. Clearly, any assessment of the risks associated with silver nanoparticles will need to take into account the release of silver ions, its complexation, and the roles of nanoparticle aging⁹ on Ag bioavailability.

While several studies have compared the **toxicity** of silver nanoparticles to that of ionic silver, there is still no consensus in the literature. For example, Navarro et al.¹⁰ suggested that the toxicity of nAg to *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) was mediated by the initial concentration of ionic silver and its further release due to its active dissolution upon contact with the algae¹⁰. Miao et al.¹¹ came to a similar conclusion, suggesting that ionic Ag resulting from the dissolution of nAg was responsible for its toxicity to *Thalassiosira weissflogii*¹¹. In contrast,

both Morones et al.¹² (*Escherichia coli*) and Choi et al.¹³ (nitrifying bacteria) concluded that the toxicity of nAg and ionic silver resulted from separate pathways.

One of the main difficulties in distinguishing the bioavailability of nAg from that of the free ion is that Ag speciation measurements are difficult to perform at the low concentrations that are the most relevant for the toxicological experiments. Specifically, in controlled media containing few ligands, the relative proportion of free ions increases significantly as particle concentrations are lowered due to increased particle oxidation and Ag^+ desorption.^{4,5} Furthermore, given that the biological uptake of Ag may be diffusion limited¹⁴, numerous silver species may contribute to bioaccumulation according to their dissociation/dissolution/oxidation rate constants and diffusion coefficients (D)¹⁵. Such a behavior contrasts with that observed for most other trace metals¹⁵ and implies that Ag^+ could be produced locally (i.e. at the biological interface) from the dissociation of nAg (or Ag complexes¹⁶). In other words, for nAg, one cannot assume that the speciation of Ag is the same at the biological surface as it is in the bulk solution. Therefore, it is essential to carefully quantify particle dissolution, under all experimental conditions, in order to gain a mechanistic insight into nAg bioavailability. Furthermore, since under diffusion limitation, very small nAg (larger D) are predicted to be more bioavailable than larger particles, they should be a priority for study.

In this study, the bioaccumulation of a small (5 nm) nAg was compared with that of the free ion. Oxidation/dissolution of the nAg was carefully measured under all experimental conditions. The mRNA expression levels for the presumed ionic Ag^+ transporter were quantified for experiments performed with both Ag^+ and nAg. Finally, the presence of nanosilver was verified inside the algal cells using dark field microscopy coupled to hyperspectral imaging.

Materials and Methods

Materials

Prior to all experiments, polycarbonate Nalgene flasks and pipette tips were soaked for 24 hours in 2% (v/v) nitric acid prior to abundant rinsing with Milli-Q water (resistivity of 18.2 M Ω cm, organic carbon <2 μ g C L⁻¹). Materials were dried in a laminar flow hood where they were irradiated with UV light. All reagents (analytical or ultrapure grades) were purchased from Sigma-Aldrich, except for Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (ultrapure; VWR), acetic acid (analytical grade; Fisher Scientific), silver nitrate (ICP-MS standard; Inorganic Ventures), nitric acid (Trace Select Ultra; Fluka) and sodium thiosulfate (99% extra pure; Acros Organics).

Quantification of dissolved Ag

Recently, we assessed the capacity of multiple analytical techniques to quantify ionic silver within solutions of silver nanoparticles^{4,17}. In simple solutions (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-buffered solutions at pH 6.0) similar to those used here, the centrifugal ultrafiltration technique gave results that were highly consistent with measurements of Ag⁺ obtained using an ion-exchange resin and total dissolved silver obtained using single particle ICP-MS. Thus, although centrifugal ultrafiltration results are presented here; in the experimental medium used for algal exposures (1x10⁻² M HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich at pH 7.0), >99% of the dissolved silver is likely Ag⁺.

Nanoparticles were separated from dissolved Ag by centrifuging 4 mL of sample at 4000 2500 x g through a 3 kDa centrifugal ultrafiltration unit (EMD Millipore) for 15 min. In order to

ensure that adsorptive losses of Ag were negligible (Fig. S1), both the supernatant and the filtrate were discarded and the protocol was repeated 3x. On the fourth cycle, 1 mL of the filtrate was recovered, acidified (2% HNO₃) and used to determine concentrations of Ag⁺.

Size distribution of the nAg

The size distribution of the nAg was determined after 24 hours of incubation in 1×10^{-2} M HEPES (pH 7.0). Twenty μL of a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ solution of nAg was deposited on a transmission electron microscopy (TEM) Cu holey carbon copper 200 mesh grid (Electron Microscopy Sciences). The grid was left to dry overnight under a laminar flow hood. The following day, the grid was imaged by TEM (JEOL; model JEM-2100F operated at 200 kV). ImageJ¹⁸ was used to measure the size distribution of the nanoparticles.

Analytical ultracentrifugation (Beckman XLI) was performed on the nAg samples at a concentration of 5 mg L^{-1} . Sedimentation profiles were determined by ultracentrifugation the samples at 35000 rpm (ca. 89000 xg) using interference detection. The sedimentation coefficient distribution was determined using SEDFIT (v. 14.1). The Stokes Equation was employed to calculate a particle size distribution based upon an assumed particle density of 10.5 g cm^{-3} .

Algal cultures

C. reinhardtii (wild type C137) was cultured in two steps. The first step consisted of the controlled transfer of algal cells from a petri dish to 100 mL of a defined growth solution (4X diluted Tris-Acetate-Phosphate (TAP) medium^{19,20}). Solutions were incubated with a 12 hour light/12 hour dark cycle using 100 rpm of rotary agitation at a temperature of 20 °C until they reached their exponential growth phase (generally within three days). Cell numbers and surface areas were measured using a Multisizer 3 cell counter (Beckman Coulter). Once the exponential

growth phase was attained, a small volume of cells were transferred into 1 L of fresh growth media in order to reach an initial cell density of $0.8-1 \times 10^5$ cells mL^{-1} . The 1 L solution was incubated until it again reached the exponential growth phase (typically 6 d).

Algae were harvested by centrifuging at 2500 $\times g$ for 10 min. Supernatants were discarded and algal pellets were resuspended in HEPES medium (pH 7.00). After the second wash with HEPES, the cell pellet was kept for dilution into the experimental solutions (see below). The cell density of the algal concentrate was measured with the Multisizer 3 cell counter.

Algal exposures to experimental solutions

Solutions of nAg or ionic silver were buffered in 1×10^{-2} M HEPES at pH 7.0. A small amount of calcium nitrate tetrahydrate (5×10^{-5} M, ACS reagent grade; Sigma-Aldrich) was added to the solutions to ensure cellular integrity. Samples were equilibrated in the dark for 24 hours prior to algal addition. Indeed, two preliminary experiments showed that concentrations of total and ionic silver evolved until 24 h of equilibration time was reached (Figure S2). The nAg solutions were prepared from a stock solution of 500 mg Ag L^{-1} (Vive Crop Protection- formerly Vive Nano) whereas the solutions of ionic silver were prepared from a solution of AgNO_3 ($1000 \text{ mg Ag L}^{-1}$ ICP-MS standard; Inorganic Ventures). Exposure concentrations ($0-100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) were selected so that exposures were as environmentally relevant as possible, while ensuring sufficient signal to noise ratio to quantitatively distinguish the effects of Ag^+ and nAg.

The cell pellet that was collected above was diluted into the experimental solutions in order to obtain either 0.2 or $1 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ ($110,000$ or $560,000$ cells mL^{-1}) of algae in $300-800 \text{ mL}$ of experimental solution containing either ionic Ag or nAg. Samples were incubated under light

using 100 rpm of agitation (20 °C). Controls corresponded to identically prepared samples containing no added silver.

For bioaccumulation experiments, following exposure to Ag containing solutions, duplicate or triplicate samples of 30 mL were filtered over 3.0 µm nitrocellulose filters (SSWP, Millipore) in order to harvest the algae. For many of the experiments, two superimposed filters were employed to control the adsorptive losses of Ag. Filters supporting the algal cells were rinsed with 20 mL of 5×10^{-3} M sodium thiosulfate (99% extra pure, Acros Organics) or 5×10^{-3} M cysteine in order to remove metal adsorbed to the outer cell^{10,14,21} (Figure S3). Filters were recovered in 15 mL polypropylene tubes and digested with 200 µL of ultrapure nitric acid (Trace Select Ultra, Fluka) at 85 °C until transparent. Samples were diluted to 10 mL (2% v/v HNO₃) prior to analysis by ICP-MS (Nexion 300X, Perkin-Elmer). For exposures to ionic silver, the silver content of the algae was corrected by accounting for the passive adsorptive losses of Ag (subtraction of the lower filter; adsorptive loss were ca. 10%). For exposures to nAg, a similar correction was obtained by independently filtering the supernatant of an algal exposure solution, i.e. solution in which the algae but not the nAg had been removed. Mass balances were performed by dividing the initial Ag concentration (obtained from triplicate measurements) by the sum of the algal filtrate and algal digest. Samples with mass balances outside the 80-120% range were discarded (<10% of the samples).

For the *transcriptomic experiments* (performed in parallel to the bioaccumulation experiments), duplicate samples of the algal cells were collected by centrifuging the experimental solutions 2500 xg for 10 min. Pellets were transferred to an Eppendorf tube and centrifuged at 13000 rpm (10500 xg) for 3 min. Supernatants were analysed for Ag and the pellets were stored at -80 °C until required for mRNA extraction.

Transcriptomic analysis

Algal cells were broken by 3 consecutive cycles of freeze/thawing (20°C/−80°C). Proteins were removed by digestion with 20 g/L of proteinase K for 30 min at 65 °C. Finally, samples were centrifuged at 10500 xg for 10 min and supernatants were recovered in Eppendorf tubes where they were diluted 5x. Triplicate samples were pipetted into a multiwell plate that had been pretreated for mRNA quantification using a protocol that is detailed online (Panomics²²). In brief, a commercially available mRNA microarrays were covered by aluminum foil and incubated for 20 hours at 55°C in order to facilitate the attachment of the mRNA to the inside surface of the wells. Following incubation, a series of washing and signal amplification steps were performed. The mRNA is then quantified from the sample luminescence measured on a TECAN infinite M200 plate reader. The mean luminescence and standard deviation were calculated from the triplicate measurements. The relative expression of the reporter genes was determined by subtracting the average background signal. Fold expression values were determined by dividing expression levels for the reporter by the value obtained for the control sample (no Ag). All materials and reagents (e.g. mRNA, multiwell plates, etc.) were purchased from Affymetrix (Santa Clara, USA).

Darkfield microscopy/ hyperspectral analysis

Optical and hyperspectral images along with hyperspectral data were captured utilizing a research grade optical microscope equipped with an advanced dark field illumination system integrating hyperspectral analysis (CytoViva). The hyperspectral imaging camera collects the light that is directly incident upon the sample. An automated stage allows the confluent imaging of a chosen field of view one line at a time. In this manner, spatial and spectral data are collected

for each pixel in the line. Once an image has been created, analysis is performed in order to spectrally determine the location of a given material of interest. In this case, a reference spectral library was created by collecting spectral results on a solution containing only nAg and then searching algal samples that had been exposed to either $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of nAg or $20 \mu\text{g L}^{-1}$ of Ag^+ in the (4x diluted) TAP medium. The software algorithm compares every spectra in the reference library with those in the unknown sample in order to give a final mapped image that is based on the matching spectral signatures.

Statistics

Significant differences were identified using a One-way Analysis of Variance (ANOVA; SigmaPlot 11.0). In cases of a significant F -statistic ($p < 0.05$), a Holm-Sidak test was used to distinguish differences among the means at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Characterisation of nAg

The size distribution of 84 nanoparticles imaged by TEM (Fig. 1A) gave an average particle diameter of 4 nm with a standard deviation of 2 nm. Particle sizes ranged from 2 nm to 11 nm (Fig. 1B). For the nAg in solution, a very similar size distribution was obtained using analytical ultracentrifugation (Fig. 1C).

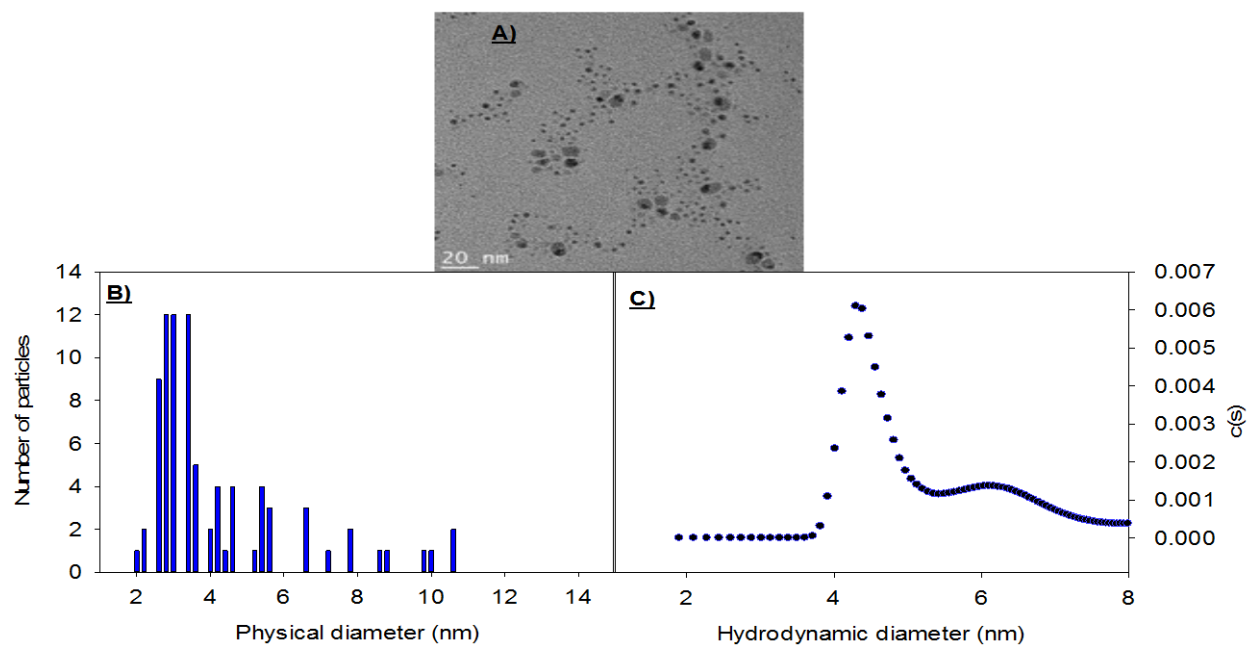


Figure 1 A) TEM image of the nAg deposited on a holey carbon coated copper 200 mesh grid. B) Histogram of the distribution of the physical diameters of the nAg. C) Hydrodynamic diameters determined from analytical ultracentrifugation

Bioaccumulation of nAg and ionic silver

Bioaccumulation and gene expression experiments were performed on separate aliquots of identical samples. In both cases, experiments were performed over 2 hours and using low cell densities ($560,000 \text{ cells mL}^{-1}$) in order to maximize the transcriptomic response (Figure S4), while minimizing Ag depletion in the medium. When plotted as a function of the total Ag in solution, biouptake was significantly higher for cells exposed to silver nitrate as compared to those exposed to nAg (Fig. 2A). On the other hand, when normalized for Ag^+ concentrations in the exposure media, cells that were exposed to nAg had significantly greater biouptake than those exposed to ionic silver (Fig. 2B). Although nAg solutions contained both nAg and

dissolved silver, the presence of nAg clearly contributed to Ag biouptake by the cells (internalization slope of 0.0008 ± 0.0001 for the nAg; 0.0005 ± 0.0001 for the ionic silver; Fig. 2B, $p < 0.0001$).

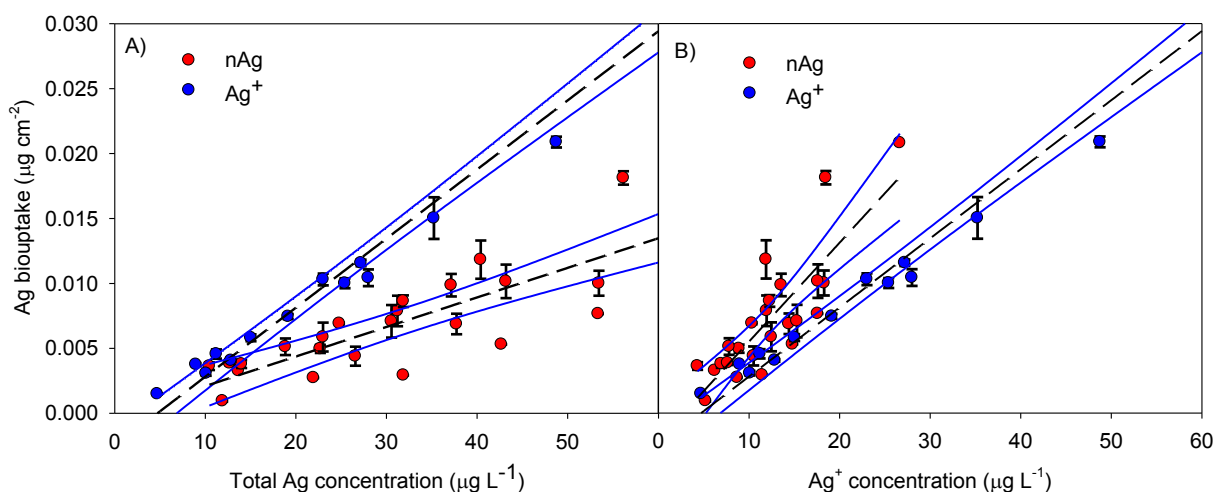


Figure 2 A) Ag biouptake as a function of the concentration of total silver. B) Ag biouptake as a function of the Ag^+ concentration. Error bars represent standard deviations for technical triplicates (triplicate measurements performed on algae harvested on the same day). Blue lines indicate 95% confidence intervals.

Mechanism of Ag uptake

Solioz et al.²³ have shown that copper and silver can be internalised via a Cu (I) ATPase. Indeed, the genes encoding the proteins CTR1, CTR2 and CTR3 (CTR1 and CTR2 correspond to Cu(I) transporters) have been shown to be upregulated under copper deficient growth conditions in *C. reinhardtii*²⁴. Furthermore, both toxicity and bioaccumulation results support the hypothesis of a similar uptake site. For example, Howe et al.²⁵, demonstrated that the concomitant presence of copper and silver decreased the toxicity of the latter in *C. reinhardtii*, suggesting that it was due to competition between the two metals for a similar transport site. Fortin et al.²⁶ later

provided further proof of a competitive interaction by showing that the addition of copper could decrease Ag biouptake by *C. reinhardtii*.

In order to further distinguish the effects of nAg from Ag^+ , a biouptake experiment was performed in the presence and absence of a 100x excess of cysteine. Cysteine is known to strongly bind Ag^+ ($\log K = 11.5$)²⁷ and has been shown to alleviate Ag toxicity (nAg and Ag^+) in *C. reinhardtii*¹⁰. In parallel, expression levels of CTR2 were determined, under the hypothesis that the Cu(I) transporter would be specific to the presence of Ag^+ but would not react with nAg.

For experiments performed on the cells harvested under the same conditions as Figure 2B, no significant differences were observed between the induction of CTR2 following exposure to the nAg or the Ag^+ treatments (Figure S5). Note that Figure S5 was the result of numerous experiments over of several months (i.e. biological rather than technical replicates). In order to probe more subtle differences in gene expression, a complementary experiment was designed using a low cell density of 110,000 cells mL^{-1} and for which bioaccumulation and gene expression experiments were performed on a single cell isolate (Fig. 3). As expected, biouptake increased with an increase in the concentration of free Ag^+ in the exposure solutions (first three bars). Furthermore, in agreement with Fig. 2, biouptake increased significantly for the exposure containing 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ nAg (7.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ag^+) when compared to a similar concentration of free Ag^+ without nAg (i.e. compare bar 4 to bars 1 and 2). The addition of cysteine, at a concentration that was sufficient to bind >99% of the free Ag resulted in a large decrease in Ag bioaccumulation. Nonetheless, biouptake was not completely attenuated (levels corresponded to that observed for ca. 4 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$), strongly indicating that nAg, in addition to the Ag^+ , was contributing to the Ag biouptake flux.

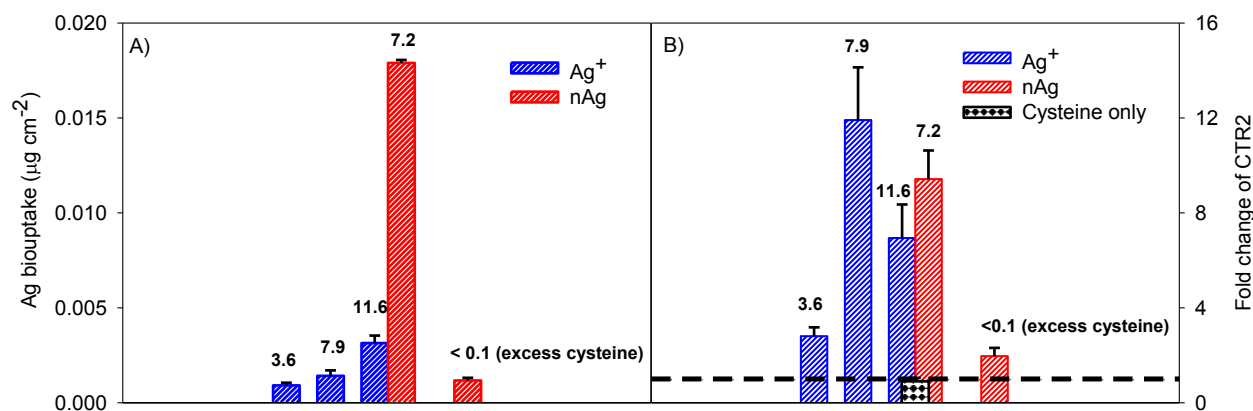


Figure 3 A) Ag biouptake by *C. reinhardtii* (algal cell density of 100,000 cell mL⁻¹) following 60 min. exposures to solutions of Ag⁺ or nAg. With exception of the nAg solution containing excess cysteine where >99% of the Ag⁺ was bound to cysteine, **measured** concentrations of Ag⁺ (µg L⁻¹) are given above the bars. B) Fold change of CTR2 with respect to a non Ag exposed control (Black dashed line) that was obtained for the same conditions as A). An additional control, corresponding to the addition of cysteine in the absence of added Ag was also measured in order to account for the effect of cysteine alone. The nAg media were prepared so that Ag⁺ concentrations would be similar to those in the exposures of Ag⁺ alone. In the nAg exposure, 20 µg L⁻¹ of nAg and 7.2 µg L⁻¹ of Ag⁺ were determined. In the presence of a 100x excess of cysteine, 13 µg L⁻¹ of nAg was measured, whereas no Ag⁺ could be determined.

CTR2 mRNA levels were strongly stimulated by both Ag⁺ and by the nAg-Ag⁺ mixture (Fig. 3B). While the addition of cysteine resulted in a strong decrease in CTR2 induction, it did not completely attenuate the transcriptomic response- CTR2 mRNA levels were double control values (significant difference at $p < 0.05$; Student t-test). Both the transcriptomic and bioaccumulation results were consistent with an uptake that corresponded primarily to the transfer of Ag⁺ over the Cu(I) transporter. Nonetheless, in the presence of nAg, both bioaccumulation and CTR2 induction were increased to levels that could not be explained solely by Ag⁺ concentrations in the bulk solution. Two possible explanations for the increased biouptake in the presence of nAg were examined in greater detail: (i) the nAg is able to enter the

cells or (ii) the diffusive flux of nAg is sufficient to increase the local concentration of Ag^+ at the cell surface (resulting in increased cellular biouptake).

Internalization of nAg

Dark field microscopy coupled with hyperspectral imagery was performed to see if nAg could be detected within the algal cells. Using control solutions of the nAg in solution (Fig. 4A), spectral reference libraries (Fig. 4B) were first generated on the level of a single pixel (ca. 160 nm x 160 nm). Algal cells exposed to solutions of nAg were then searched for the corresponding spectra of the nAg reference libraries. *No positive matches* were obtained when searching for the reference library of the control nAg. Nonetheless, numerous silver nanoparticles (Figure 4E, 4F) were observed both on the surface and inside the algal cells, with each particle type producing a distinct spectral library, i.e. particles inside the cells (Fig. 4G) were different from those outside the cells (Fig. 4F). Both surface-bound and internalized particles experienced a significant blue shift (ca. 50 nm) with respect to the original nAg. Control cells (Fig. 4C, 4D) did not show the peak around 500-550 nm that was specific for particulate Ag.

The observation of a blue shift in the hyperspectral library of the nAg associated with the alga is not sufficient evidence to exclude the possibility that nAg were being internalized by the cells and that particle “aging” or a change in the physicochemical environment of the nAg was causing the spectral modifications. On the other hand, *when cells were exposed to Ag^+* , nanoscale deposits of Ag (Figure 4I) could be identified, both on the surface and inside the cells, when using hyperspectral library that had been generated during the nAg exposure. In other words, similar nanoscale deposits of Ag were formed inside and on the surface of the algal cells following their exposure to either Ag^+ or nAg. **The hyperspectral signal depended upon the**

cell localization (internalized vs. surface bound) but not upon the source of Ag (Ag^+ vs. nAg). The strong correlation between the spectral signals generated for the Ag^+ and nAg exposures strongly suggests that the nanoscale deposits of Ag was generated following the *in situ* reduction or precipitation of Ag^+ . Indeed, Barwal et al.²⁸ have speculated on a similar *in situ* formation of nAg following the exposure of *C. reinhardtii* to ionic silver. In that case, the nAg that was formed inside the cells was shown to be associated with intracellular proteins.

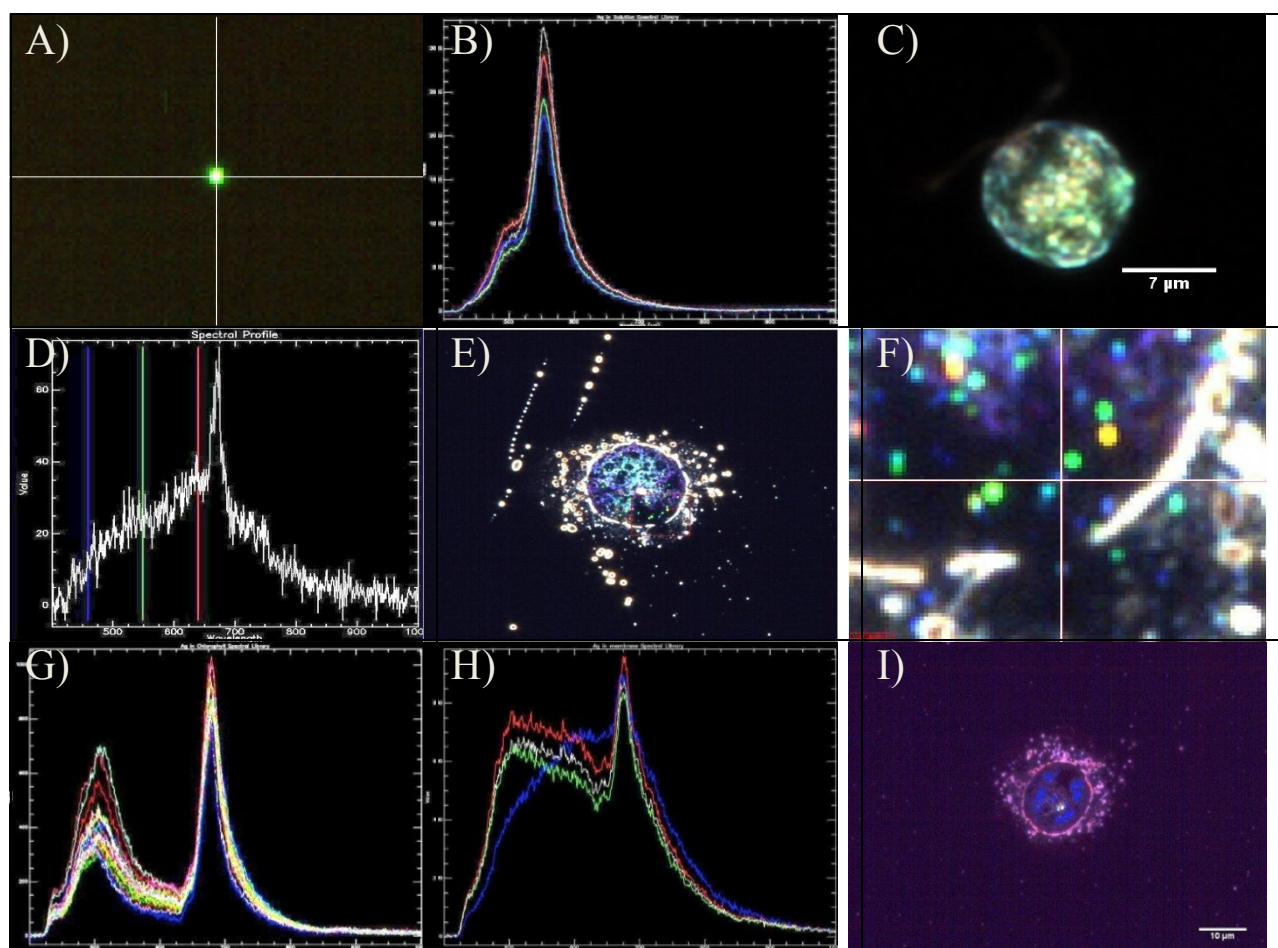


Figure 4. Darkfield microscopy of an alga cell (*C. reinhardtii*) and Ag nanoparticles. A) Image generated by nAg alone; B) Spectra generated by the nAg; C) Algal cell that was not exposed to nAg; D) Spectrum generated by the control algal cell; E) Algal cell following exposure to nAg; F) Zoomed image of the cell in E, showing the nanoparticulate deposits of Ag; G) Spectra obtained when focused on nanoparticulate deposits on the inside of the

algal cells; H) Spectra obtained when focused on the nanoparticulate deposits found on the surface of the cells; I) Hyperspectral microscopy of an algal cell (*C. reinhardtii*) that has been exposed to $20 \mu\text{g L}^{-1}$ of Ag^+ . Blue dots represent nanoscale accumulations of silver that were detected by using the same hyperspectral library that was generated by algae exposed to the nAg.

Environmental implications

Results from biouptake, genomic and microscopic analyses strongly indicated that only Ag^+ was crossing the algal membrane. Nonetheless, nAg was not innocuous- in its presence, bioaccumulation increased significantly and CTR2 was upregulated significantly, above what could be predicted on the basis of Ag^+ concentrations in the bulk solution. Nanoscale deposits of Ag, with distinct hyperspectral spectra, were observed on the cell surface and inside the cells. While it was impossible to distinguish microscopically between cells exposed to Ag^+ and nAg, distinct spectral signatures were observed for the bulk nAg, surface-bound Ag and internalized Ag. Indeed, a strong blue shift was observed for both the surface-bound and internalized nanoscale Ag. Based upon this data, it would appear that the diffusion of nAg to the cell surface was sufficient to increase Ag biouptake fluxes over the Cu(I) transporter. Ag biouptake is thought to be diffusion limited for *C. reinhardtii*²⁶, even for exposures to Ag^+ . This implies that the Ag biouptake flux would depend on both the diffusion coefficient of the nanoparticles (mass transport of the smaller nanoparticles being greater) and upon the rate of particle oxidation/dissolution/decomplexation (recall that in the above experiments, nAg was coated with polyacrylate). The physicochemical explanation of increased ionic Ag at the biological interface is consistent with recent toxicological observations for both bacteria²⁹ and algae¹⁰ and could theoretically apply for larger organisms where mass transport is generally less efficient. Although Ag is one of the few metals where a diffusion limitation has been observed for

planktonic organisms; in the environment, the vast majority of microorganisms are found in biofilms, soils or sediments, where mass transport is much more likely to be rate-limiting^{15,30} and thus the mechanism observed above, more generalized.

Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC strategic grant) and the *Fonds de recherche du Québec- Nature et Technologies*. Some of the nAg used in this study were donated by Vive Nano. We greatly appreciate the technical assistance of Samia Dababi, Leosveys Alessandra Diaz Lozada and Jean-Philippe Masse. Darkfield microscopy was performed in collaboration with Leslie Krauss and the personnel from CytoViva Inc.

References

- 1- Woodrow Wilson International Center for Scholars. A nanotechnology consumer products inventory. www.nanotechproject.org/consumerproducts.
- 2- Domingos, R.F.; Baalousha, M.A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M.M.; Tufenkji, N.; Lead, J.R.; Leppard, G.G.; Wilkinson, K.J. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 7277-7284.
- 3- Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, 311, 622-627.
- 4- Hadioui, M.; Leclerc, S.; Wilkinson, K.J. Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* **2013**, 105, 15-19.

- 5- Liu, J.; Hurt, R.H. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2169-2175.
- 6- Ratte, H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 89-108.
- 7- Lee, D-Y.; Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **2005**, *75*, 127-135.
- 8- Hiriart-Baer, V.P.; Fortin, C.; Lee, D-Y.; Campbell, P.G.C. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulfate. *Aquatic Toxicol.* **2006**, *78*, 136-148.
- 9- Reinsch, BC; Levard, C; Li, Z; Ma, R; Wise, A; Gregory, KB; Brown, GE; Lowry, GV. Sulfidation of Silver Nanoparticles Decreases *Escherichia coli* Growth Inhibition. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 6992-7000.
- 10- Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8959-8964.
- 11- Miao, A-J.; Schwehr, K.A; Xu, C.; Zhang, S-J.; Luo, Z.; Quigg, A.; Santschi, P.H. The algal toxicity of silver nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 3034-3041.
- 12- Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346-2353.

- 13- Choi, O.; Hu, Z. Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 4583-4588.
- 14- Lee, D-Y.; Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23, 1012-1018.
- 15- Wilkinson, K.J. and J. Buffle. Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modeling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In: *Physicochemical Kinetics and Transport at Chemical - Biological Interphases*, H.P. van Leeuwen, W. Koester (eds.), Wiley, Chichester. **2004**, Ch. 10, 445-533.
- 16- Slaveykova, V.I. and K.J. Wilkinson. 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.* 2, 9-24.
- 17- Benoit, R.; Wilkinson, K.J.; Sauvé, S. Chemical speciation and partitioning of silver nanoparticles in soils. *Chemistry Central J.* **2013**, 7, 75.
- 18- NIH, Image Processing and Analysis in Java Website; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- 19- Hutner, S.H.; Provasoli, L.; Schatz, A.; Haskins, C.P. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc.* **1950**, 94, 152-170.
- 20- Gorman, D.S.; Levin, R.P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthesis electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 54, 1665-1669.
- 21- Hassler, C.S.; Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J. 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods.* **2004**, 2, 237-247.

22-Panomics, QuantiGene®2.0 Reagent System User Manual;

http://www.panomics.com/downloads/UM13074_QG2Manual_RevB_080102.pdf.

23- Solioz, M.; Odermatt, A. Copper and silver Transport by CopB-ATPases in the Membrane Vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 9217-9221.

24- Page, M.D.; Kropat, J.; Hamel, P.P.; Merchant, S.S. Two *Chlamydomonas* CTR Copper Transporters with a Novel Cyst-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. *Plant Cell* **2009**, 21, 928-943.

25- Howe, G; Merchant, S. Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **1992**, 98, 127-136.

26- Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19, 2769-2778.

27- Adams, NWH; Kramer, JR. Determination of silver speciation in wastewater and receiving waters by competitive ligand equilibration/solvent extraction. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18, 2674-2680.

28- Barwal, I.; Ranjan, P. Kateriya, S.; Chandra Yadav, S. Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *Nanotech.* **2011**, 9, 56.

29- Bondarenko O; Ivask A; Käkinen A; Kurvet I; Kahru A. Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* **2013**, 8: e64060.

30- Otavio Peulen, T; Wilkinson KJ. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45: 3367-3373.

2.6 Supporting information

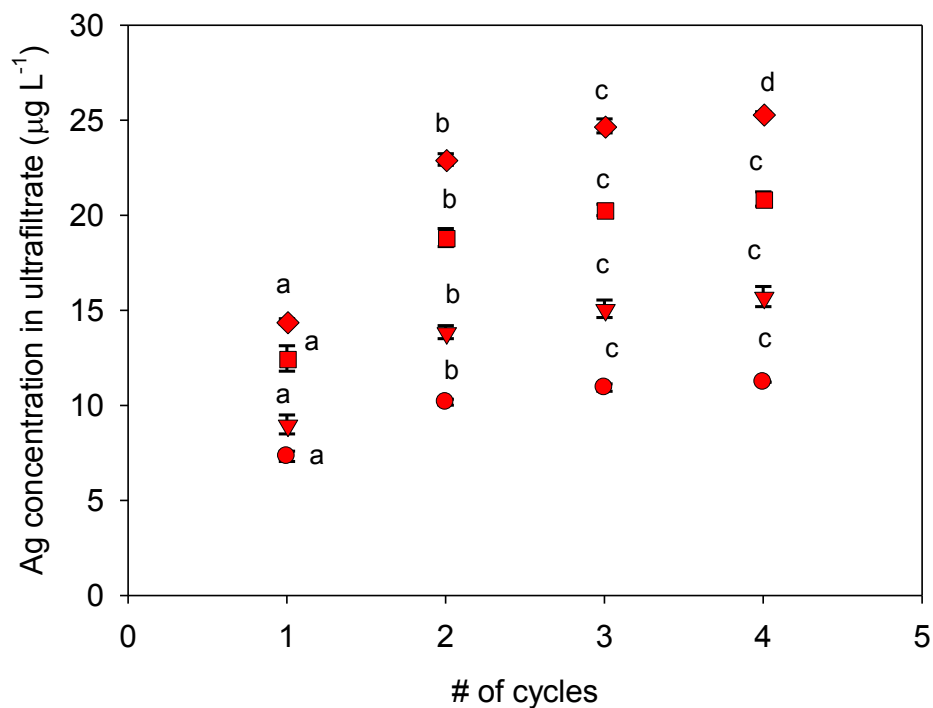


Figure S1 The concentration of dissolved silver (ionic silver) in the filtrate as a function of the number of ultrafiltration cycles. The different symbols (circle; triangle; square; diamond) represent- in increasing order –solutions of 13 $\mu\text{g L}^{-1}$, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 38 $\mu\text{g L}^{-1}$ of nAg, respectively. The error bars represent the standard deviations for technical triplicates. Letters refer to significant differences identified by performing a One Way ANOVA followed by a Holm-Sidak ($p < 0.05$).

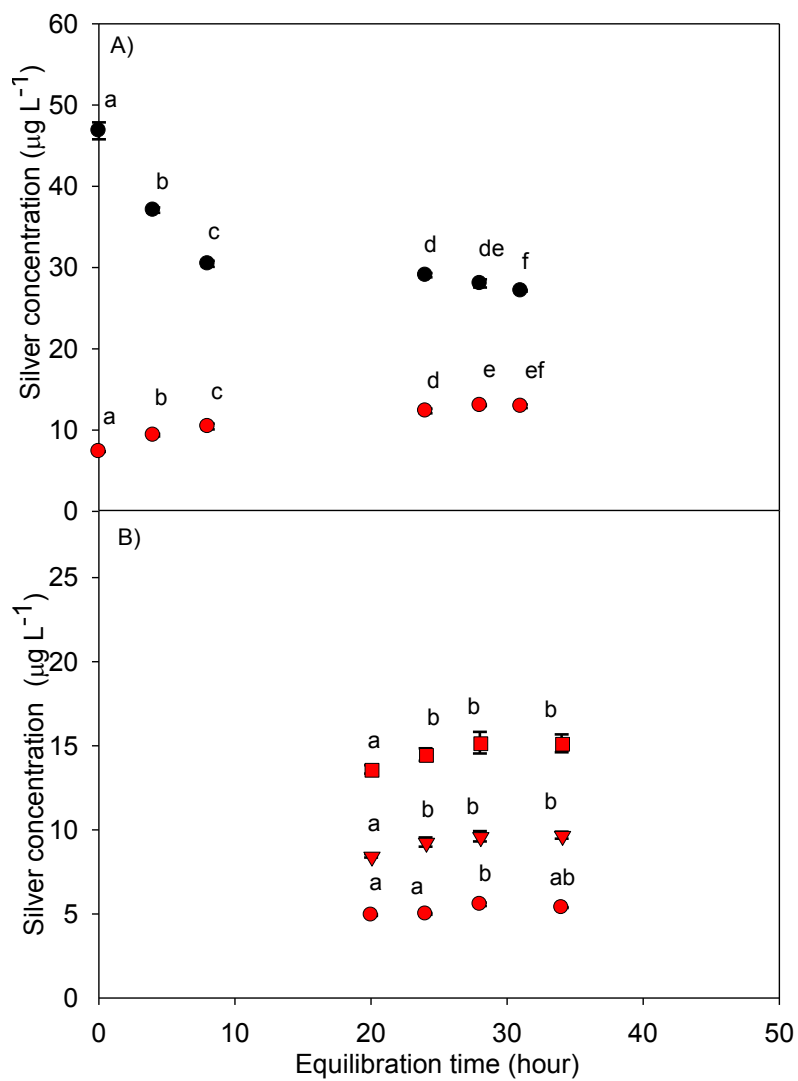


Figure S2 A) The concentration of total silver in a solution of nAg as a function of pre-equilibration time. Black symbols represent the concentrations of total silver, whereas the red symbols represent the concentrations of ionic silver. Error bars represent the standard deviations for technical triplicates. B) Measured concentrations of ionic silver in 3 different nAg solutions (i.e. 11 $\mu\text{g L}^{-1}$, 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 33 $\mu\text{g L}^{-1}$) as a function of the pre-equilibration time. The symbols correspond to the different solutions of nAg. Error bars represent the standard deviations obtained for technical triplicates. For the sake of clarity, total silver concentrations are not presented in B; however, in each case, there were no statistical differences in the measured total silver for the equilibration times: 24, 28 and 34 hours. Letters refer to significant differences identified by performing a One Way ANOVA followed by a Holm-Sidak ($p < 0.05$)

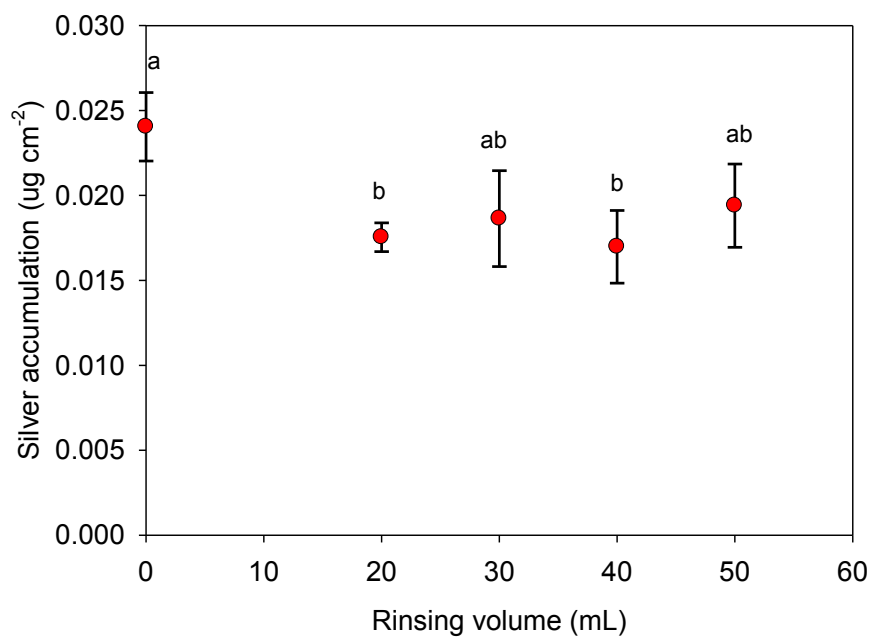


Figure S3 Bioaccumulated silver as a function of the rinsing volume of a solution of 5×10^{-3} M sodium thiosulfate. *C. reinhardtii* was first exposed to $80 \mu\text{g L}^{-1}$ of a solution of ionic silver over 2 hours. Error bars represent the standard deviations for technical triplicates. Letters refer to significant differences identified by performing a One Way ANOVA followed by a Holm-Sidak ($p < 0.05$).

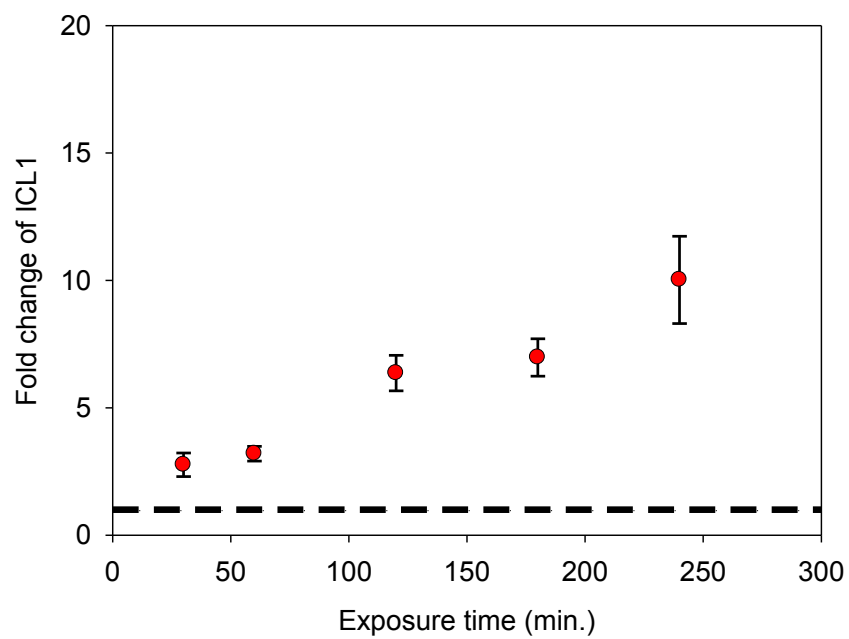


Figure S4 Time-dependant relative fold change of ICL1 following exposure to a solution of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Ag^+ . The black dashed line represents the expression of the control cells, which were exposed to no Ag. Error bars represent the standard deviations for technical triplicates.

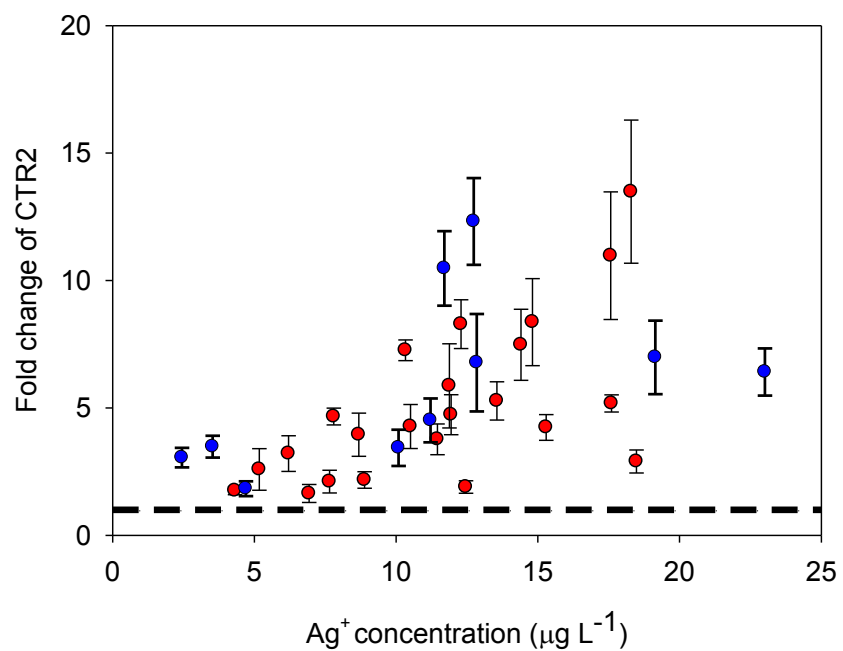


Figure S5 Relative fold change of CTR2 following exposures to nAg (red circles) or Ag⁺ (blue circles). The black dashed line corresponds to the expression of of the control cells, which were exposed to no Ag. Error bars represent the standard deviations for technical triplicates.

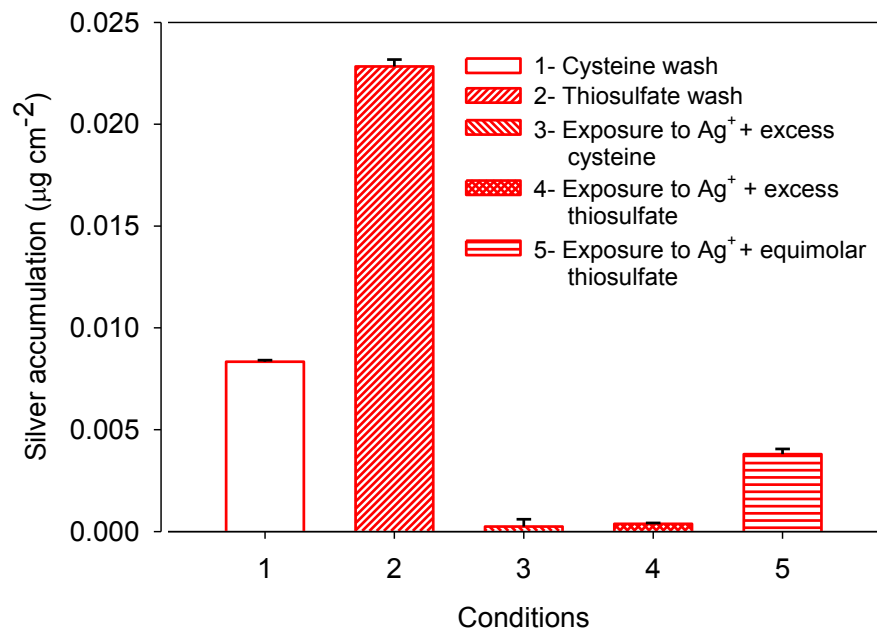


Figure S6 Ag biouptake following exposures to solutions of $17 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag. Algae were rinsed either with a 5×10^{-3} M sodium thiosulfate or 5×10^{-3} M cysteine. Conditions were selected so that algae would be exposed to either Ag^+ or predominantly Ag complexes. **Condition 1**- Ag^+ exposure, cysteine rinse; **condition 2**- Ag^+ exposure, thiosulfate rinse; **condition 3**- exposure to Ag complexes (Ag plus 100 x excess cysteine); **condition 4**- exposure to Ag complexes (Ag plus 100 x excess thiosulfate); **condition 5**- exposure to Ag complexes (Ag plus equimolar thiosulfate). Error bars represent the standard deviation for technical triplicates.

3. Résultats supplémentaires

3.1 Détermination de la retenue passive de nAg et de Ag⁺ sur les filtres.

3.1.1 Méthodes expérimentales

Culture des algues

Se référer à la section 2.3.2 du Chapitre 2.

Préparation des solutions d'argent

Se référer à la section 2.3.3 du Chapitre 2.

Test de retenue d'argent sur les filtres

Le premier test (conditions 1 et 2) consistait à évaluer la retenue passive de 30 mL de solution de soit Ag⁺ ou soit nAg filtrée sur une série de 2 filtres superposés et subséquemment rincés (rinçage avec 20 mL d'une solution de 5×10^{-3} M en thiosulfate de sodium). Le deuxième test (condition 3) consistait à évaluer la retenue passive de 30 mL de solution de soit Ag⁺ ou soit nAg mise en présence d'algues (durant 2 heures) et filtrée sur 2 filtres superposés subséquemment rincés (rinçage avec 20 mL d'une solution de 5×10^{-3} M en thiosulfate de sodium). Le troisième test (condition 4) consistait à centrifuger 30 mL d'une solution de soit Ag⁺ ou soit nAg en présence d'algues (2500xg; 10 min), puis d'en filtrer le surnageant à travers un simple filtre subséquemment rincé (rinçage avec une solution de 5×10^{-3} M en thiosulfate de sodium). Finalement, tous les filtres étaient récupérés dans des tubes de 15 mL et digérés par chauffage à 85 °C en présence de 200 µL d'acide nitrique ultra-pur. Suite à la

digestion, les volumes étaient complétés à 10 mL et le contenu en argent des tubes était analysé par ICP-MS (Nexion 300x, Perkin Elmer).

3.1.2 Résultats et discussion

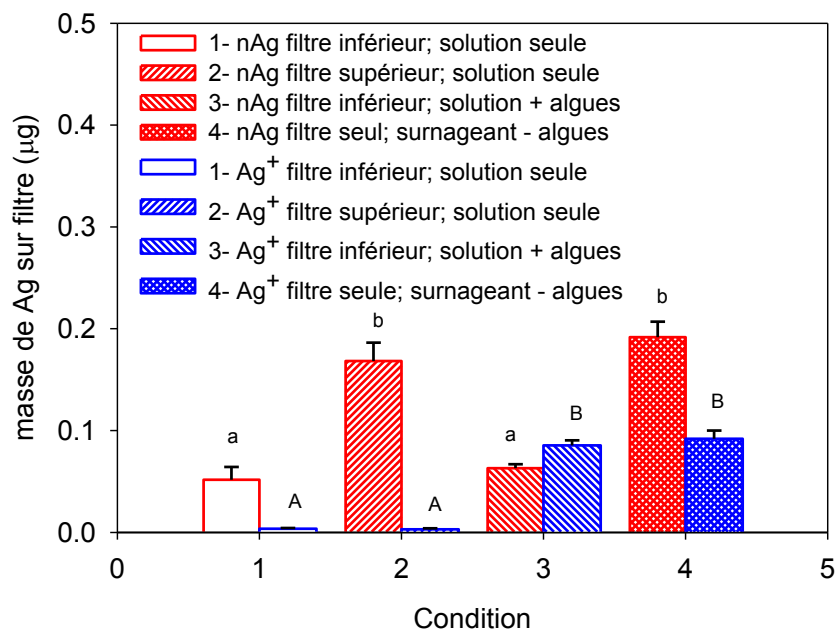


Figure 3.1 Évaluation de la retenue passive de Ag⁺ et de nAg sur filtres en absence ou en présence d’algues. Les barres d’erreurs représentent les écart-types de triplicatas techniques. Les lettres sont attribuées (majuscules ou minuscules) par un test Holm-Sidak ($p < 0,001$), suite à un test d’analyse de variance positif (ANOVA; $p < 0,05$).

Afin de comparer statistiquement les résultats des différentes conditions testées, l’échantillonnage de chacune d’entre elles était répété trois fois. Étant donnée la très grande précision de l’appareil de mesure qui était utilisé, soit une précision inférieure à 1% de la mesure, l’erreur due à l’échantillonnage était beaucoup plus grande que l’erreur due à la lecture analytique, et, ainsi, l’erreur statistique globale était très majoritairement déterminée par l’erreur d’échantillonnage. Le terme “triplicatas techniques” a été utilisé afin d’aider à

Résultats supplémentaires

distinguer entre les répliques d'échantillonnage et les répliques effectués sur différentes cultures biologiques, soient les répliques biologiques. En effet, les cultures algales représentent en soi une source de variabilité expérimentale qui, dans certains cas de limitations expérimentales- tels que discutés dans la section 3.3.2-, se doit d'être évaluée. Par contre, dans le cas présent l'évaluation de la variabilité biologique n'était pas pertinente, étant donné qu'aucun paramètre biologique n'était évalué.

Dans le cas des nAg, le premier test (conditions 1 et 2) a montré que les nanoparticules d'argent étaient beaucoup plus retenues par le filtre supérieur que par le filtre inférieur; conséquemment, la quantité d'argent retenue par le filtre inférieur, suite à la filtration d'une solution de nAg en présence d'algues, ne devait pas être un bon indicateur de la retenue passive réelle. Pour confirmer cela, la retenue d'argent du surnageant d'une solution d'algues par un simple filtre (condition 4) a été comparée à la retenue d'argent d'une solution d'algues par le filtre inférieur d'une série de deux filtres superposés (condition 3). Effectivement, une différence significative de retenue d'argent de près de trois fois supérieure a été constatée pour la condition 4 par rapport à la condition 3. Donc, dans le cas des nAg, la meilleure évaluation de la retenue passive d'argent suite à une filtration d'une solution d'algues était de filtrer le surnageant de cette solution à travers un simple filtre.

Pour l'évaluation de la retenue passive d'argent lors d'une filtration d'une solution d'algues exposée à Ag^+ , les mêmes conditions que précédemment ont été testées. En filtrant une simple solution de Ag^+ à travers une série de deux filtres superposés (conditions 1 et 2), il a été déterminé que les filtres inférieur et supérieur renaient la même quantité d'argent. Il était donc plausible que la retenue d'argent dans le filtre inférieur puisse être une évaluation

juste de la retenue passive réelle lors d'une filtration d'une solution d'algues exposées à Ag^+ . Effectivement, la retenue d'argent du surnageant d'une solution d'algues par un filtre simple était statistiquement la même que la retenue d'argent d'une solution d'algues par le filtre inférieur d'une série de deux filtres superposés. Donc, dans le cas de Ag^+ , la façon la plus simple de déterminer la retenue passive d'argent lors d'une filtration d'une solution d'algues était de filtrer cette solution à travers une série de 2 filtres superposés.

3.2 Détermination de l'effet d' Ag^+ sur l'abondance relative de CTR2 et sur l'accumulation de cuivre par *C. reinhardtii*

3.2.1 Méthodes expérimentales

Culture des algues

Se référer à la section 2.3.2 du Chapitre 2.

Préparation des solutions de cuivre et d'argent

Se référer à la section 2.3.3 du Chapitre 2. La solution concentrée en cuivre métallique (1000 mg L^{-1} ; 5% v/v d'acide nitrique) provenait de Inorganic Ventures.

Expérience de bioaccumulation

Se référer à section 2.3.5 du Chapitre 2. La concentration algale était de $1 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. Le temps d'exposition des algues aux solutions était de 2 heures. Des triplicatas de 30 mL de chaque solution étaient filtrés à travers des séries de 2 filtres superposés. Les filtres étaient rincés avec une solution de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en thiosulfate de sodium et de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en EDTA.

Analyse transcriptomique

Se référer à la section 2.3.6 du Chapitre 2.

3.2.2 Résultats et discussion

Telles que présentées dans la partie `` Marqueurs biologiques et choix des ARNm `` de la section 1.2.3 du Chapitre 1, des travaux antérieurs avaient montré un lien entre l'argent et le cuivre quant à leurs affinités pour des sites de transports biologiques. Fortin et al. (2000) ont montré qu'une diminution de l'internalisation d'ions Ag^+ par la présence concomitante d'ions Cu^{2+} chez *C. reinhardtii* suggérait fortement que les deux ions partageaient un site de transport commun. Les découvertes par Page et al. (2009) de l'existence de protéines transmembranaires spécifiques au transport du cuivre chez *C. reinhardtii*, soient les protéines CTR1 et CTR2, n'avaient jamais mené à l'étude de la capacité des ions Ag^+ à influencer leur régulation. Une expérience a été menée où *C. reinhardtii* était exposée à plusieurs solutions de concentrations croissantes en Cu^{2+} et à une solution de concentrations molaires égales en Cu^{2+} et en Ag^+ . Les buts de cette expérience étaient de déterminer l'influence de la présence concomitante d'ions Ag^+ sur la bioaccumulation d'ions Cu^{2+} et sur l'expression de l'ARNm de CTR2.

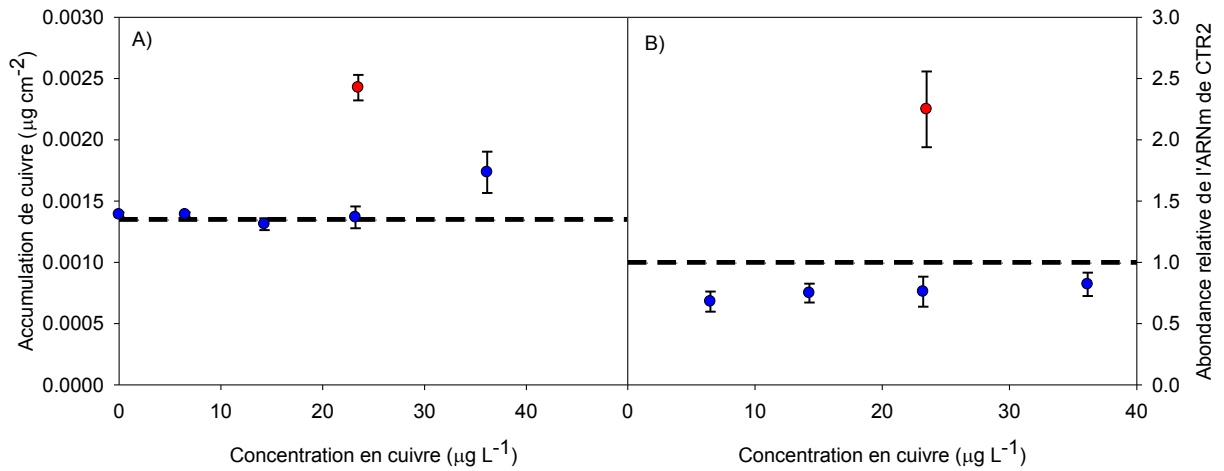


Figure 3.2 A)- L'accumulation de cuivre par *C. reinhardtii* en fonction de la concentration de cuivre en solution (cercles bleus) ou d'un mélange argent-cuivre (ratio molaire de 1:1; cercle rouge); les barres d'erreurs représentent des écart-types de triplicatas techniques. Les tiretés noirs représentent la concentration en cuivre de l'algue non-exposée au cuivre ou au mélange argent-cuivre. B)- L'abondance relative de l'ARNm de CTR 2 en fonction de la concentration de cuivre (cercles bleus) ou d'un mélange argent-cuivre (ratio molaire de 1:1; cercle rouge); les barres d'erreurs représentent des écart-types de triplicatas techniques. Les tiretés noirs représentent l'abondance relative de l'ARNm de CTR2 pour l'algue non-exposée au cuivre ou au mélange argent-cuivre.

Tel que discuté dans la section 3.1.2, l'erreur d'échantillonnage était aussi beaucoup plus élevée que l'erreur due à la mesure analytique- instrument ICP-MS- pour les données de la figure 3.2 A). Encore une fois, le terme "triplicatas techniques" a été utilisé afin d'aider à distinguer entre les répliques d'échantillonnage et les répliques biologiques; toutefois, il n'était pas pertinent de procéder à l'évaluation de la variabilité biologique puisque le but de l'expérience n'était que d'évaluer si l'argent aurait, oui ou non, un effet quelconque sur la bioaccumulation du cuivre. Quant aux erreurs des données présentées en figure 3.2 B), celles-ci représentent également des triplicatas techniques; l'erreur expérimentale englobe les erreurs d'échantillonnage et analytique.

Résultats supplémentaires

Dans la figure 3.2 A), il est frappant de constater que la présence concomitante d'ions Ag^+ à celle des ions Cu^{2+} doublait pratiquement l'accumulation de cuivre chez *C. reinhardtii*. Pour les solutions contenant uniquement des ions Cu^{2+} , aucune bioaccumulation de cuivre chez *C. reinhardtii*- par rapport au contrôle- n'était observée qu'avant la concentration la plus élevée. Hill et al. (1996) avaient aussi observé que l'algue *C. reinhardtii* n'accumulait plus de cuivre au-delà d'une certaine concentration intracellulaire. Cependant, aucune investigation n'avait pas été menée plus loin à savoir pourquoi l'accumulation de cuivre était stimulée à la plus forte concentration en ions Cu^{2+} . En effet, l'intérêt principal était que l'argent eut stimulé l'accumulation de cuivre par *C. reinhardtii*. Selon les découvertes de Fortin et al. (2000) mentionnées plus haut, il paraissait absurde que la présence concomitante d'ions Ag^+ eut pu stimuler l'accumulation de cuivre chez *C. reinhardtii*, alors que la présence d'ions Cu^{2+} avaient eu l'effet contraire sur l'accumulation d'argent. Toutefois, la figure 3.2 B) montre que l'abondance de l'ARNm de CTR2 était fortement augmentée en présence d'ions Ag^+ par rapport en l'absence d'ions Ag^+ . Il apparaissait donc que la stimulation d'accumulation de cuivre par la présence concomitante d'ions Ag^+ eut pu être la conséquence d'une cascade d'événements complexes entre la transcription d'ADN en ARNm et la traduction d'ARNm en transporteur. Finalement, cette piste n'a jamais été explorée davantage et a été supplantée par l'étude de l'ARNm de CTR2 comme marqueur biologique à l'accumulation d'argent chez *C. reinhardtii*.

3.3 Effet de Ag^+ sur l'abondance relative des ARNm de ICL1 et de CTR2

3.3.1 Méthodes expérimentales

Culture des algues

Se référer à section 2.3.2 du Chapitre 2.

Préparation des solutions d'argent

Se référer à la section 2.3.3 du Chapitre 2.

Expérience de bioaccumulation

Se référer à la section 2.3.5 du Chapitre 2. La concentration algale utilisée était de $1 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. Le temps d'exposition des algues aux solutions d'argent était de deux heures. Des triplicatas de 30 mL des solutions d'algues avec Ag^+ étaient filtrés à travers des séries de 2 filtres superposés; les filtres étaient subséquemment rincés avec 20 mL d'une solution de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en thiosulfate de sodium. Des triplicatas de 30 mL des solutions d'algues avec nAg étaient filtrés à travers des filtres simples; les filtres étaient subséquemment rincés avec 20 mL d'une solution de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en thiosulfate de sodium.

Analyse transcriptomique

Se référer à la section 2.3.6 du Chapitre 2. Les ARNm d'intérêt étaient ceux de ICL1 et CTR2.

3.3.2 Résultats et discussion

Les résultats présentés à la figure 3.3 découlent des mêmes expériences de bioaccumulation que les résultats présentés dans les figures 2.2 A) et B) du Chapitre 2. Également, la figure 3.3 B) est présentée dans la section 2.6 (figure S5) du Chapitre 2. Après avoir comparé quantitativement la bioaccumulation d'argent chez *C. reinhardtii* suite à des expositions à des solutions soit de Ag^+ ou soit de nAg, il était clair que les nAg participaient à la bioaccumulation d'argent (figure 2.2 B) dans la section 2.4.2 du chapitre 2). Des mesures d'abondance des ARNm de ICL1 et CTR2 des cellules algales avaient été faites suite aux expositions à Ag^+ et à nAg, afin d'évaluer les mécanismes de bioaccumulation d'argent des nAg. Étant données les limites expérimentales dues à la logistique, les expériences étaient menées sur des journées séparées, une espèce d'argent à la fois et une culture algale à la fois. Il était alors très pertinent d'évaluer la variabilité expérimentale en faisant des répliques biologiques, soient plusieurs expériences sur plusieurs cultures algales. Les erreurs des données présentées dans les figures 3.3 A) et B) représentent des triplicatas techniques qui englobent les erreurs d'échantillonnage et analytique.

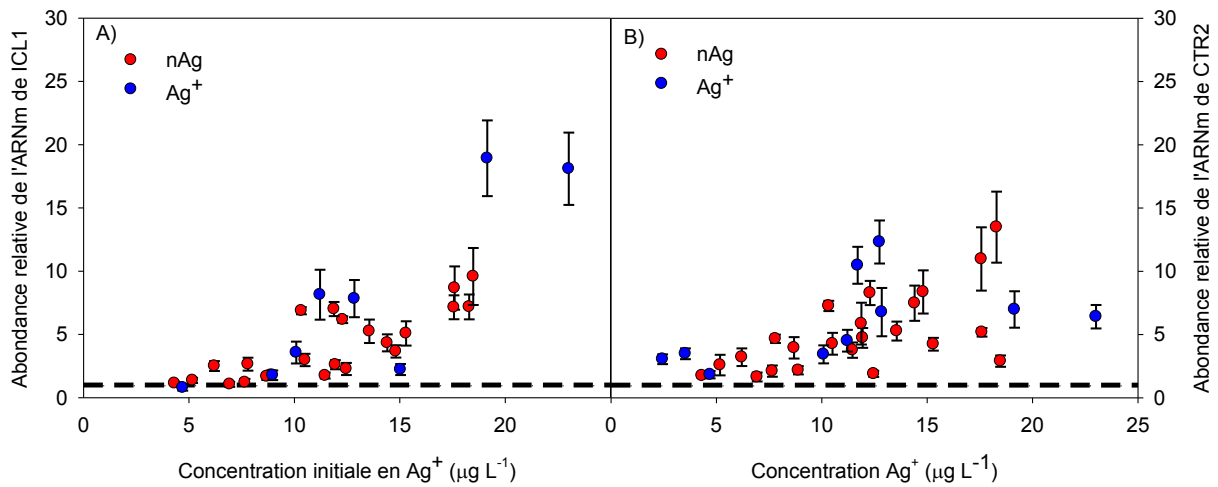


Figure 3.3 A)- L'abondance relative de l'ARNm de ICL1 en fonction de la concentration en Ag^+ d'une solution soit de nAg (5 répliques biologiques) ou soit de Ag^+ (3 répliques biologiques). B)- L'abondance relative de l'ARNm de CTR2 pour les mêmes solutions qu'en A). Les barres d'erreurs représentent les écart-types de triplicatas techniques. Les tiretés noirs représentent l'abondance d'ARNm d'une solution contrôle non-exposée à Ag^+ , ni à nAg.

Une augmentation non-linéaire de l'abondance des l'ARNm de ICL1 et de CTR2 en fonction de la concentration en Ag^+ était observée pour les expositions soit à nAg ou soit à Ag^+ . Une évaluation visuelle des résultats suggérait que la concentration en Ag^+ d'une solution de nAg pouvait en expliquer la réponse transcriptomique. Il apparaissait donc que la bioaccumulation d'argent supplémentaire due aux nAg comme telles n'impliquait pas leur oxydation partielle en ions Ag^+ . Une expérience où une même culture algale était exposée à des solutions de Ag^+ et de nAg (figure 3.4; figure 2.3 du Chapitre 2) a été menée afin d'investiguer la possibilité de variabilité biologique.

3.4 Investigation sur les mécanismes de bioaccumulation de nAg par *C. reinhardtii*

3.4.1 Méthodes expérimentales

Culture des algues

Se référer à la section 2.3.2 du Chapitre 2.

Préparation des solutions d'argent

Se référer à la section 2.3.3 du Chapitre 2.

Expérience de bioaccumulation

Se référer à la section 2.3.5 de l'article. La concentration algale utilisée était de $0,2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. Les temps d'exposition étaient variables. Un excès de 100 fois en L-Cystéine a été ajouté à l'une des 2 solutions de nAg; une solution de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ en L-Cystéine a été préparée sans ajout d'argent. Des duplicatas de 30 mL pour les solutions d'algues avec Ag^+ étaient filtrés à travers des séries de 2 filtres superposés; les filtres étaient rincés subséquentement avec 20 mL d'une solution de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en L-Cystéine. Des duplicatas de 30 mL pour les solutions d'algues avec nAg étaient filtrés à travers des filtres simples; les filtres étaient rincés subséquentement avec 20 mL d'une solution de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en L-Cystéine.

Analyse transcriptomique

Se référer à la section 2.3.6 de l'article. Les ARNm d'intérêt étaient de CTR2 et de ICL1.

3.4.2 Résultats et discussion

Les résultats présentés dans les figures 3.4 A) et B) découlent de la même expérience de bioaccumulation que les résultats présentés dans les figures 2.3 A) et B) de l'article. Les résultats présentés dans l'article ont été tronqués afin de respecter la limite imposée par le journal quant au nombre de mots prescrits. Quelques observations supplémentaires très intéressantes sont montrées.

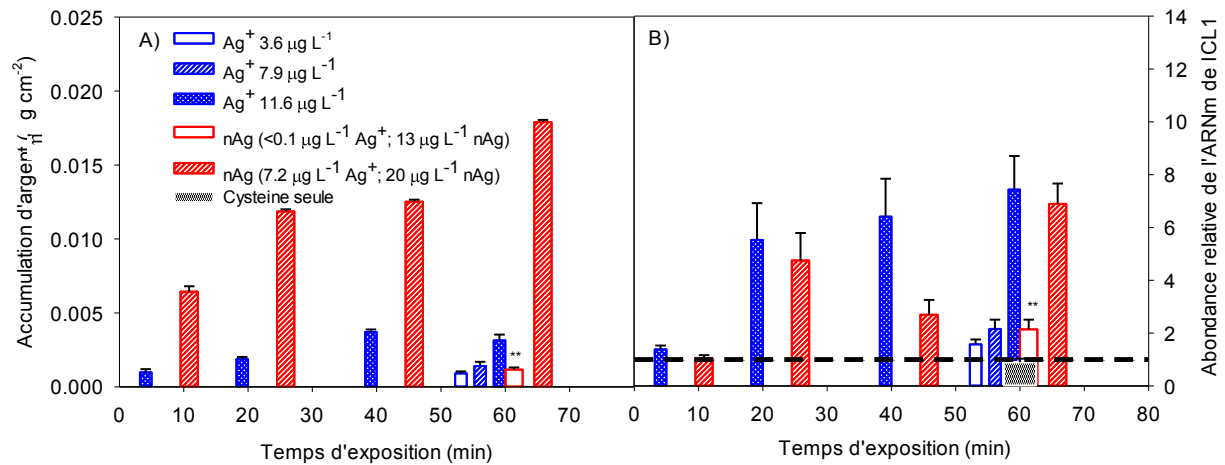


Figure 3.4 A) La bioaccumulation d'argent par *C. reinhardtii* en fonction du temps d'exposition à des solutions soit d' Ag^+ , soit de nAg ou soit de L-Cystéine; les barres d'erreurs représentent des écarts-types de triplicatas techniques. B) L'abondance relative de l'ARNm de ICL1 en fonction du temps d'exposition aux mêmes solutions qu'en A); Les barres d'erreurs représentent des écart-types de triplicatas techniques. Les tiretés noirs représentent une solution d'algues non-exposée à Ag^+ , à nAg ni à L-Cystéine. Le symbole « ** » signifie qu'un excès de 100 x (ratio molaire L-Cystéine / Ag^+) en L-Cystéine était ajouté.

La figure 3.4 A) montre que la bioaccumulation d'argent pour nAg était beaucoup plus élevée que ce qui était prédit par la bioaccumulation due seulement à sa concentration en Ag^+ (par comparaison avec la solution de $7.9\ \mu g\ L^{-1}$ d' Ag^+ à 60 min d'exposition) de départ. Mais

Résultats supplémentaires

également, la bioaccumulation d'argent pour nAg était en tout temps supérieure à la bioaccumulation d'argent pour une solution en Ag^+ ($11.6 \mu\text{g L}^{-1}$) de concentration supérieure. Tel que discuté dans l'article, la bioaccumulation d'argent pour nAg (en présence d'un excès en cystéine) était significative. En portant attention à la Figure 3.4 B), il est possible de constater, pour Ag^+ ($11.6 \mu\text{g L}^{-1}$), que l'abondance de l'ARNm de ICL1 augmentait très significativement entre 5 min et 20 min d'exposition et était stable (pas d'augmentation significative) jusqu'à 60 min. Par contre, pour nAg, l'abondance relative de l'ARNm de ICL1 augmentait de façon très significative entre 5 min et 20 min d'exposition, puis diminuait entre 20 min et 40 min d'exposition et augmentait de nouveau entre 40 min et 60 min d'exposition. Y aurait-il un lien entre la diminution très rapide (20 min) de l'abondance de l'ARNm de ICL1 et l'influx d'argent quasi nul entre 20 min et 40 min d'exposition? Malgré les grandes réserves qui sont de mises, étant donné que cette observation n'ait été faite que dans le cadre d'une seule expérience regroupant quelques données, il n'empêche qu'il serait intéressant de vérifier cette observation pour confirmer- ou infirmer- si cette inhibition momentanée du flux de bioaccumulation d'argent était un événement isolé ou répétable et, dans le dernier cas, la résultante de la présence de nAg.

Finalement, après 60 min d'exposition, l'abondance de l'ARNm de ICL1 était beaucoup plus élevée pour nAg comparativement à ce qui était attendu de la contribution de Ag^+ ($7.9 \mu\text{g L}^{-1}$) ce qui suggère fortement qu'une partie de la bioaccumulation d'argent pour nAg provenait de leur oxydation au contact de *C. reinhardtii*. La stimulation des ARNm de ICL1 et CTR2 (tel que discuté dans la section 2.4 du Chapitre 2) suite à l'exposition à la solution nAg-Cystéine suggère également qu'une partie de la bioaccumulation d'argent résultait de l'oxydation des nAg.

4. Conclusion

Dans cette étude, il a été montré que des nAg de taille moyenne de 4 nm (enrobage de polyacrylate) contribuaient à la bioaccumulation d'Ag par *C. reinhardtii*. L'un de leurs mécanismes de bioaccumulation impliquait un processus d'oxydation des nAg en présence de l'algue. Même en présence d'un excès d'un ligand très fort (L-cystéine; $\log K = 11,5$) dans une solution de nAg, les résultats suggéraient tout de même une oxydation des nAg. Dans une perspective d'analyse des risques toxicologiques environnementaux, ces résultats suggèrent que les nAg pourraient exercer des effets toxiques aigus au contact d'un organisme aquatique- d'un organisme aquatique unicellulaire à tout le moins. Normalement, les concentrations en ions Ag^+ sont considérées beaucoup trop faibles en milieux d'eaux douces pour être des sources de toxicité aigüe. Par contre, les résultats mis en lumière dans cette étude suggèrent qu'une attention particulière soit portée quant au destin des nAg dans les milieux d'eaux douces. Des études de bioaccumulation sur d'autres algues unicellulaires donneraient une bonne indication à savoir si ce phénomène est limité à *C. reinhardtii* ou répandu à plusieurs autres microorganismes. Il serait aussi très intéressant de vérifier l'influence de la taille des nAg ou de leur enrobage quant au phénomène qui a été observé.

Dans un autre ordre d'idées, il a été démontré pour la première fois que l'ion Ag^+ pouvait affecter positivement la bioaccumulation de Cu^{2+} , mais également qu'il pouvait affecter l'expression d'un gène (augmentation de la transcription d'ADN en ARNm) relié au transport du cuivre. Le cuivre étant un élément essentiel aux cellules, cette découverte est très intéressante en ce sens qu'elle pourrait peut-être aider à en comprendre davantage les mécanismes de régulation cellulaires.

Conclusion

Finalement, bien que la bioaccumulation totale d'argent par *C. reinhardtii* suite à des expositions à des nAg ait été bien quantifiée, un seul des mécanismes sous-tendant a pu être confirmé, soit l'oxydation des nAg. Les deux autres mécanismes exposés en introduction, soient l'adsorption cellulaire passive et l'internalisation cellulaire n'ont pu être ni confirmés, ni infirmés.

5. Bibliographie

Abboud, P.; Wilkinson, K.J. Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*. **2013**, 179, 33-38.

Adams, NWH; Kramer, JR. Determination of silver speciation in wastewater and receiving waters by competitive ligand equilibration/solvent extraction. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18, 2674-2680.

Aitken, R.J.; Chaudry, M.Q.; Boxall, A.B.A.; Hull, M. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine*. **2006**, 56, 300-306.

Andren AW, Bober TW, editors. Silver in the Environment: Transport, Fate, and Effects. Pensacola, FL, USA: *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*. **2002**, P. 100-110.

Aruoja, V.; Dubourguier, H-C.; Kasemets, K.; Kahru, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*. **2009**, 407, 1461-1468.

Bakker, E.; Pretsch, E. Potentiometric sensor for trace-metals analysis, *Trends in Analytical Chemistry*. **2005**. 24, 199-207.

Barwal, I.; Ranjan, P. Kateriya, S.; Chandra Yadav, S. Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *Nanotech*. **2011**, 9, 56.

Bibliographie

Bedhomme, M.; Zaffagnini, M.; Marchand, C.H.; Gao, X.H.; Moslonka-Lefebvre, M.; Michelet, L.; Decottignies, P.; Lemaire, S.D. Regulation by glutathionylation of Isocitrate Lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. **2009**, 284, 36282-36291.

Benoit, R.; Wilkinson, K.J.; Sauvé, S. Chemical speciation and partitioning of silver nanoparticles in soils. *Chemistry Central J.* **2013**, 7, 75.

Bondarenko O; Ivask A; Käkinen A; Kurvet I; Kahru A. Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* **2013**, 8: e64060.

Campbell, P.G.C.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V.P.; Vigneault, B. Review- Metal bioavailability to phytoplankton---applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **2002**, 133, 189-206.

Choi, O.; Hu, Z. Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 4583-4588.

Domingos, R.F.; Baalousha, M.A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M.M.; Tufenkji, N.; Lead, J.R.; Leppard, G.G.; Wilkinson, K.J. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 7277-7284.

Domingos, R.F.; Simon, D.F.; Hauser, C.; Wilkinson, K.J. Bioaccumulation and Effects of CsTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii*- Nanoparticles or the Free Ions? *Environmental Science and Technology*. **2011**, 45, 7664-7669.

Bibliographie

Domingos, R.F.; Rafiei, Z.; Monteiro, C.E.; Khan, M.A.K. Wilkinson, K.J. Agglomeration and dissolution of zinc oxide nanoparticles: role of pH, ionic strength and fulvic acid. *Environmental Chemistry*. **2013**, 10, 306-312.

Feng, Q.L.; Wu, L.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical and Material Research*. **2000**, 52, 662-668.

Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19, 2769-2778.

Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Thiosulfate Enhances Silver Uptake by a Green Alga: Role of Anion Transporters in Metal Uptake. *Environmental Science & Technology*. **2001**, 35, 2214-2218.

Franklin, N.M.; Rogers, N.J.; Apte, S.C.; Batley, G.E.; Gadd, G.E.; Casey, P.S. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology*. 2007, 41, 8484–8490.

Bibliographie

Galceran, J.; Huidobro, C.; Companys, E.; Alberti, G. AGNES: A technique for determining the concentration of free metal ions. The case of Zn(II) in coastal Mediterranean. *Talanta*. **2007**, 71, 1795-1803.

Gorman, D.S.; Levin, R.P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthesis electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 54, 1665-1669.

Graham, D.; Faulds, K.; Thompson, D.; McKenzie, F.; Stokes, R.; Dalton, C.; Stevenson, R.; Alexander, J.; Garside, P.; McFarlane, E. Functionalized nanoparticles for bioanalysis by SERRS. *Biochemical Society Transactions*. **2009**, 37, 697-701.

Hadioui, M.; Leclerc, S.; Wilkinson, K.J. Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* **2013**, 105, 15-19.

Hassler, C.S.; Wilkinson, K.J. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella Kesslerii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2003**, 22, 620-626.

Hassler, C.S.; Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J. Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and chemistry*. **2004**, 23, 283-291.

Heinlaan, M.; Ivask, A.; Blinova, I.; Dubourguier, H-C.; Kahru, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. **2008**, 71, 1308-1316.

Bibliographie

- Henderson, R.F.; Bechtold, W.E.; Bond, J.A.; Sun, J.D. The Use of Biological Markers in Toxicology. *Toxicology*. **1989**, 20, 65-82.
- Hill, K.L.; Hassett, R.; Kosman, D.; Merchant, S. Regulated Copper Uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in Response to Copper Availability. *Plant Physiol*. **1996**, 112, 697-704.
- Hiriart-Baer, V.P.; Fortin, C.; Lee, D-Y.; Campbell, P.G.C. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulfate. *Aquatic Toxicol*. **2006**, 78, 136-148.
- Holt, K.B.; Bard, A.J. Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺. *Biochemistry* **2005**, 44, 13214-13223.
- Howe, G; Merchant, S. Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol*. 1992, 98, 127-136.
- Hutner, S.H.; Provasoli, L.; Schatz, A.; Haskins, C.P. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc*. **1950**, 94, 152-170.
- Kaegi, R.; Voegelin, A.; Sinnet, B.; Zuleeg, S.; Hagendorfer, H.; Burkhardt, M.; Siegrist, H. Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*. **2011**, 45, 3902-3908.

Bibliographie

Kennedy, A.J.; Hull, M.S.; Bednar, A.J.; Goss, J.D.; Gunter, J.C.; Bouldin, J.L.; Vikesland, P.J.; Steevens, J.A. Fractionating Nanosilver: Importance for Determining Toxicity to Aquatic Test Organisms. *Environmental Science & Technology*. **2010**, 44, 9571-9577.

Kola, H.; Wilkinson, K.J. Cadmium Uptake by a Green Alga Can Be Predicted by Equilibrium Modeling. *Environmental Science & Technology*. **2005**, 39, 3040-3047.

Lee, D-Y.; Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **2005**, 75, 127-135.

Lee, D-Y.; Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23, 1012-1018.

Lévard, C.; Hotze, E.M.; Lowry, G.V.; Borwn Jr., G.E. Environmental Transformations of silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology*. **2012**, 46, 6900-6914.

Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*. **2000**, 19, 409-453.

Liu, J.; Hurt, R.H. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 2169-2175.

Bibliographie

Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L. K.; Marechal-Drouard, L.; Marshall, W. F.; Qu, L. H.; Nelson, D. R.; Sanderfoot, A. A.; Spalding, M. H.; Kapitonov, V. V.; Ren, Q. H.; Ferris, P.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Lucas, S. M.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Cardol, P.; Cerutti, H.; Chanfreau, G.; Chen, C.L.; Cognat, V.; Croft, M. T.; Dent, R.; Dutcher, S.; Fernandez, E.; Fukuzawa, H.; Gonzalez-Ballester, D.; Gonzalez-Halphen, D.; Hallmann, A.; Hanikenne, M.; Hippler, M.; Inwood, W.; Jabbari, K.; Kalanon, M.; Kuras, R.; Lefebvre, P. A.; Lemaire, S. D.; Lobanov, A. V.; Lohr, M.; Manuell, A.; Meir, I.; Mets, L.; Mittag, M.; Mittelmeier, T.; Moroney, J. V.; Moseley, J.; Napoli, C.; Nedelcu, A. M.; Niyogi, K.; Novoselov, S. V.; Paulsen, I. T.; Pazour, G.; Purton, S.; Ral, J. P.; Riano-Pachon, D. M.; Riekhof, W.; Rymarquis, L.; Schroda, M.; Stern, D.; Umen, J.; Willows, R.; Wilson, N.; Zimmer, S. L.; Allmer, J.; Balk, J.; Bisova, K.; Chen, C. J.; Elias, M.; Gendler, K.; Hauser, C.; Lamb, M. R.; Ledford, H.; Long, J. C.; Minagawa, J.; Page, M. D.; Pan, J. M.; Pootakham, W.; Roje, S.; Rose, A.; Stahlberg, E.; Terauchi, A. M.; Yang, P. F.; Ball, S.; Bowler, C.; Dieckmann, C. L.; Gladyshev, V. N.; Green, P.; Jorgensen, R.; Mayfield, S.; Mueller-Roeber, B.; Rajamani, S.; Sayre, R. T.; Brokstein, P.; Dubchak, I.; Goodstein, D.; Hornick, L.; Huang, Y. W.; Jhaveri, J.; Luo, Y. G.; Martinez, D.; Ngau, W. C. A.; Otiillar, B.; Poliakov, A.; Porter, A.; Szajkowski, L.; Werner, G.; Zhou, K. M.; Grigoriev, I. V.; Rokhsar, D. S.; Grossman, A. R.; Annotation, C.; Team, J. A., The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 2007, 318, (5848), 245-251.

Miao, A.-J.; Schwehr, K.A.; Xu, C.; Zhang, S.-J.; Luo, Z.; Quigg, A.; Santschi, P.H. The algal toxicity of silver nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* **2009**, 157, 3034-3041.

Bibliographie

Mock, J.J.; Barbic, M.; Smith, D.R.; Schultz, D.A.; Shultz, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*. **2002**, 116, 6755-6759.

Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16, 2346-2353.

National Nanotechnology Initiative (NNI), Frequently asked questions, <http://www.nano.gov/nanotech-101/nanotechnology-facts>

Nature Education, Gene Expression; <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669>

Nature Education, Ribosomes, Transcription and Translation; <http://www.nature.com/scitable/topicpage/ribosomes-transcription-and-translation-14120660>

Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.,; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 8959-8964.

Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, 311, 622-627.

NIH, Image Processing and Analysis in Java Website; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

Nowack, B.; Bucheli, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution*. **2007**, 150, 5-22.

Bibliographie

Otavio Peulen, T; Wilkinson KJ. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45: 3367-3373.

Page, M.D.; Kropat, J.; Hamel, P.P.; Merchant, S.S. Two *Chlamydomonas* CTR Copper Transporters with a Novel Cyst-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. *Plant Cell* **2009**, 21, 928-943.

Panomics. QuantiGene®2.0 Reagent System User Manual.

http://www.panomics.com/downloads/UM13074_QG2Manual_RevB_080102.pdf.

Park, H-J.; Kim, J.Y.; Kim, J.; Lee, J-H.; Hahn, J-S.; Gu. M.B.; Yoon, J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Research* **2009**, 43, 1027-1032.

Pesavento, M.; Alberti, G.; Biesuz, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 631, 129-141.

Phenrat, T.; Saleh, N.; Sirk, K.; Kim, H-J.; Tilton, R.D.; Lowry, G.V. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. *Journal of Nanoparticle Research*. **2008**, 10, 795-814.

Pretsch, Ernö. The new wave of ion-selective electrodes. *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26, 46-51.

Bibliographie

Quaroni, L.; Chumanov. G. Preparation of Polymer-Coated Functionalized Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. **1999**, 121, 10642-10643.

Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. **2009**, 27, 76-83.

Ratte, H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18, 89-108.

Reinsch, BC; Levard, C; Li, Z; Ma, R; Wise, A; Gregory, KB; Brown, GE; Lowry, GV. Sulfidation of Silver Nanoparticles Decreases *Escherichia coli* Growth Inhibition. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 6992-7000.

Sigg, L. Kuhn, A.; Xue, H.B.; Kiefer, E.; Kistler, D. Cycles of trace-elements (copper and zinc) in a eutrophic lake---role of speciation and sedimentation. *Advances in Chemistry Series*. **1995**, 244 (issued in *Aquatic Chemistry*), 177-194.

Simon, D.F.; Domingos, R.F.; Hauser, C.; Hutchins, C.M.; Zerges, W.; Wilkinson, K.J. Transcriptome Sequencing (RNA-seq) Analysis of the Effects of Metal Nanoparticle Exposure on the Transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79, 4774-4785

Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J. Physico-chemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science & Technology*. **2002**, 36, 969-975.

Solioz, M.; Odermatt, A. Copper and silver Transport by CopB-ATPases in the Membrane Vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 9217-9221.

Bibliographie

Woodrow Wilson International Center for Scholars. A nanotechnology consumer products inventory. www.nanotechproject.org/consumerproducts.

Xu, Z.; Hou, Y.; Sun, S. Magnetic Core/Shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, 129, 8698-8699.

Zhao, C.M.; Wang, W.X. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*. **2012**, 6, 361-370.