

Université de Montréal

**Les effets de revêtements de surface sur la dissolution et la bioaccumulation
de nanoparticules d'oxyde de zinc par l'algue unicellulaire, *C. reinhardtii***

Par

Vladimir Merdzan

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

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

Décembre 2013

© Vladimir Merdzan, 2013

Résumé

Au cours de la dernière décennie, les nanoparticules ont connu un essor sans précédent dans plusieurs domaines. On peut retrouver ces nanoparticules dans des secteurs aussi variés tels que la médecine, l'électronique, les écrans solaires, les cosmétiques et les plastiques, pour ne nommer que ceux-là. Cette utilisation massive a eu un effet pervers sur l'environnement, sachant qu'une grande partie de ces produits se sont retrouvés inévitablement dans les milieux naturels. Plusieurs études révèlent qu'autant la présence des nanoparticules que leurs produits de dissolution sont à prendre en considération lorsque des travaux toxicologiques ou le devenir de ces matériaux sont étudiés. Il est désormais clair que les propriétés de surface de ces nanoparticules jouent un rôle central sur leur comportement dans les solutions aqueuses; que ce soit les interactions avec des organismes ou entre les particules elles-mêmes. Afin d'évaluer le devenir de nZnO, une étude sur la dissolution ainsi que la bioaccumulation a été réalisée avec l'algue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de nanoparticules ayant différents enrobages. Les nanoparticules d'oxyde de zinc suivantes ont été étudiées : (i) nZnO sans enrobage (nZnO); (ii) nZnO avec enrobage d'acide polyacrylique (nZnO-PAA) et (iii) nZnO avec enrobage d'hexamétaphosphate de sodium (nZnO-HMP). La dissolution était mesurée à l'aide de trois techniques : ultrafiltration par centrifugation (CU); technique potentiométrique (*scanned stripping chronopotentiometry*, SSCP) et spectrométrie de masse – plasma à couplage inductif couplé à une résine échangeuse d'ions (*resin-based inductively coupled plasma-mass spectrometry*, resin-based ICP-MS). Les résultats obtenus démontrent une grande tendance à la dissolution pour le nZnO (presque totale) tandis que pour le nZnO-PAA et le nZnO-HMP, la dissolution est dépendante de la nature de l'enrobage le composant. Pour la bioaccumulation sur l'algue testée, les données montrent une grande dépendance au

zinc libre issu de la dissolution pour nZnO et nZnO-PAA. À l'inverse, le nZnO-HMP démontre une bioaccumulation plus élevée par comparaison aux mêmes concentrations d'expositions du zinc libre, expliquée par la stimulation de l'internalisation du zinc provoqué par la présence de phosphate constituant l'enrobage de nZnO-HMP.

Mots clés : nanoparticules d'oxyde de zinc; nZnO; dissolution; bioaccumulation; *Chlamydomonas reinhardtii*; acide polyacrylique; hexamétaphosphate de sodium;

Abstract

Over the last decade, the use of nanoparticles (NP) has been increasing exponentially in numerous sectors, leading to their massive release into the environment. For example, zinc oxide nanoparticles (nZnO) can be found in areas such as medicine, electronics, sunscreens, cosmetics and plastics. Concerns have therefore been raised about the impacts of the NP on the natural environment, as well as their consequences for humans. Multiple studies reveal that not only the NP but also their dissolution products may have impacts on environmental systems. It is well understood that surface properties of engineered nanoparticles in aqueous solution play a pivotal role in nanoparticle behavior, including their interactions with organisms. Therefore, in order to assess the behavior of nZnO, this study focuses on their dissolution and evaluates the bioaccumulation of 3 nanoparticles with different surface stabilizations by the freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*. The following NP were studied: (i) bare nZnO, (ii) polyacrylic acid coated (nZnO-PAA) and (iii) sodium hexametaphosphate coated (nZnO-HMP). Three different techniques were used to quantify dissolution of the nZnO: centrifugal ultrafiltration (CU), scanned stripping chronopotentiometry (SSCP) and resin-based inductively coupled plasma-mass spectrometry (resin-based ICP-MS). The results reveal a high dissolution of the bare nZnO (nearly total) while the dissolution of the polyacrylate coated and hexametaphosphate coated nZnO were highly dependent on the nature of the stabilizer. As a consequence, bioaccumulation in model algae *C. reinhardtii* was strongly related to the release of free zinc in the bare nZnO and the nZnO-PAA. On the other hand, algae exposed to nZnO-HMP appeared to be stimulated by the

phosphate coating, leading to higher bioaccumulation than for the free zinc, once again demonstrating the importance of the nature of the stabilizer.

Key words: zinc oxide nanoparticles; nZnO; dissolution; bioaccumulation; *Chlamydomonas reinhardtii*; polyacrylic acid; sodium hexametaphosphate;

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xviii
1. Introduction	1
1.1 Mise en situation	1
1.1.1 Les nanoparticules en général	1
1.1.2 Les nanoparticules dans l'environnement	4
1.1.3 Les transformations des nanoparticules	7
1.2 La toxicité des nanoparticules manufacturées	10
1.2.1 Cas général de toxicité	10
1.2.2 Toxicité relative des nZnO	13
1.3 Les interactions des nZnO avec les organismes d'eaux douces	15
1.3.1 L'importance du zinc et choix de l'organisme modèle étudié	15
1.3.2 Concepts de base des modèles d'équilibres	16

1.3.3 Mécanisme de bioaccumulation de nZnO	18
1.4 Les objectifs de l'étude	24
2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation	25
2.1 Abstract	27
2.2 Introduction.....	28
2.3 Materials and methods	30
2.3.1 Materials	30
2.3.2 nZnO Dissolution	31
2.3.2.1 <i>Scanned stripping chronopotentiometry (SSCP)</i>	31
2.3.2.2 <i>Centrifugal ultrafiltration</i>	32
2.3.2.3 <i>Resin-based ICP-MS</i>	32
2.3.3 nZnO size characterization	32
2.3.3.1 <i>Transmission electron microscopy (TEM)</i>	32
2.3.3.2 <i>Nanoparticle tracking analysis (NTA)</i>	33
2.3.3.3 <i>Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)</i>	33
2.3.3.4 <i>Analytical ultracentrifuge (AUC)</i>	34
2.3.4 Electrophoretic mobility measurements	34
2.3.5 Algal growth and exposure media	35

2.3.6 Bioaccumulation experiments	35
2.4 Results and discussion.....	37
2.4.1 Characterization of nZnO	37
2.4.1.1 <i>nZnO</i> agglomeration	37
2.4.1.2 <i>nZnO</i> dissolution	41
2.4.2 Biouptake of the nZnO	43
2.4.2.1 <i>Bare nZnO</i>	44
2.4.2.2 <i>nZnO-PAA</i>	45
2.4.2.3 <i>nZnO-HMP</i>	46
2.4.2.4 <i>All NP</i>	48
2.5 Conclusion.....	50
2.6 Acknowledgements.....	51
2.7 References	52
2.8 Supporting information (SI).....	59
2.8.1 Biouptake as a function of time	59
2.8.2 Optimisation of the algal washing procedure	60
2.8.3 Scanned Stripping Chronopotentiometry (SSCP)	61
2.8.4 Centrifugal ultrafiltration (CU)	64

2.8.5 Resin-based ICP-MS	65
2.8.6 Fluorescence correlation spectroscopy (FCS).....	66
2.8.7 Transmission electron microscopy (TEM)	68
2.8.8 Fourier transform infrared (FTIR)	69
2.8.9 The effect of HMP on the SSCP	70
2.8.10 Thermodynamic speciation calculations of Zn in presence of phosphate	71
2.9 References for supporting information (SI).....	72
3. Résultats supplémentaires	73
3.1 L'utilisation de l'EDTA pour le rinçage de nanoparticules sur les filtres.....	73
3.1.1 Matériel et méthode.....	73
3.1.2 Résultats et discussion	74
3.2 Cinétique de bioaccumulation de différentes nanoparticules de ZnO...	76
3.2.1 Matériel et méthode.....	76
3.2.2 Résultats et discussion	77
3.3 Quantification du zinc libre avec une technique échangeuse d'ions	79
3.3.1 Matériel et méthode.....	80
3.3.2 Résultats et discussion	82

4. Conclusions et perspectives	85
5. Bibliographie.....	86

Liste des tableaux

Table II.1. Measured sizes of the bare nZnO.....	39
Table II.2. Measured sizes of the nZnO-PAA.....	40
Table II.3. Measured sizes of the nZnO-HMP.....	40

Liste de figures

Figure 1.1 Schéma simplifié illustrant les mécanismes de toxicité sur un organisme eucaryote en milieux d'eau douce provenant des nanoparticules.....	11
Figure 1.2 Schématisation hypothétique du processus physico-chimique menant à la bioaccumulation du Zn^{2+} dans l'algue <i>C. reinhardtii</i> à partir de nZnO en solution.....	19
Figure 1.3 Schéma simplifié illustrant les différentes espèces chimiques du zinc réparti en 4 grandes catégories (A-D)	22
Figure 2.1 Concentration ratios of dissolved or free Zn to total Zn as a function of total Zn concentrations.....	42
Figure 2.2 Cellular Zn as function of: (A) total, (B) dissolved or (C) free Zn measured for the bare nZnO (diamonds).....	44
Figure 2.3 Cellular Zn as function of: (A) total, (B) dissolved and (C) free Zn measured for the nZnO-PAA (diamonds).....	46
Figure 2.4 Cellular Zn as function of (A) total, (B) dissolved and (C) free Zn measured for the salt of Zn (stars) and the nZnO-HMP (diamonds).	47

Figure 2.5 Cellular Zn as function of various phosphate concentrations expressed as log ratios (total constant Zn concentration of $55.6 \mu\text{g L}^{-1}$ while phosphate concentrations in solution varied from 8.4×10^{-8} to 7.5×10^{-4} M)..... 48

Figure 2.6 Internalization flux as a function of dissolved zinc for *C. reinhardtii* at pH 7.0 (A - determined by SSCP; B - determined by ultrafiltration) or free (C – determined by SSCP).....50

Figure S1 Cellular Zn as function of time for the salt of Zn (★), nZnO- (◆), nZnO-PAA (●), and nZnO-HMP (▲).....59

Figure S2 Cellular Zn as function of the volume of a 10^{-2} M EDTA wash solution following exposure to a Zn salt (★), bare nZnO (◆), nZnO-PAA (●) or nZnO-HMP (▲)60

Figure S3 SSCP shift of the half-wave deposition potential for the bare nZnO (◆), nZnO-PAA (●), and nZnO-HMP (▲) as function of the total Zn present in the exposure solutions.....63

Figure S4 Equilibration of the centrifugal ultrafilters measured for successive equilibration cycles. The number of equilibration cycles was optimized for the lowest (●) and highest (◆) total Zn concentrations used.....64

Figure S5 Resin-based ICP-MS temporal profiles without (A, C and E) and with background suppression (B, D and F) by using the cation-exchange resin.....	65
Figure S6 TEM images of bare nZnO (A), nZnO-HMP (B) and nZnO-PAA (C).....	68
Figure S7 FTIR spectra of nZnO-HMP before (black) and after (red) centrifugal ultrafiltration (20 minutes, centrifugation at 3700 ×g).....	69
Figure S8 (a) SSCP waves and (b) SCP curves obtained for a total Zn concentration of 50 µg L ⁻¹ in absence (calibration; ♦) and presence of different HMP concentrations.....	70
Figure S9 Free Zn as a function of added phosphate concentrations, as determined by Visual Minteq. Conditions: 50 µg L ⁻¹ Zn, 10 ⁻² M NaHEPES, 10 ⁻⁵ M Ca(NO ₃) ₂ , pH 7.0.....	71
Figure 3.1 Quantification du Zn adsorbé sur filtres de nitrocellulose (3.0 µm de taille des pores) provenant de trois types de nZnO suite à l'utilisation de l'EDTA (barres rouges) et sans EDTA (barres bleues).....	75
Figure 3.2 Bioaccumulation effectuée en fonction du temps (0 à 120 min) pour les différentes nanoparticules et l'ion libre	78

Figure 3.3 Tentative d'obtention du temps d'équilibration de deux solutions de Zn^{2+} contenant 10^{-2} M Na^{+} et 10^{-5} M Ca^{2+} dans une solution tamponnée de HEPES à pH 7.0 sur une résine échangeuse d'ions.....83

Liste des abréviations

A : unité d'Ampère

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag/AgCl : électrode d'argent/chlorure d'argent

AUC : ultracentrifugeuse analytique

BLM : modèle du ligand biotique

CdSe : points quantiques de séléniure de cadmium

CdTe : points quantiques de tellure de cadmium

CdS : points quantiques de sulfure de cadmium

nCeO₂ : nanoparticules d'oxyde de cérium

CU : ultrafiltration par centrifugation

D : coefficient de diffusion

d_H : diamètre hydrodynamique

DMT : technique de membrane de Donnan

dTAP : tris-acetate-phosphate dilué

dt/dE : dérivée première du temps par rapport au potentiel

D_w : coefficient de diffusion moyen en masse

D_{Zn} : coefficient de diffusion du Zn²⁺

D_{ZnO} : coefficient de diffusion de ZnO

E_d : potentiel de déposition

E_{d1/2} : potentiel de déposition de demi-vague

EDTA : éthylène diaminetétraacétique

EOR: espèce oxydante réactive

FCS : spectroscopie de corrélation de fluorescence

FIAM : modèle de l'ion libre

g : force gravitationnelle

GSH : glutathion (forme réduite)

GSSG : disulfure de glutathion (forme oxydée)

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

I : force ionique

I_s : courant oxydant de décapage

J_{int} : flux d'internalisation d'un métal

J_{max} : flux d'internalisation maximal d'un métal

k_B : constante de Boltzmann

k_{int} (k'_{int}) : constante d'internalisation d'un métal	NTCCM : nanotube de carbone à couche multiple
K_m : l'affinité d'un transporteur pour le métal d'intérêt	NTCSC : nanotube de carbone à simple couche
ML : lien métal-ligand	nTiO₂ : nanotube d'oxyde de titane
M-S_s : lien métal-site spécifique	nZnO : nanoparticule d'oxyde de zinc
M-S_{ns} : lien métal-site non spécifique	nZnO-HMP : nanoparticule d'oxyde de zinc ayant un enrobage d'hexamétaphosphate (Hexametaphosphate coated zinc oxide nanoparticles)
Métal-S_s : lien métal-site spécifique	nZnO-PAA : nanoparticule d'oxyde de zinc ayant un enrobage d'acide polyacrylique (Polyacrylic acid coated zinc oxide nanoparticles)
meq/g : milliéquivalent par gramme	nZVI : nanoparticule de fer zéro valent (nano Zero Valent Iron)
M^{Z+} : métal ayant une charge d'oxydation Z+	O₂^{-•}, ¹O₂, OH[•] : radicaux libres
nAg : nanoparticules d'argent	OA : acide oléique
nCeO₂ : nanoparticules d'oxyde de cérium	PMMA : acide polyméthacrylique (Polymethacrylic acid)
nCuO : nanoparticule d'oxyde de cuivre	S_s : site spécifique
nFe₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de fer(III)	S_{ns} : site non-spécifique
NM : nanomatériaux	SE : scénario élevé
NP : nanoparticule	
nSiO₂ : nanoparticule d'oxyde de silicium	
NTA : analyse des mouvements des nanoparticules (nanoparticle tracking analysis)	
NTC : nanotube de carbone	

SR : scénario réaliste

SSCP: décapage par chronopotentiométrie

à balayage (Scanned Stripping

Chronopotentiometry)

Resin-based ICP-MS (ICP-MS):

Spectrométrie de masse – plasma à

couplage inductif couplé à une résine

échangeuse d'ions (Resin-based

inductively coupled plasma-mass

spectrometry)

TAP: tris-acetate-phosphate

t_d : temps de déposition

TEM : transmission electron microscopy

UV-A : rayons ultraviolets de type A

UV-B : rayons ultraviolets de type B

V : unité de Volt

Remerciements

Je tiens à remercier d'abord et avant tout mon directeur de recherche Kevin J. Wilkinson avec qui j'ai eu l'honneur et le privilège de faire ma maîtrise. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance sur ce projet. Au cours de cette période j'ai acquis beaucoup d'aptitudes et d'autonomie en laboratoire qui me serviront certainement dans le futur. Votre ouverture d'esprit, disponibilité et judicieux conseils m'ont permis de venir à bout de ce projet. Finalement je tiens à vous remercier infiniment pour l'occasion que vous m'avez donnée de faire un stage au Portugal. J'ai grandement apprécié mon expérience. Merci du fond du cœur.

Je veux également remercier mes parents, Zeljko et Radmila, qui m'ont soutenu et encouragé durant les périodes difficiles sans oublier mon petit frère Marko que j'adore infiniment.

Je suis très heureux d'avoir ma copine Ljiljana à mes côtés avec qui le temps passe très vite. J'ai de la chance d'avoir rencontré une personne compréhensive et qui me supporte.

Je tiens également à remercier Rute F. Domingos et Carlos E. Monteiro qui m'ont accueilli et encadré dans leur laboratoire à Lisbonne. Merci Rute pour ta disponibilité et ton aide.

Finalement, je suis content d'avoir fait la connaissance de plusieurs personnes avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler: Simon qui est devenu au fil du temps un ami proche avec qui j'ai partagé de bons moments, Madjid pour sa bonne humeur et son aide, Dana, Pauline, Elena, Faraz et Ildéphonse.

1. Introduction

1.1 Mise en situation

1.1.1 Les nanoparticules en général

Les nanoparticules (NP) sont définies en tant que matériaux possédant des tailles entre 1 et 100 nm dans au moins 2 dimensions, selon le *British Standards Institution* (2007), *American Society for Testing and Materials* (2006) et le *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (2007). Depuis la dernière décennie, la production des NP est devenue un marché très lucratif qui ne cesse d'augmenter chaque année. D'ici 2015, près d'un trillion de dollars en profit seront réalisés (Aitken et al. 2006; Nel et al. 2006). Ceci n'est pas surprenant en prenant en compte que la nanotechnologie est présente dans de multiples domaines. En effet, l'utilisation des NP pourrait se résumer selon les catégories suivantes: électronique, biomédecine, pharmaceutique, cosmétique, assainissement, catalyse et matériaux. Elles possèdent des propriétés très intéressantes, telles qu'une grande aire surfacique due à leur petite taille qui les rend très réactives ainsi que des propriétés optiques très recherchées (Niemeyer 2001; Poole and Owens 2003; Schmid 2004).

Les NP se retrouvant dans l'environnement peuvent être autant issues de processus naturels qu'anthropiques (Lowry et al. 2012). Les nanoparticules originaires de mécanismes naturels présentement dans l'environnement sont classifiées dans la catégorie des colloïdes tout en ayant une taille inférieure à 100 nm, tout comme les NP manufacturées. Les colloïdes, regroupant les NP naturelles, incluent des oxydes de fer et manganèse, aluminosilicates, substances humiques, virus et bactéries (Ju-Nam and Lead 2008). L'activité microbienne,

1. Introduction

l'altération des minéraux, les éruptions volcaniques ainsi que les feux de forêts sont des causes possibles de formation des nanoparticules naturelles ainsi que des colloïdes dans les milieux aquatiques (Lead and Wilkinson 2006; Navarro et al. 2008).

Les nanoparticules manufacturées, quant à elles, peuvent être séparées selon plusieurs classes, y compris : (i) les nanomatériaux (NM) composés uniquement de carbone, c'est-à-dire les NM organiques; (ii) les oxydes métalliques; (iii) les nanocristaux semi-conducteurs et (iv) les métaux à zéro valence (Klaine et al. 2008).

Dans la première catégorie des NM organiques se retrouvent les fullerènes et les nanotubes de carbones (NTC). Les fullerènes, aussi surnommés « *buckyballs* » ont la forme d'une sphère de 60 atomes de carbone (C_{60}). Ils ont été synthétisés pour la première fois au milieu des années 80. Plusieurs autres versions ont été synthétisées au cours des années, telles que les C_{70} , C_{76} , C_{78} et C_{80} mais la C_{60} est restée la plus populaire (Ju-Nam and Lead 2008). Les fullerènes sont surtout utilisés en recherche et développement (Piccinno et al. 2012). Malgré leurs excellentes conductivités thermiques et électriques, des applications directes de ces molécules sont restreintes en raison de leur forte agrégation (e.g faible solubilité) dans l'eau qui limite leur réactivité. Par ailleurs, des stratégies ont été développées avec le temps afin de fonctionnaliser les fullerènes en ajoutant des groupements hydrophiles afin d'en augmenter la dispersion (Chiang et al. 1996). Le second type de NM dans cette catégorie sont les nanotubes de carbone à simple couche (NTCSC). Ce sont des matériaux très intéressants, possédant jusqu'à 100 fois la force de tension de l'acier tout en ayant le sixième de sa masse (Lekas 2005). Ces matériaux ont des propriétés industrielles très utiles telles que mécaniques, thermiques, électriques et photochimiques (Arepalli et al. 2001). Il existe également des nanotubes de carbone à couches multiples (NTCCM), qui possèdent une plus grande résistivité.

1. Introduction

Ces NM seraient très prometteurs dans le domaine des batteries rechargeables et dans la construction de matériaux à la fois résistants et flexibles (Piccinno et al. 2012).

Dans la seconde catégorie de NM, c'est-à-dire les oxydes métalliques, les nanoparticules les plus utilisées sont le dioxyde de titane (TiO_2), l'oxyde de zinc (ZnO) et le dioxyde de cérium (CeO_2). Dans le cas du TiO_2 et du ZnO , ces nanoparticules possèdent une grande énergie de bande (*band gap energy*) de 3.2 eV et 3.4 eV, respectivement. Ces valeurs d'énergies correspondent à des longueurs d'ondes dans l'ultraviolet (Bellardita et al. 2007; Singh et al. 2007). Cela leur procure donc des propriétés optiques qui leur permettent d'être utilisées dans les cellules solaires, les peintures et dans le cas du ZnO , dans les appareils électroniques. Cependant, leur plus grande utilisation demeure dans le domaine des écrans solaires et des produits cosmétiques, en raison de leur capacité à bloquer efficacement les rayons ultraviolets UV-A et UV-B (Wong et al. 2010). Quant aux nanoparticules d'oxyde de cérium, possédant 2 états d'oxydation, Ce(III) et Ce(IV) dont le ratio semble être dépendant de la taille selon Zhang et al. (2002) sont surtout utilisés comme catalyseurs de craquage dans le raffinage de pétrole, additifs dans l'essence ainsi que dans les convertisseurs catalytiques des voitures (Schelter 2013).

Les nanocristaux semi-conducteurs, aussi connu sous l'appellation de points quantiques, sont composés d'un noyau semi-conducteur (e.g. CdSe , CdTe) entouré d'un enrobage (e.g. silice, ZnS , CdS) qui protège le noyau de l'oxydation et qui augmente les propriétés électroniques et optiques des points quantiques (Derfus et al. 2004). Ils sont surtout retrouvés dans le domaine médical en tant qu'outil d'imagerie. Ils possèdent une photostabilité incroyable leur permettant d'effectuer des cycles d'excitation et de fluorescence pendant des heures lorsqu'exposés à la lumière (Alivisatos et al. 2005; Jamieson et al. 2007).

1. Introduction

La dernière catégorie de NP incorpore les métaux à zéro valence tels que les nanoparticules de fer (nanosize Zero Valent Iron, nZVI) et les nanoparticules d'argent (nAg). Les nZVI sont principalement employés dans la désinfection des eaux sous-terraines où ils éliminent les nitrates et les produits organochlorés en les réduisant (O'Carroll et al. 2013). Les nAg, quant à eux, servent comme bactéricide dans les tissus textiles et les désinfectants (Maillard and Hartemann 2013).

1.1.2 Les nanoparticules dans l'environnement

La communauté scientifique est désormais en accord avec le fait que la production, l'utilisation et l'élimination des nanoparticules font en sorte que ces dernières se retrouveront inévitablement dans l'environnement. Néanmoins, il est présentement très difficile de quantifier, avec précision, les concentrations retrouvées dans les milieux naturels des différentes nanoparticules anthropiques. Cela peut être expliqué, en partie, par le fait que les techniques utilisées ne sont pas adaptées et que les protocoles sont très compliqués à mettre en place afin de faire des mesures *in situ* (Nowack et al. 2012). Cependant, les usines de traitement des eaux ainsi que les usines d'incinération de déchets constituent des endroits où les concentrations des NP sont prévues d'être les plus élevées (Gottschalk and Nowack 2011). Les derniers recensements (Woodrow Wilson International Center for Scholars 2013) indiquent que les nanoparticules métalliques sont celles qui se retrouvent le plus souvent dans les produits de consommation et donc il s'avère logique d'illustrer deux exemples de celles-ci étant rejetées de façon directe et indirecte dans l'environnement. Parmi ceux-ci, on dénombre les nTiO₂ et nZnO qui sont utilisées notamment dans les peintures et les produits cosmétiques respectivement.

1. Introduction

Le nTiO₂ est un oxyde métallique qui est très répandu dans l'utilisation manufacturière. Dans une revue littéraire de Nowack et al. (2012), il est question notamment de ces nTiO₂ qui est présent dans les peintures servant à l'application sur les façades des immeubles et maisons. Ces nanoparticules, incorporées dans une matrice solide une fois appliquées et séchées, sont exposées à différentes conditions météorologiques au cours de l'année avec des températures changeantes. Ces conditions sont donc propices à la décharge de ces nanoparticules dans les ruissellements urbains avant d'atteindre les réseaux d'égouts. En effet, suite à leurs analyses des échantillons bruts de ruissellements des façades fraîchement peintes, une étude de Kaegi et al. (2008) révèle qu'une importante libération de nTiO₂ des façades des maisons et immeubles est possible avec des quantités de Ti libérées allant jusqu'à 600 µg Ti L⁻¹. Les auteurs révèlent également que les concentrations recueillies des échantillons bruts des ruissellements provenant autant de façades fraîchement peintes que celles plus âgées, montrent qu'elles sont supérieures de seulement 10-15% des échantillons centrifugés, ce qui indique que la majorité des particules libérées sont de très petites tailles, de l'ordre de 20 à 300 nm.

Étant présent en grandes concentrations dans les crèmes solaires, les nZnO peuvent être libérées dans l'environnement par voie directe lorsque les écrans solaires rentrent en contact avec l'eau lors de la baignade. Certains scientifiques estiment que les quantités relâchées dans l'environnement correspondent à 250 tonnes par an pour le nTiO₂, nZnO et nFe₂O₃ utilisés dans les produits de soin de la peau (Danovaro et al. 2008). L'intérêt est de savoir si ces particules, une fois libérées, persistent dans les milieux naturels. Très peu de recherches à ce jour ont été portées sur les nanoparticules dans des matrices dites naturelles. Sivry et al. (2014) ont récemment publié un article portant sur le devenir de deux types de nanoparticules de zinc, avec et sans enrobage organique, dans une rivière (la Seine) riche en

1. Introduction

carbonate. Pour ce faire, les auteurs ont étudié la dissolution des nanoparticules à l'aide de deux techniques, soit l'ultrafiltration par centrifugation ainsi qu'avec la membrane Donnan (Donnan membrane technique, DMT). Il a été observé que les nZnO ne possédant aucun enrobage avaient une vitesse de dissolution très rapide. Cependant, sur un temps très court (moins de 1 heure), moins de 1% du zinc total a été retrouvé en solution. Il a été suggéré qu'une formation de $Zn(OH)_2$ sur la surface des nanoparticules aurait contrôlé la dissolution, étant donné sa plus grande solubilité comparativement au ZnO. Dans le cas des nanoparticules possédant un enrobage, l'effet inverse a eu lieu, c'est-à-dire une plus grande dissolution (10% du zinc total) sur une période de temps plus longue (48 heures), résultant jusqu'à 10 fois plus de zinc dissous comparativement aux nanoparticules non-enrobées. Il appert donc que l'utilisation d'enrobage, dans ce cas-ci, permet à la particule de libérer son produit de dissolution de façon plus importante et sur une durée plus longue.

Les deux exemples mentionnés ci-dessus représentent des quantités non-négligeables de nanoparticules relâchées dans l'environnement. Cependant, sur une plus grande échelle, les usines de traitement des eaux usées demeurent potentiellement les sources les plus polluantes en termes de rejets en raison de l'inefficacité de traitement pour l'enlèvement de certaines nanoparticules (Batley et al. 2013). De plus, ces usines sont considérées comme de bons indicateurs de la concentration réelle de nanoparticules dans l'environnement ainsi que de la qualité des eaux pour fins de consommation. Un modèle d'exposition des nanoparticules a été mis sur pied dans une usine de traitement des eaux selon un scénario réaliste d'exposition (SR) aux nanoparticules et un scénario élevé (SE) en se basant sur la production mondiale de nanomatériaux (Mueller and Nowack 2008). Les auteurs ont évalué l'efficacité de l'élimination des nanoparticules à 97% selon un modèle SR (passage de 500 tonnes/an de nAg,

1. Introduction

350 tonnes/an pour nanotubes de carbone et 435 tonnes/an pour nTiO₂ dans l'usine) et de 90% pour un modèle SE (pour 1230 tonnes/an pour nAg, 500 tonnes/an pour nanotubes de carbone et 5000 tonnes/an pour nTiO₂) ayant recours à des techniques de filtration et floculation. Pour Limbach et al. (2008), ils ont démontré que la taille des nanoparticules, leur capacité à s'adsorber sur les boues ainsi que leur solubilité jouent des rôles importants dans l'efficacité du traitement des eaux usées. Les agglomérats plus larges sont plus faciles à éliminer en raison de leur facilité à s'adsorber sur les boues en précipitant au fond des bassins. Dans le cas de nCeO₂ par exemple, pourtant insolubles mais ayant des tailles très petites (< 200 nm), sont éliminés à 94% seulement. Dans le cas de nanoparticules solubles telles que nZnO, l'élimination est supérieure en raison de leur dissolution notamment. Force est d'admettre que dans le meilleur des cas, c'est-à-dire pour le modèle SR, 3% des nanoparticules sont relâchées dans l'environnement, ce qui n'est pas négligeable lorsque les quantités se chiffrent en tonnes. De plus, les concentrations environnementales de nanoparticules risquent d'augmenter dans les années à venir en raison de l'expansion de leur utilisation dans les différentes applications (Ma et al. 2013).

1.1.3 Les transformations des nanoparticules

Les nanoparticules peuvent subir plusieurs transformations dans l'environnement, dépendant du milieu dans lequel elles se trouvent. Par exemple, on peut penser à l'oxydation, la réduction, la précipitation, la dissolution, l'agrégation et l'adsorption (Lowry et al. 2012). Que ce soit l'utilisation des nanoparticules de fer zéro valent (nZVI) pour leur propriétés oxydatives permettant la décontamination des eaux sous-terraines ou encore la forte

1. Introduction

dissolution des nanoparticules de ZnO qui limite leur persistance dans l'environnement (Bian et al. 2011), ces processus sont importants dans le devenir des nanoparticules.

Parmi les transformations chimiques, l'oxydation et la réduction sont des processus très importants dans la nature. Ce sont des mécanismes couplés qui nécessitent un accepteur et un donneur d'électrons. Ils dépendent bien évidemment de plusieurs facteurs, tels que la présence d'agents oxydants ou réducteurs, la température et le pH. La lumière UV peut également jouer un rôle clé dans les transformations photochimiques puisque certaines nanoparticules sont photosensibles, c'est-à-dire qu'elles réagissent à la présence de la lumière. Prenons exemple sur le $n\text{TiO}_2$, qui est reconnu comme étant capable de générer des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) après avoir été en contact avec la lumière UV (Brunet et al. 2009). La dissolution est un autre processus non-négligeable dans l'environnement naturel puisque la libération d'ions dans l'eau provenant des nanoparticules les rendent souvent plus biodisponible que les formes particulaires des matériaux (Franklin et al. 2007). Il existe plusieurs techniques de spéciation capable de quantifier le métal libre et/ou dissous en solution. Parmi celles-ci, on retrouve une technique potentiométrique (*SSCP*) et une technique d'analyse (*Resin-based ICP-MS*) qui sont décrites en détail dans les sections 2.8.3 et 2.8.5 respectivement dans l'article tandis qu'une troisième technique, la résine échangeuse d'ions, est décrite dans la section 3.3 des résultats supplémentaires.

En plus des transformations chimiques, les transformations physiques peuvent aussi influencer le destin des nanoparticules. Par exemple, ces dernières peuvent s'agglomérer suite à la homo- ou hétéro- coagulation des particules (Domingos et al. 2013b). Lors de l'agglomération, il s'en suit une diminution de l'aire de surface des particules et donc de la réactivité de ces dernières, qui est reliée au nombre d'atomes présents sur la surface qui

1. Introduction

peuvent interagir avec les organismes voisins (Nel et al. 2006). L'agglomération est donc un phénomène qui peut diminuer, sinon complètement arrêter, la dissolution (Bian et al. 2011).

L'adsorption est un processus impliquant nanoparticules et surfaces solides grâce auxquelles différentes liaisons chimiques faibles telles que, d'un côté, les forces de van der Waals sont mises en jeu. D'un autre côté, des liaisons plus fortes, de type covalente, métallique ou hydrogène peuvent aussi faciliter la chimisorption des NP sur des surfaces (Dabrowski 2001). La libération des ions provenant des NP mènent parfois à leur précipitation. Par exemple, dans les usines d'épurations des eaux usées, l'Ag⁺ libéré des NP peut se lier très fortement aux groupements thiols des protéines et former un précipité insoluble dans les boues (Ag₂S) (Kaegi et al. 2011).

Certaines transformations de nanoparticules ont lieu à l'intérieur, ou à l'extérieur, d'un organisme biologique ce qui pourrait affecter le comportement des nanoparticules en ayant un impact sur leur charge, réactivité et agrégation (Lowry et al. 2012). Par exemple, certaines algues sont reconnues capables de réduire les ions métalliques en nanoparticules. Dans cette catégorie de réaction, mentionnons, l'algue unicellulaire *Scenedesmus obliquus* qui peut, par un mécanisme de détoxification des ions Zn²⁺, produire des nano aiguilles à base de phosphate de zinc (Santomauro et al. 2012).

Finalement, les interactions entre nanoparticules et macromolécules peuvent aussi être très importantes dans l'environnement. Dans les milieux naturels, il y a une quantité importante de biomacromolécules telles que les substances humiques (acides humique et fulviques), les protéines, les polysaccharides, etc. La concentration de la matière organique dans l'environnement est de plusieurs ordres de grandeurs plus élevée que la concentration massique des nanoparticules. De même, la matière organique a une forte affinité pour la

1. Introduction

surface des nanoparticules telles que les oxydes. Il est donc fort probable qu'il y ait des interactions entre nanoparticules et macromolécules. Dans ce cas, l'adsorption de la matière organique à la surface des NP peut réduire leur agrégation et les stabiliser en conséquence (Buffle et al. 1998; Keller et al. 2010).

Enfin, le parcours des nanoparticules étant décrit jusqu'à son arrivée dans l'environnement ainsi que leurs transformations, la question se pose à présent, qu'en est-il de la toxicité inhérente de ces nanoparticules lorsqu'elles rentrent en contact avec les organismes d'eaux douces? Voici donc une question qui sera élaborée dans la prochaine section qui traitera de la toxicité de quelques nanoparticules, surtout de l'oxyde de zinc, avec différents organismes des milieux naturels.

1.2 La toxicité des nanoparticules manufacturées

1.2.1 Cas général de toxicité

Les mécanismes de toxicité peuvent être d'ordre chimique ou physique, mais typiquement auront lieu à l'interface des nanoparticules et membrane plasmique d'un organisme (Elsaesser and Howard 2012). Il faut prendre plusieurs facteurs en considération afin d'évaluer la toxicité de certaines nanoparticules lorsque ces dernières rentrent en contact avec des organismes tels que la taille, l'aire de surface, la sensibilité à la lumière, présence d'enrobage, la concentration, la force ionique et le pH.

1. Introduction

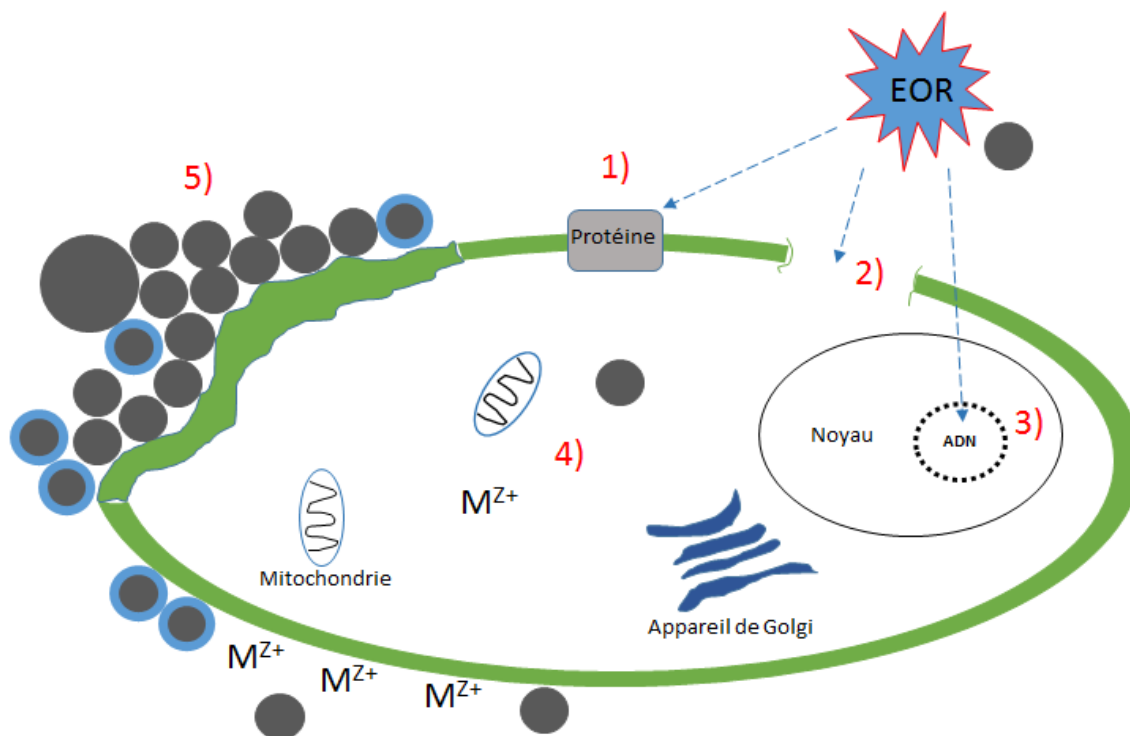


Figure 1.1 Schéma simplifié illustrant les mécanismes de toxicité sur un organisme eucaryote en milieu d'eau douce provenant des nanoparticules : (1) Perturbation du fonctionnement des protéines provoqué par la production d'espèces oxydantes réactives (EOR) suite à la présence de nanoparticules; (2) Dommage chimique indirect à la membrane plasmique suite à la génération d'EOR; (3) Dénaturation de l'ADN; (4) Interaction des nanoparticules ainsi que de leur produit de dissolution avec différents organites de la cellule; (5) Dommage physique à la membrane plasmique par la forte adsorption de nanoparticules et de leur produit de dissolution, l'ion libre. Les nanoparticules peuvent être de taille variée et/ou avoir différents enrobages (illustré par un noyau noir et contour bleu). Pour fins de simplification, seul l'appareil de Golgi et les mitochondries ont été illustrés en tant qu'organites. Figure modifiée de Klaine et al. (2008)

La figure 1.1 illustre les 5 principaux mécanismes de toxicité relatifs aux nanoparticules. Tout d'abord, les espèces oxydantes réactives, EOR, peuvent être synthétisées de deux façons distinctes. D'un côté, elles peuvent être produites de manière régulière, à

1. Introduction

l'intérieur de la cellule, dans les mitochondries lors de la respiration cellulaire (Nel et al. 2006). Pendant les étapes de la réduction de l'oxygène en molécules d'eau, environ 1-2% sont converties en anion radical ($O_2^{\cdot-}$) (Turrens 1997). Ces EOR sont cependant neutralisées par des enzymes spécifiques (e.g. superoxyde dismutase, peroxidase et catalase) (Mallick and Mohn 2000) ou des composés non-enzymatiques tel que le glutathion (GSH). Le GSH est la forme réduite qui s'accapare d'un oxygène pour devenir la forme oxydée du glutathion (GSSG). Lors d'un stress oxydatif important, tel que l'internalisation ou l'adsorption de certains métaux toxiques ou nanoparticules, le rapport GSH/GSSG diminue et peut être dommageable pour l'organisme en raison de la grande quantité d'EOR qui ne peuvent être neutralisés (Nel et al. 2006). Cela peut, en conséquence, affecter la membrane, le noyau, les protéines, etc. D'un autre côté, ces EOR peuvent être produites par les nanoparticules photosensibles, telles que les TiO_2 et les fullerènes, qui réagissent au rayonnement UV en produisant les radicaux libres suivants : $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 et OH^{\cdot} (Brunet et al. 2009).

Les mécanismes **1)**, **2)** et **3)** de la figure 1.1 relatent les effets indirects des nanoparticules par l'entremise des EOR sur les protéines, membrane plasmique et le noyau respectivement. Les protéines, permettant le passage des ions et éléments nutritifs pour l'organisme, peuvent perdre leur fonctionnalité et être déformées lorsque les EOR s'attaquent aux acides aminés en formant des liaisons disulfures (Klaine et al. 2008). La membrane plasmique peut être affectée par la présence des radicaux libres qui peuvent oxyder les doubles liens chimiques se retrouvant sur les phospholipides qui composent la double couche membranaire des organismes eucaryotes. Ceci est appelé la peroxydation lipidique (Klaine et al. 2008). Finalement, les EOR peuvent jouer un rôle clé dans la dénaturation de l'ADN.

1. Introduction

Cependant, le mécanisme précis n'est pas encore clair aux yeux des scientifiques (Cabisco et al. 2000; Elsaesser and Howard 2012).

Le mécanisme **4)** montre que les nanoparticules ainsi que les ions métalliques, issu de la dissolution, peuvent être internalisés à travers la membrane plasmique par l'entremise de protéines, sites spécifiques aux ions libres d'intérêt et par les canaux ioniques (Navarro et al. 2008). Ces derniers peuvent ensuite se fixer et interagir avec les différents organites se trouvant à l'intérieur de l'organisme tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries et le noyau en interférant avec leurs processus métaboliques. Ce stress oxydatif va provoquer la formation d'espèces oxydantes réactives (EOR) et le gonflement de certains organites entre-autres (Navarro et al. 2008).

Finalement, le mécanisme **5)** évoque la possibilité que les nanoparticules ayant différentes tailles, formes et enrobages s'adsorbent sur l'organisme. Il a déjà été montré qu'une forte adsorption de nanoparticules peut en effet compromettre la morphologie de la cellule et de la membrane (Chen et al. 2012). Cela pourrait être expliqué par l'absence de lumière ainsi que de nutriments causée par cette couche « protectrice » de nanoparticules (Navarro et al. 2008). Les nanoparticules métalliques ayant des enrobages sont fortement dépendantes de la composition chimique de leur couche stabilisatrice. Très souvent, la présence d'un enrobage permet une stabilité accrue qui est symbolisée par une diminution de l'agrégation et donc une persistance plus importante en présence des organismes (Navarro et al. 2008).

1.2.2 Toxicité relative des nZnO

La toxicité reliée aux nanoparticules de ZnO sur les organismes marins et d'eaux douces peut être attribuée à deux phénomènes principalement : la dissolution et l'influence de

1. Introduction

paramètres environnementaux (Ma et al. 2013). La dissolution significative des nZnO leur procure une plus grande toxicité que d'autres oxydes métalliques tels que nTiO₂, nSiO₂ et nCuO, qui est surtout reliée à la libération du Zn²⁺ (Adams et al. 2006; Aruoja et al. 2009). En effet, dans les travaux de Miller et al. (2010), il a été possible d'observer une diminution significative de la croissance de quatre types de phytoplancton (*Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema marinoi*, *Dunaliella tertiolecta* et *Isochrysis galbana*) suite à une exposition à des nZnO ayant des concentrations variant de 1 à 1000 µg L⁻¹ dans un milieu salin. La diminution de croissance était attribuable à la forte présence de Zn²⁺ en raison de la dissolution rapide de nZnO atteignant 70% au bout de 12h. Selon les auteurs, le Zn²⁺ présent en forte concentration inhiberait l'internalisation du Mn, un autre élément essentiel, étant donné que les deux métaux possèdent le même site spécifique en plus de la formation d'espèces oxydantes réactives (EOR) suite à l'interaction entre le mélange nanoparticules/Zn²⁺ avec la surface de la cellule. Cependant il est difficile de démontrer la toxicité spécifique des nanoparticules de ZnO en raison de leur forte propension à la dissolution.

Une étude réalisée par Li et al. (2013) montre l'importance de la présence de différents cations et anions relativement à la toxicité des nZnO en présence d'*Escherichia coli* (*E.coli*). Effectivement, la présence de cations divalents tels que Ca²⁺ et Mg²⁺ a joué un rôle dans l'atténuation de la toxicité issue de la dissolution des nZnO. Les cations se trouvant dans la solution peuvent rentrer en compétition empêchant ainsi une trop grande quantité de Zn²⁺ de se lier aux sites spécifiques de la bactérie. Cependant, lors de l'utilisation d'anions tels que Cl⁻, NO₃⁻ et SO₄²⁻ en présence de nZnO, le phénomène inverse se produit. Leur présence augmente la force ionique de la solution et cela résulte à la formation de complexes labiles entre Zn²⁺ et

1. Introduction

les anions favorisant donc la dissolution des nZnO menant à la présence de zinc ionique (Zn^{2+}) qui est responsable de la toxicité.

1.3 Les interactions des nZnO avec les organismes d'eaux douces

1.3.1 L'importance du zinc et choix de l'organisme modèle étudié

Le Zn^{2+} , tout comme d'autres métaux indispensables (i.e. Fe, Cu etc.), est présent dans des mécanismes biologiques primordiaux des organismes des eaux naturelles. En ce sens, étant donné que le zinc fait partie de certains métalloenzymes comme c'est le cas avec l'enzyme anhydrase carbonique qui est impliqué dans l'acquisition du carbone inorganique et de sa transformation, ou encore l'enzyme adénylate kinase qui est responsable de l'homéostasie énergétique cellulaire (Gilles et al. 1994; Roberts et al. 1997). Le zinc est aussi impliqué dans la régulation génétique dans laquelle il joue un rôle dans la transcription des gènes et la duplication de l'ADN (Vallee and Auld 1990). Ainsi, une certaine partie du zinc libre retrouvé dans l'environnement provient directement de la transformation des nanoparticules, notamment la dissolution (sections 1.1.3 et 1.2.2). La théorie sur trois techniques de spéciation (utilisées dans l'article dans le Chapitre 2) se trouve aux sections 2.8.3; 2.8.5 et 3.3.

L'organisme modèle utilisé dans cette étude de la bioaccumulation ainsi que de la dissolution des nanoparticules de ZnO est l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. En premier lieu, cette algue est généralement utilisée dans les études toxicologiques et de bioaccumulation en raison de sa grande sensibilité à la présence de faibles concentrations de métaux (Lavoie 2010). De plus, ces algues nécessitent très peu d'entretien qui rend leur manipulation facile et rapide. Finalement, la raison principale de leur utilisation réside dans le fait que leur présence est très abondante étant donné qu'elles ont colonisé la majorité des plans

1. Introduction

d'eau sur la terre, étant à la base de la chaîne alimentaire. Ce sont donc des très bons indicateurs de bioaccumulation (Kola et al. 2004; Lavoie 2010).

1.3.2 Concepts de base des modèles d'équilibres

Dans les eaux douces, les métaux sont souvent complexés avec différents types de ligands. Ceux-ci peuvent être de nature inorganique (i.e. carbonates, sulfates, nitrates, etc.) et macromoléculaire (i.e. matière organique, polypeptides, polysaccharides, etc.). Ceux-ci vont avoir une influence sur la spéciation des métaux en solution. De plus, la compétition entre métaux, le pH et la concentration sont autant des facteurs qui peuvent influencer les réactions d'équilibres des métaux (Luoma 1983).

Ces derniers, avant d'être internalisés, devraient d'abord interagir avec la surface biologique par adsorption sur des sites spécifiques (S_s) et non-spécifiques (S_{ns}). Par la suite, il leur est possible de traverser la membrane plasmique constituant l'organisme. Cette internalisation se fait surtout par le transfert de métal à travers la membrane biologique par l'intermédiaire de ces sites spécifiques qui sont souvent des protéines et transporteurs de métaux traces.

Il existe des modèles de prédictions d'équilibres qui sont utilisés afin d'estimer la bioaccumulation, et donc la réponse biologique, d'un certain métal à partir de données existantes (i.e. pH, température, dureté de l'eau). Les modèles les plus utilisés sont le FIAM (provenant de l'anglais : *Free Ion Activity Model*) et le BLM (*Biotic Ligand Model*). Le FIAM se base sur le fait que la réponse biologique serait directement reliée à l'activité de l'ion libre du métal en question (en non pas sa concentration totale) (Morel and Hering 1993). Le BLM, qui a été élaboré à partir du FIAM, s'intéresse à la concentration des complexes métal- S_s afin

1. Introduction

d'en prédire l'effet biologique. L'utilisation des deux modèles implique qu'il y a un équilibre entre les sites situés à la surface de la membrane et le milieu environnant. Ces modèles décrivent l'interaction entre le métal et l'organisme en quatre étapes : (1) diffusion du l'ion métallique (M^{Z+}) et du complexe hydrophile (métal-ligand, ML) dans la solution; (2) dissociation/complexation avec le ligand en solution; (3) adsorption spécifique (M-S_s) et non-spécifique (M-S_{ns}) du métal sur la surface de l'organisme; (4) transport du métal d'intérêt dans l'organisme, caractérisé par une constante de flux d'internalisation (k_{int}), et la réaction avec un ligand intracellulaire qui provoque un effet biologique (Hassler et al. 2004b). Dans ce cas, le flux d'internalisation du métal (J_{int}) et l'effet biologique induit par le métal peuvent être reliés par l'adsorption spécifique du métal (M-S_s) à la surface de l'organisme par (Domingos et al. 2011):

$$J_{int} = k_{int} \{M-R_{cell}\} \quad (1.1)$$

Dans des conditions d'équilibre, une équation non-linéaire de type Michaelis-Menten est obtenue, qui respecte une cinétique de premier ordre:

$$J_{int} = \frac{J_{max}*[M^{Z+}]}{K_m + [M^{Z+}]} \quad (1.2)$$

où J_{max} correspond au flux d'internalisation maximal lorsque tous les sites sont saturés, $[M^{Z+}]$ est la concentration de l'ion libre d'intérêt en solution et K_m correspond à l'affinité d'un transporteur pour le métal d'intérêt.

L'équation 1.2 est valable uniquement dans le cas de figure où le métal d'intérêt est adsorbé sur des sites spécifiques (S_s). L'utilisation d'un complexant fort est donc nécessaire

1. Introduction

afin d'enlever tout métal adsorbé sur des sites non-spécifiques sur la membrane plasmique de l'organisme (Hassler et al. 2004a). Dans le cas de métaux divalents, tel que le Zn^{2+} , un complexant très utilisé à cette fin est l'EDTA (constante de stabilité $\log K = 17.94$) (Vercauteren and Blust 1996).

1.3.3 Mécanisme de bioaccumulation de nZnO

La figure 1.2 illustre les processus physico-chimiques d'adsorption et de dissolution des nanoparticules de ZnO et leur parcours dans la solution avant l'interaction et l'éventuelle bioaccumulation du zinc, par l'algue. Dans la solution, les nanoparticules peuvent être sous forme agglomérées dépendamment de leur milieu et de leur concentration initiale dans la solution. Il est important de noter que leur degré d'agglomération a un effet sur l'atteinte de l'équilibre dans la solution (nanoparticules non-agglomérées indiquée par un astérisque **rouge** et nanoparticules agglomérées indiquée par un astérisque **bleu** sur la figure 1.2) car la dissolution des nanoparticules est proportionnelle à l'aire de surface de la particule (Bian et al. 2011). Selon la même logique, les nanoparticules, avec leur produit de dissolution, traversent la solution et la couche de diffusion selon un coefficient de diffusion D_{ZnO} et D_{Zn} dans le cas de l'ion libre Zn^{2+} pour atteindre la paroi cellulaire de l'algue *C. reinhardtii*. Il faut mentionner que l'ion libre possède un flux de diffusion plus rapide de plusieurs ordres de grandeurs que celui de la nanoparticule, dépendamment de la taille, i.e. le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon hydrodynamique de la particule.

1. Introduction

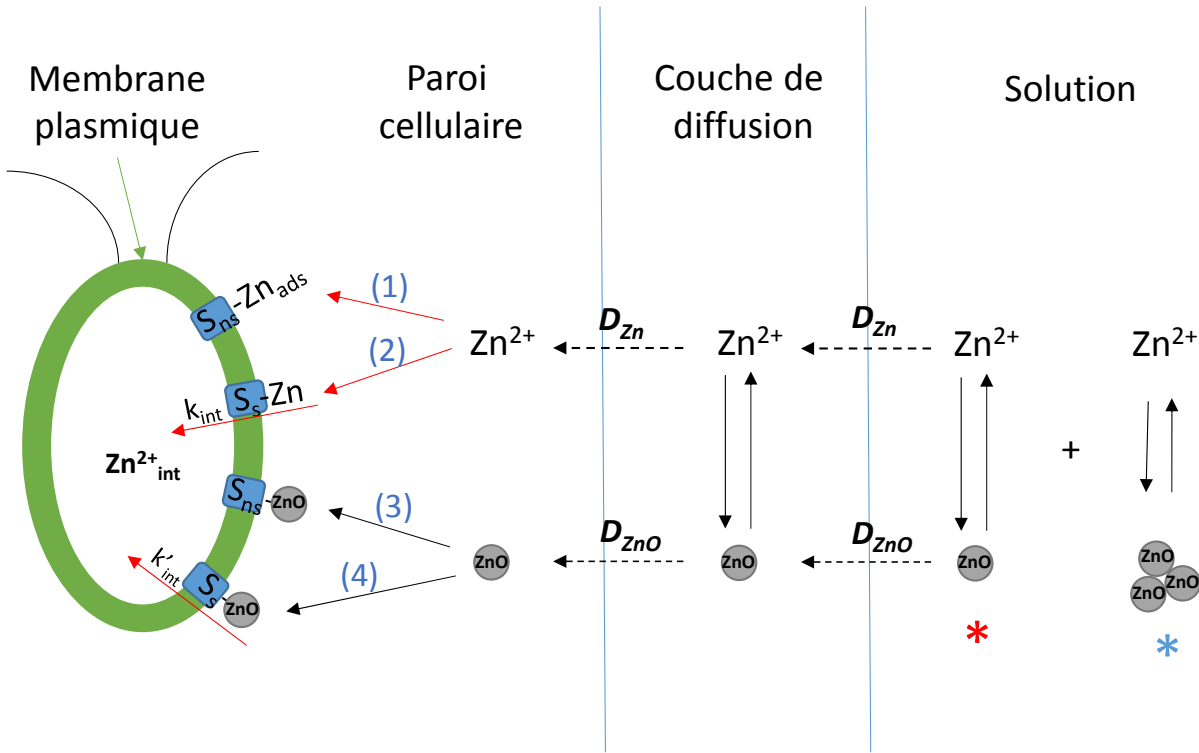


Figure 1.2 : Schématisation hypothétique du processus physicochimique menant à la bioaccumulation du Zn^{2+} dans l'algue *C. reinhardtii* à partir de nZnO en solution. L'équilibre entre les nanoparticules et le zinc libre est symbolisé par des flèches de longueurs variables influencés par le degré d'agglomération des nanoparticules (astérisque rouge pour nanoparticules non-agglomérées et astérisque bleu pour nanoparticules agglomérées). Des constantes de diffusion (D) sont également illustrées et elles diffèrent dépendamment s'il s'agit du Zn^{2+} ou de nZnO; D_{Zn} est le coefficient de diffusion du Zn^{2+} tandis que D_{ZnO} est celle de nZnO. Sur la membrane plasmique de l'algue, deux types de récepteurs sont postulées, i.e. les sites spécifiques (S_s) et non-spécifiques (S_{ns}) au Zn^{2+} . Les quatre mécanismes hypothétiques d'interactions suggérés entre le métal et l'organisme sont illustrés par les chiffres (1) à (4). Il y a l'adsorption entre Zn^{2+} et S_{ns} ; l'adsorption entre Zn^{2+} et S_s ; l'adsorption entre nZnO et S_{ns} et l'adsorption entre nZnO et S_s respectivement.

Selon ce modèle hypothétique, il y aurait 4 mécanismes plausibles pour la bioaccumulation, ou l'adsorption, de Zn^{2+} et/ou nZnO. Le premier mécanisme (1) de la figure 1.2 provient d'une adsorption entre le zinc ionique et un site non-spécifique (S_{ns}). Ce site est

1. Introduction

considéré comme physiologiquement inerte pour l'algue, c'est-à-dire que le métal peut s'y adsorber sans qu'aucune fonction cellulaire ne soit perturbée (Campbell et al. 2002). Lors de la bioaccumulation, ce Zn^{2+} peut être désorbé suite à un rinçage avec l'EDTA afin de ne pas inclure cette quantité comme faisant partie du métal internalisé (Hassler et al. 2004a). Dans le second mécanisme, indiqué par (2) à la figure 1.2, le zinc ionique peut s'adsorber sur un site spécifique (S_s) et être internalisé par la suite selon la constante d'internalisation, k_{int} . Ce dernier fait partie de la catégorie des sites physiologiquement actifs de l'algue. L'adsorption d'un métal peut dans ce cas affecter le métabolisme de la cellule (Campbell et al. 2002). Il faut préciser que cette internalisation est limitante par rapport à la diffusion du Zn^{2+} dans la solution (Hudson and Morel 1990). Dans le mécanisme (3) de la figure 1.2, les nanoparticules peuvent s'adsorber sur un site non-spécifique si ces dernières ne se dissolvent pas avant d'atteindre la membrane plasmique. L'internalisation des nanoparticules de nZnO n'a jamais été démontrée avec certitude, cependant une forte présence de nanoparticules adsorbées sur la paroi a été montrée comme pouvant compromettre la morphologie cellulaire ainsi que l'intégrité de la membrane (Chen et al. 2012). Finalement, le dernier mécanisme (4) de la figure 1.2 demeure le plus intéressant. En effet, il a été observé que certains éléments pouvaient avoir un effet sur la bioaccumulation du zinc, comme le phosphore (Yu and Wang 2004). Effectivement, ces auteurs ont démontré que la présence de phosphate en concomitance avec le Zn^{2+} pouvait accroître la bioaccumulation de ce dernier avec l'algue *C. reinhardtii*. Une étude par Santomauro et al. (2012) révèle que le zinc et le phosphore ont été accumulés ensemble dans l'algue *Scenedesmus obliquus* selon des ratios différents après avoir été exposé à plusieurs semaines à une solution de croissance contenant notamment du zinc et du phosphore. Donc, selon le mécanisme (4) de la figure 1.2, les nanoparticules adsorbées à un

1. Introduction

site spécifique de l'algue pourraient donc internaliser leur produit de dissolution, le Zn^{2+} , si en présence d'un composé qui pourrait le stimuler selon une constante d'internalisation k'_{int} différente de celle du mécanisme (1).

Les nanoparticules d'oxyde de zinc, ayant ou non un enrobage, subissent différentes transformations dans le milieu dans lequel ils se trouvent. Le zinc dissous provenant des nanoparticules peut donc former une variété de différents composés avec multiples ligands présents; il s'agit de la spéciation chimique. Afin de mieux évaluer la bioaccumulation des nanoparticules ainsi que leurs produits de dissolution en présence de l'algue *C. reinhardtii*, il s'avère donc nécessaire d'utiliser plusieurs techniques analytiques afin de distinguer le zinc total (Zn_T) du zinc dissous, Zn_L (complexes labiles et zinc libre Zn^{2+} qui peuvent être distingués) dans un milieu contrôlé (tampon $10^{-2}M$ HEPES, Ca^{2+} $10^{-5} M$).

1. Introduction

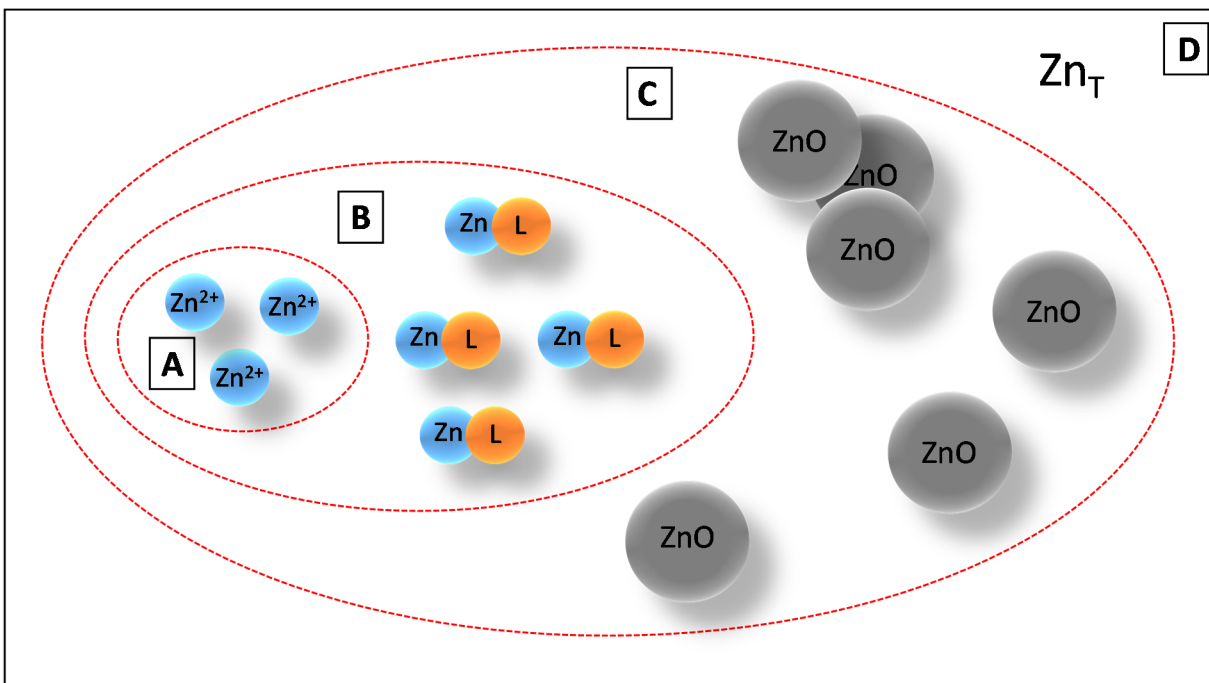


Figure 1.3 Schéma simplifié illustrant les différentes espèces chimiques du zinc réparties en 4 grandes catégories (A-D) qui peuvent être déterminées par différentes techniques analytiques ; (A) et (B) : Le zinc libre (Zn^{2+}) issu de la dissolution et les complexes zinc-ligand (ZnL) respectivement peuvent être distingués par la technique de décapage par chronopotentiométrie à balayage (*Scanned Stripping Chronopotentiometry, SSCP*); (C) : Les nanoparticules, agglomérées ou non, peuvent être détectées avec la technique de spectrométrie de masse – plasma à couplage inductif couplé à une résine échangeuse d’ions (*Resin-based Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, Resin-based ICP-MS*) et séparés du zinc dissous (B) par la technique d’ultrafiltration par centrifugation (*Centrifugal ultrafiltration, CU*); (D) : Les nanoparticules (C), le zinc dissous (B) qui inclut le zinc libre (A) peuvent être quantifiés sous formes de zinc total avec l’ICP-MS. Il est à noter que les grandes ovales incluent les petites.

Ces complexes labiles, c’est-à-dire facilement dissociables et associables, correspondent au sous-groupe (B) de la figure 1.3, qui inclut le sous-groupe (A) qui est le zinc libre (Zn^{2+}). La troisième forme du zinc demeure les nanoparticules, agglomérées ou non, qui

1. Introduction

correspond au sous-groupe (C). Finalement dans le groupe (D) qui inclut les sous-groupes (A-C) se trouve la somme de toutes ces espèces en solution; le zinc total (Zn_T).

Dans chacune d'entre elles, une technique spécifique peut être utilisée afin d'évaluer la dissolution. Dans les premiers sous-groupes (A et B) se trouvent respectivement le zinc libre (Zn^{2+}) et les différents complexes zinc-ligand (ZnL) qui peuvent être distingués avec la technique de décapage par chronopotentiométrie à balayage (*SSCP*). En résumé, cette méthode potentiométrique permet de différencier ces deux types de composé en mesurant le temps pour réoxyder le métal amalgamé sur une électrode de mercure en appliquant des potentiels d'oxydations (Voir la théorie dans la section 2.8.3 dans les informations supplémentaires de l'article). Dans le sous-groupe (C), 2 techniques permettent de séparer les nanoparticules du zinc dissous (Zn^{2+} et ZnL); l'ultrafiltration par centrifugation (*CU*) et l'ICP-MS couplé à la résine échangeuse d'ions (*Resin-based ICP-MS*). La première technique (*CU*) permet, grâce à la filtration des solutions à travers des pores de taille $\sim 1-2$ nm, de faire passer le zinc dissous et les très petits complexes et ainsi empêcher le passage des nanoparticules et autres complexes plus gros. La seconde technique (*Resin-based ICP-MS*) permet, grâce au couplage d'une résine échangeuse d'ions, la détermination de $nZnO$ par l'ICP-MS car le zinc dissous est capté par la résine lors de son passage et non les nanoparticules. Cela permet ainsi la détermination du zinc dissous par différence entre le zinc total et les nanoparticules (Voir la théorie sur la résine à la section 2.8.5 des informations supplémentaires de l'article). Finalement, dans le groupe (D) qui rassemble les sous-groupes (A-C) correspond au zinc total (Zn_T) qui est en fait la somme du zinc dissous, complexes et nanoparticules de zinc. La technique qui permet une analyse totale sans distinguer les différentes formes est l'ICP-MS.

1. Introduction

1.4 Les objectifs de l'étude

Dans cette étude, le but était d'évaluer l'importance et l'influence de la présence d'enrobages sur les nanoparticules de zinc (nZnO) sur la bioaccumulation dans l'algue unicellulaire *C. reinhardtii*. De plus, la spéciation a été étudiée dans le but d'élucider le comportement de ces matériaux dans les milieux aqueux.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

Ce chapitre est constitué d'un manuscrit ainsi que ses informations supplémentaires, qui est sous presse dans le journal *Science of the Total Environment* ([dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.094](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.094)).

Je, **Vladimir Merdzan**, suis responsable de la majorité de tous les résultats présentés dans cet article ainsi que de sa rédaction. Il a été réalisé en étroite collaboration avec mon directeur de recherche, **Kevin J. Wilkinson**.

Les co-auteurs **Rute F. Domingos** et **Carlos E. Monteiro** m'ont encadré dans l'utilisation de la technique de décapage par chronopotentiométrie à balayage (*Scanned Stripping Chronopotentiometry, SSCP*) lors d'un stage au Portugal.

Le co-auteur **Madjid Hadioui** m'a introduit à une technique avant-gardiste, soit la spectrométrie de masse - plasma à couplage inductif couplé à une résine échangeuse d'ions (*Resin-based inductively coupled plasma - mass spectrometry, Resin-based ICP-MS*).

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

The effects of different coatings on zinc oxide nanoparticles and their influence on dissolution and bioaccumulation by the green alga, *C.*

reinhardtii

Vladimir Merdzan^a, Rute F. Domingos^b, Carlos E. Monteiro^b, Madjid Hadioui^a, Kevin J.

Wilkinson^{a,*}

^a Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

^b Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico/Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais # 1, 1049-001 Lisbon, Portugal

* Corresponding author

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.1 Abstract

Determining the environmental risk of nanoparticles (NPs) requires an in-depth understanding of the NP core, the particle surface coatings and the interactions of the two with environmental matrices. Non-coated ZnO NPs (nZnO) are known to release ionic Zn, contributing directly to the toxicity of these particles. On the other hand, relatively less data are available for particles that have coatings designed to increase particle stability. In this study, *Chlamydomonas reinhardtii* was exposed to either a soluble Zn salt or nZnO with different stabilizers (i.e; coatings): (i) bare nZnO, (ii) polyacrylic acid-stabilized, nZnO-PAA, or a (iii) sodium hexametaphosphate-stabilized, nZnO-HMP. Multiple techniques were used to quantify particle agglomeration and dissolution. The dissolution of the NPs depended on the stabilizer, with the largest dissolution obtained for the bare nZnO (near total dissolution), followed by the nZnO-PAA. When exposed to the bare and PAA-stabilized nZnOs, bioaccumulation was largely accounted for by free Zn. On the other hand, the bioaccumulation of nZnO-HMP was greater than could be attributed to the release of free Zn from the particles. The increased Zn bioaccumulation was hypothesized to have resulted from the biological stimulation of *C. reinhardtii* due to phosphate from the particle coating.

KEYWORDS

nanoparticles; ZnO; particle coatings; dissolution; agglomeration; bioaccumulation

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.2 Introduction

The nanotechnology breakthrough has resulted in a large number of highly reactive and physicochemically dynamic nanoparticles (NPs) with exceptional features and functions. Largely due to their high reactivity, the fears and uncertainties concerning the environmental impacts of these materials has also grown. ZnO NPs (nZnO) represent the NP with the third highest annual production volume (550 tons per year), only surpassed by nano SiO₂ and nano TiO₂ (5500 and 3000 tons per year, respectively) (Piccinno et al. 2012). This large production volume is due to their use in a wide range of applications, including cosmetic products such as sunscreen and toothpastes, dye-sensitized solar cells, sensors, coatings and optoelectronics (Wang 2004). While a considerable amount of data are available on the potential hazards of nZnO, clear relationships have not been established between the exposure of its different forms (e.g. dissolution products, aggregates, nZnO with different surface coatings, etc.) and specific toxicological effects. NPs, and especially nZnO, are highly reactive in the environment, with numerous chemical and physical kinetic transformations that greatly influence their fate, transport and bioavailability. One critical transformation of nZnO is its dissolution, which can result in both free Zn (Zn²⁺) and Zn complexes. In fact, numerous studies using organisms of different taxa (including nematodes, crustaceans, alga and bacteria) have ascribed the toxicity of nZnO to particle dissolution rather than effects of the NPs per se (Franklin et al. 2007; Heinlaan et al. 2008; Ma et al. 2009). On the other hand, several studies have indicated that ionic Zn and nZnO have different modes of action (see references in the review (Ma et al. 2013)). Overall, the only consensus emerging from the past 10 years of research is that nZnO toxicity is not only highly dependent on the biological test species and the test methods but also on the physicochemical nature of the particles.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

It is not straightforward to quantify the transformations of nZnO. Particle size and interactions of the NP with ions, small organic ligands or humic substances can have significant impact on agglomeration and dissolution (Bian et al. 2011; Domingos et al. 2013b; Lv et al. 2012; Mudunkotuwa et al. 2012). Furthermore, the particle surface chemistry, as influenced by the presence of coatings, can play an important role in particle fate (Misra et al. 2012). The stabilizers improve the mobility of the NP by protecting their surfaces from unwanted reactions and by reducing inter-particle aggregation due to increased charge repulsion and/or steric effects. Some stabilizers may also serve as a diffusion-controlled release carrier (Pomogailo and Kestelman 2005). The stabilizer is thus a barrier between the NP and the environmental matrix in which it is immersed and is thus one of the critical factors determining particle bioavailability. Nonetheless, studies on the effects of functionalized nZnO are scarce. Yin *et al.* (Yin et al. 2010) found that uncoated nZnO produced reactive oxygen species (ROS) and diminished the viability of human lymphoblastoid cells, whereas nZnO coated with oleic acid (OA), poly(methacrylic acid) (PMMA), or components adsorbed from the cell culture medium (medium-soaked) showed reduced ROS production and cytotoxicity. In contrast, PMMA-coated nZnO had significant genotoxicity compared to uncoated or alternatively coated NPs (Leung et al. 2012). Leung et al. also found that the effects of NP surface modifications were not straightforward with different stabilizers having different effects on the release of ionic Zn and the production of ROS. In that paper, no correlation was found between the antibacterial activity and either the ROS levels or the levels of ionic Zn. In fact, these authors showed that some surface-modified nZnO samples released significantly lower ionic Zn, while at the same time exhibiting improved antibacterial activity.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

In this paper, three nZnO with contrasting surface chemistries were investigated: bare nZnO, polyacrylic acid coated (nZnO-PAA) and sodium hexametaphosphate coated (nZnO-HMP). Our hypothesis was that bioaccumulation would depend solely on free ion concentrations, irrespective of the particle type. A comprehensive characterization of the size, composition and surface chemistry of the nZnO was performed in order to better understand the importance of surface coatings on the bioavailability (uptake) of nZnO to the freshwater alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. NP size characterization was performed with several state-of-the-art analytical techniques including: transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and analytical ultracentrifugation (AUC) (Domingos et al. 2009). Particle dissolution was quantified by centrifugal ultrafiltration and a resin-based inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS) technique. Further insights into particle dissolution and the role of particle surface chemistry on the speciation of Zn in the exposure medium were obtained using scanned stripping chronopotentiometry (SSCP).

2.3 Materials and methods

2.3.1 Materials

Bare nZnO (powder) and nZnO-HMP (~ 145.2 g/L total zinc) were obtained from NanoStructured and Amorphous Material, Inc. (Houston, TX, USA), whereas nZnO-PAA (~ 165 mg/L total zinc) was obtained from Vive Nano (Toronto, Canada). According to the manufacturers' data, the nominal sizes of the particles were: nZnO: 20 nm; nZnO-PAA: <20 nm and nZnO-HMP: 40 nm.

All solutions were prepared in ultrapure water from a MilliQ Integral 3 (resistivity > 18 M Ω cm). The Zn stock solution was prepared from dilution of the Zn standard solution (1000

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

mg/L TraceCERT grade, Fluka), and the NaNO_3 used to adjust the ionic strength solution was prepared from an ultrapure salt (Merck, Suprapur). The media pH was controlled by using HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, Sigma). HNO_3 (Merck, Trace select ultra) and NaOH (SigmaUltra, minimum 98 %) were used to adjust the pH, which was measured using a Denver Instrument (model 15) and a Radiometer analytical combination pH electrode, calibrated with standard NBS buffers.

2.3.2 nZnO dissolution

2.3.2.1. Scanned stripping chronopotentiometry (SSCP)

The SSCP (Domingos et al. 2007; Domingos et al. 2008; Pinheiro and van Leeuwen 2004) technique is described in the Supplementary material. An EcoChemie Autolab potentiostat/galvanostat PGSTAT 10 (Metrohm Autolab B.V.; Utrecht, Netherlands) was used in conjunction with a Metrohm 663VA stand (Metrohm) and a personal computer that used the GPES 4.9 software (EcoChemie). A Ag/AgCl reference electrode with a 0.1 M NaNO_3 salt bridge, a glassy carbon counter electrode and a thin mercury film electrode (TMFE, working electrode), plated onto a rotating glassy carbon disc (1.9 mm diameter, Metrohm), were employed to quantify Zn. All nZnO containing exposure solutions were purged with nitrogen for 20 min prior to measurements and all measurements were carried out at room temperature. The potential was held at the deposition potential (E_d) for the duration of the deposition time (t_d , 45 s), during which Zn accumulated on the working electrode. After the accumulation step, an oxidizing stripping current (I_s) of 5×10^{-6} A, corresponding to conditions approaching complete depletion, was applied in quiescent solution until the potential reached a value that was beyond the transition plateau (-0.6 V). The SSCP waves were constructed from a series of measurements made over a range of deposition potentials (E_d : -1.250 to -1.075 V). The raw

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

signal is a measurement of the variation of potential with time that is automatically converted into the dt/dE vs. E format. Each SSCP experiment included a calibration plot of 1×10^{-6} M Zn that was measured at low pH (< 4) designed to avoid Zn losses to the polystyrene container walls. Dissolved Zn was calculated by using the limiting analytical signal (see Supplementary material, Fig. S3). The results are the means and standard deviations of at least three replicates, performed on different days, using freshly prepared samples of nZnO dispersed into the exposure solutions.

2.3.2.2 Centrifugal ultrafiltration (CU)

Centrifugal filter units (Amicon ultra, 3 kDa molar mass cutoff) were used to separate dissolved zinc (and its soluble complexes) from nanoparticulate zinc. Four mL of nZnO-containing exposure solutions were centrifuged for 20 min at $3700 \times g$. The filtrate that was collected after the first centrifugation cycle was analyzed by ICP-MS, since there were no further losses of zinc in the subsequent cycles (Fig. S4).

2.3.2.3 Resin-based ICP-MS

Solutions were also analyzed for dissolved Zn by using ICP-MS to determine the concentration of Zn before and after passage through an on-line ion-exchange resin: Dowex 50W-X8 (50-100 mesh, exchange capacity of 5.1 ± 1 meq/g, Sigma; Fig. S5). Since the resin binds the ionic metals but does not retain the NPs (Hadioui et al. 2013), the dissolved concentration was taken as the difference between the two measurements.

2.3.3 nZnO size characterization

2.3.3.1 Transmission electron microscopy (TEM)

A droplet of nZnO with a total Zn concentration of 5.0 mg L^{-1} (in Milli-Q water) was deposited on a Cu holey electron microscopy grid (Electron Microscopy Sciences) and left to

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

dry under indirect laminar flow for 24 h. The sample was imaged by TEM (JEOL; model JEM-2100F operated at 200kV) and particle diameters were determined using the *ImageJ* program by counting 50-70 particles.

2.3.3.2 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Particle sizes and size distributions of the nZnO dispersed in the exposure medium were measured using a NanoSight NTA 2.0 LM14 with a laser output of 75 mW at 532 nm. Mean square displacements of single particles in two dimensions were determined by tracking their scattered light using the NanoSight analysis software. Results are presented as a cumulant analysis of triplicate runs of 90 sec. videos performed after a 24 h equilibration of the nZnOs. In each run, a new sample aliquot was injected and a new measurement was performed (total of 3 measurements for each of the 3 aliquots). Quality control was ensured by using 0.1 mg L⁻¹ of a polystyrene standard in MilliQ water with a known diameter of 80.9 nm (Bangs Laboratories Inc.).

2.3.3.3 Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

The FCS technique has been briefly described in the Supplementary material and in greater detail elsewhere (Elson and Magde 1974; Widengren et al. 1995; Starchev et al. 2000). A Leica TCS SP5 laser scanning microscope (Leica Microsystems Inc.) was employed, using an argon ion laser for fluorescence excitation (488 nm) and an avalanche photodiode detector for fluorescence intensity fluctuation determinations. Diffusion times of the nZnO dispersed in the exposure medium were measured and interpreted using an instrument defined autocorrelation function (ISS Vista FCS software, version 3.6 RC Build 3637). Diffusion coefficients (*D*) were determined by calibrating the size and shape of the confocal volume with rhodamine 110, which has a known *D* of $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Gendron et al. 2008). Diffusion

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

times were determined for nZnO that were labelled by the adsorption of a small quantity (1×10^{-8} M) of rhodamine 6G. Hydrodynamic diameters (d_H) of the nZnOs (or their aggregates) were calculated from the Stokes–Einstein equation:

$$d_H = k_B T / 3\pi\eta D \quad (2.1)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature and η is the solution given viscosity. Results correspond to the mean and standard deviation of at least three replicates performed on different days, using freshly prepared samples. Each individual replicate resulted from at least 10 measurements.

2.3.3.4 Analytical ultracentrifuge (AUC)

AUC (Planken and Colfen 2010) sedimentation profiles were obtained by ultracentrifuging (*ca.* 89 000×g) nZnO that was dispersed in the exposure medium at concentrations of 1000 and 5000 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$. Data collected using an interference detector was analyzed by the SEDFIT program (version 14.1). Conversion of sedimentation coefficient distributions to a (spherical) particle size distribution was performed using Stokes' Law and an estimated particle density of 5.605 g cm^{-3} .

2.3.4 Electrophoretic mobility measurements (EPM)

EPM were measured for nZnO dispersions using total Zn concentrations of 117 and 653 $\mu\text{g L}^{-1}$ for pH 3.0-8.0 and ionic strengths of 0.01 M. EPM measurements were carried out using a Malvern Zetasizer nanoZS using disposable polystyrene cuvettes (Malvern, DTS1061, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) at 20 °C. The performance of the instrument was systematically verified (every five samples) using a zeta potential standard solution (Malvern, DTS1232). The pH at the zero point of charge (pH_{zpc}) was determined from at least three replicates, performed on different days, using freshly prepared samples. Each individual

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

replicate resulted from at least five measurements.

2.3.5 Algal growth and Exposure media

The unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* (wild type C137), employed in this study is a model organism that is amenable to genetic, biochemical, and reverse genetic manipulation and whose genome has been completely sequenced (Merchant et al. 2007). *C. reinhardtii* was grown on a tris-acetate-phosphate (TAP) agar plate and then transferred into a diluted (4×) TAP media (dTAP) (Kola and Wilkinson 2005). Cells were grown in an incubation chamber (Infors HT Multitron) at 20 °C, under a 12 h:12 h light:dark regime, fluorescent lighting (80 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and rotary shaking (100 rpm) until they attained mid-log exponential growth (cell density $1\text{-}3 \times 10^6$ cells mL^{-1}). Cells were then diluted to 10^5 cells mL^{-1} in a fresh dTAP solution, grown again to mid-exponential growth and harvested by centrifugation (3700 $\times g$; 10 min). The cell pellet was washed with a metal-free exposure medium (0.01 M HEPES, $I = 0.01$ M; pH = 7.0) and once again centrifuged before being added to the exposure media for the bioaccumulation experiments. All dTAP growth solutions and exposure media, as well as micropipette tips, were autoclaved prior to use. Flasks borders were flame sterilized and algal cultures were manipulated under laminar flow and near a flame. Polycarbonate flasks and vessels were acid washed to reduce metal contamination.

2.3.6 Bioaccumulation experiments

Bioaccumulation experiments were performed using a final algal specific surface area of $1 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$, corresponding to a cell density of $2\text{-}3 \times 10^5$ cells mL^{-1} . Cell densities, sizes and surface distributions were measured using a Coulter Multisizer 3 particle counter (50 μm orifice, Coulter Electronics).

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

Exposure media were composed of 0.01 M HEPES and 10^{-5} M of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), adjusted to pH 7.0. Bioaccumulation experiments were performed by adding either the soluble Zn salt or the nZnO to the exposure medium in order to obtain a total Zn concentration of $42 - 1350 \mu\text{g L}^{-1}$ (6.4×10^{-7} M – 2.0×10^{-5} M). A second bioaccumulation experiment was performed by adding various concentrations of sodium phosphate dibasic (SigmaUltra, minimum 99%) ranging from 8.4×10^{-8} M to 7.5×10^{-4} M (nominal concentrations) to a constant zinc salt concentration of $55.6 \mu\text{g L}^{-1}$ (8.4×10^{-7} M). All exposure solutions, including controls, were prepared 24 h prior to the experiment and equilibrated on a shaker (100 rpm). Control media were prepared in exactly the same manner as the solutions containing Zn or nZnO in order to account for potential Zn contamination. Bioaccumulation experiments were performed in 300 – 600 mL of experimental solution in polycarbonate Erlenmeyer flasks by exposing the algae for 2 h, decreasing the likelihood of a significant medium modification due to complexation by algal exudates or metal depletion (Kola et al. 2004). Preliminary experiments showed that uptake was linear over this short time period (Fig. S1). At the end of the 2 h exposure, metal uptake was stopped by filtering 30 mL of sample through nitrocellulose filters (3.0 μm nitrocellulose; Millipore) followed by the addition of 20 mL of 0.01 M EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid; Sigma) prepared in HEPES buffer at pH 7.0 (Fig. S2) (Hassler et al. 2004a). Cellular Zn concentrations were determined on the filtered, washed algae following their digestion with HNO_3 . A small aliquot of each of the exposure solutions was sampled prior to the addition of algae in order to quantify total zinc concentrations. Zinc was also quantified in the filtrates that were collected after the addition of EDTA. Total, cellular and filtered Zn concentrations were quantified by ICP-MS (PerkinElmer NEXion 300 \times) and data were rejected when mass balances were outside

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

100±10 %. In order to evaluate biological and analytical variability, biouptake experiments were performed in triplicate on three different days with freshly prepared samples and algal cultures.

2.4 Results and discussion

2.4.1 Characterization of nZnO

2.4.1.1 nZnO agglomeration

Significant attention was given to NP characterization, including multiple measurements of size and dissolution, in order to clearly relate the physicochemical properties of the nZnO to its bioaccumulation. TEM, FCS, AUC and NTA were used for NP size determinations (Tables II.1-II.3). The use of multiple techniques is essential since the physicochemical principles of the techniques and the acquired measurements are different and each technique has its own advantages and limitations (Domingos et al. 2009). For example, only the bare nZnO and the nZnO-HMP were observed by TEM (Tables II.1 and II.3 and Fig. S6). The small nominal size of the nZnO-PAA (*ca.* <20 nm), and its thick organic shell, are at least partly to blame for this difficulty (Fig. S6C). Since energy dispersive spectroscopy revealed the presence of Zn over the entire TEM grid, it is likely that the nZnO-PAA were largely dissolved or that the Zn was complexed by the PAA particle coating. For the bare nZnO, individual particles dominated the micrographs (Fig. S6A) with an average diameter of (23.2 ± 7.1) nm that was in good agreement with the size provided by the manufacturer (20 nm). Numerous aggregates of different shapes and sizes were observed for the nZnO-HMP (Fig. S6B), resulting in an average size of (225 ± 139) nm, which was much higher than the diameter provided by the manufacturer (40 nm). It is important to note that TEM micrographs were acquired using a higher concentration, $5000 \mu\text{g Zn L}^{-1}$, than what was used for the uptake

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

experiments. In addition, nZnO were dispersed in MilliQ water in order to avoid artifacts related to the contributions of salts that would unavoidably appear during the air-drying step of the grid preparation (Domingos et al. 2009). Both the difference in particle concentration and the difference in medium may thus have influenced the particle size distributions.

FCS is a near single particle detection technique that provides a weight average diffusion coefficient (D_w) under conditions where several fluorescent labels are bound to each NP (as in this study) (Domingos et al. 2009). For suspensions containing 50 to 1200 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ of the NPs, FCS gave weight average diameters that were slightly larger than the nominal sizes provided by the manufacturers (Tables II.1-II.3). Average diameters for the bare nZnO were between *ca.* 38 and 61 nm (Table II.1) depending upon concentration, whereas the nZnO-PAA size ranged from *ca.* 27-34 nm (Table II.2) and the nZnO-HMP ranged from 35-55 nm (Table II.3).

In AUC, particle size distributions were obtained from sedimentation coefficient distributions (Tables II.1-II.3). For 1000 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ of the bare nZnO dispersed in the exposure solution, three peaks were obtained, corresponding to diameters of 51, 67 and 90 nm, consistent with the size range obtained by FCS (*ca.* 32-90 nm) for 1200 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ (Table II.1). Similar results were observed for each of the coated NPs: peaks of 32, 52, 71 and 93 nm were observed for the nZnO-PAA (Table II.2) and peaks of 38, 50, 66 and 99 nm seen for the nZnO-HMP (Table II.3). While the sizes of the nZnO-HMP obtained by AUC were in good agreement with the FCS observations (30-80 nm), FCS indicated a slightly smaller and more monodisperse nZnO-PAA (23-31 nm) than did the AUC.

Particle scattering was insufficient to provide a sufficient analytical signal for nanoparticle tracking analysis (NTA) at the concentrations of the bioaccumulation

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

experiments. However, for 5000 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$, particle sizes were similar for all three nZnOs with similar polydispersities as observed for the AUC: bare nZnO: mean 104 nm, mode 85 nm (Table II.1); nZnO-PAA: mean 96 nm, mode 90 nm (Table II.2); and nZnO-HMP: mean 84 nm, mode 35 nm (Table II.3).

Table II.1. Measured sizes of the bare nZnO (the manufacturer, NanoAmor, provides a size of 20 nm for these particles). The pH_{zpc} is between 6.6 and 8.0 as measured by Domingos et al. (Domingos et al. 2013b).

Technique	Medium	pH	$[\text{Zn}]_{\text{T}} / \mu\text{g L}^{-1}$	d / nm	Comments
TEM	MilliQ water	6.0 – 7.0	5000	23 ± 7	Number average diameter; $N = 70$; mode = 20 nm
FCS	10^{-2} M HEPES	7.0	50	49 ± 19	Weight average diameter
			300	38 ± 10	
			700	53 ± 11	
			1200	61 ± 29	
			2600	110 ± 25	
AUC	10^{-2} M HEPES	7.0	1000	51 ± 5 67 ± 4 90 ± 8	Size related to sedimentation coefficient
			5000	64 ± 5 90 ± 10	
NTA	10^{-2} M HEPES	7.0	5000	104 ± 57	Number average diameter; mode = 85 nm
			10000	90 ± 37	Number average diameter; mode = 75 nm

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

Table II.2. Measured sizes of the nZnO-PAA (the manufacturer, Vive Crop Protection (formerly Vive Nano), provides a size of < 20 nm for these particles). ND: not detectable. For the FCS, AUC and NTA, it is not possible to distinguish unambiguously between the particle core and the particle (PAA) shell. The pH_{zpc} is between 2.8 and 3.1.

Technique	Medium	pH	[Zn] _T / $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>d</i> /nm	Comments
TEM	MilliQ H ₂ O	6.0 – 7.0	5000	ND	No particles observed
FCS	10 ⁻² M HEPES	7.0	50	30 ± 5	Weight average diameter
			300	34 ± 3	
			700	29 ± 8	
			1200	28 ± 4	
			2600	66 ± 14	
AUC	10 ⁻² M HEPES	7.0	1000	32 ± 3	Size related to sedimentation coefficient providing high resolution size separation
				52 ± 3	
			5000	71 ± 4	
				93 ± 9	
NTA	10 ⁻² M HEPES	7.0	5000	96 ± 51	Number average diameter; mode = 90 nm
			10000	135 ± 88	Number average diameter; mode = 125 nm

Table II.3. Measured sizes of the nZnO-HMP (the manufacturer, NanoAmor, provides a size of 40 nm for these particles). The pH_{zpc} is between 2.0 and 3.5.

Technique	Medium	pH	[Zn] _T / $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>d</i> /nm	Comments
TEM	MilliQ H ₂ O	6.0 – 7.0	5000	225 ± 139	Number average diameter; <i>N</i> = 54; mode = 150 nm
FCS	10 ⁻² M HEPES	7.0	50	36 ± 6	Weight average diameter
			300	35 ± 3	
			700	48 ± 15	
			1200	55 ± 25	
			2600	197 ± 19	
AUC	10 ⁻² M HEPES	7.0	1000	38 ± 4	Size related to sedimentation coefficient
				51 ± 3	
			5000	66 ± 6	
				99 ± 12	
NTA	10 ⁻² M HEPES	7.0	5000	84 ± 48	Number average diameter; mode = 35 nm
			10000	96 ± 66	Number average diameter; mode = 45 nm

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.4.1.2. *nZnO dissolution*

In addition to agglomeration, dissolution can be occurring concurrently in the *nZnO* suspensions. Centrifugal ultrafiltration, ICP-MS coupled to an ion exchange resin and SSCP were used to quantify dissolution. As for the agglomeration measurements, each technique measured a slightly different fraction of Zn. The effective separation of the NPs from the dissolved species can be challenging, especially when using stabilizers with a complexing capacity for the metal of interest. For example, when using centrifugal ultrafiltration, the Zn concentration in the filtrate will correspond to free Zn (Zn^{2+}) plus all of the small Zn complexes that have sizes below that of the membrane pores, i.e. 1-2 nm. When the ion-exchange resin is coupled to the ICP-MS, only *nZnO* is likely measured by the ICP-MS, allowing determination (by difference) of the cationic species. SSCP is ideal for determinations of metal binding, providing a value for both the total dissolved and free Zn.

The **bare *nZnO*** showed nearly complete dissolution for all studied concentrations (Fig. 2.1A) and with all analytical techniques. In contrast, for the ***nZnO-PAA***, SSCP showed a clear decrease of the proportion of both dissolved and free Zn with increasing particle concentrations (Fig. 2.1B). For the *nZnO-PAA*, almost no free Zn was quantified at the highest particle concentrations (Fig. 2.1B). In addition, SSCP $E_{d,1/2}$ values were more negative than those obtained for the bare *nZnO* (approximately 15 to 25 mV; Fig. S3) and a function of the *nZnO* concentration, strongly suggesting that the carboxylic functional groups of the PAA were binding the solubilized Zn. At the low metal: COO^- ratios, the majority of the Zn was bound to the PAA functional groups, a result that was similar to that found for CdTe/CdS quantum dots stabilized by the same PAA coating (Domingos et al. 2013a). Free Zn concentrations measured by SSCP were highly consistent with results obtained by

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

ultrafiltration (Fig. 2.1B), indicating that the Zn-PAA complexes did not get through the 3 kDa filters. When the ion-exchange resin was coupled to the ICP-MS, only a small proportion of nZnO was determined, reinforcing the contention that most of the Zn was found as Zn-PAA complexes, rather than free Zn or ZnO NPs.

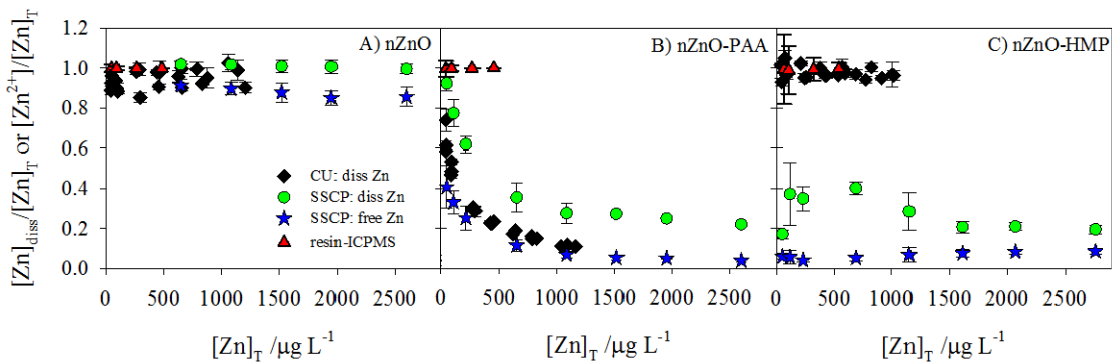


Figure 2.1 Concentration ratios of dissolved or free Zn to total Zn as a function of total Zn concentrations (i.e. nZnO concentrations) as determined by centrifugal ultrafiltration (\blacklozenge), SSCP (\bullet for dissolved Zn, and \star for free Zn), and resin-based ICP-MS (\blacktriangle), for (A) bare nZnO; (B) nZnO-PAA and (C) nZnO-HMP dispersed in the exposure medium (10^{-2} M HEPES, 10^{-5} Ca, $I = 0.01$ M, pH 7.0). Measurements were made following 24 h of sample equilibration.

For the **nZnO-HMP**, results from both the ultrafiltration and the resin-based ICP-MS indicated a particle dissolution of about 90%, whereas SSCP indicated a dissolution of ca. 40% (Fig. 2.1C). SSCP indicated that nearly all of the solubilized Zn was complexed by the phosphate groups of the HMP (ca. 5 % of the dissolved Zn was Zn^{2+} ; $\Delta E_{d,1/2} = -5$ to -15 mV; Fig. S3). Hexametaphosphate consists of six phosphate anions, which are linked to each other to form a ring-like structure. It is a well-known dispersant that is added in order to decrease particle agglomeration (Bagkar et al. 2004; Parab et al. 2011). The bulky nature of the HMP is

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

thought to facilitate the stabilization of metal oxide particles due to a steric hindrance (Warad et al. 2005). Under conditions favoring the dissolution of the particles, it is likely that the ionic Zn that is produced would be complexed by the phosphate groups of the HMP. This would result in a both decrease in the amount of free HMP^- available at the particle surface and to the presence of Zn-HMP in the filtrate, when analyzed by centrifugal ultrafiltration. Indeed, Fourier transform infrared spectroscopy of the filtrate indicated the presence of absorption bands that were characteristic of $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ complexes (Li et al. 2011; He et al. 2009) (Fig. S7). The results confirm that the Zn-phosphate complexes can pass through the filters, indicating that the dissolved Zn that was measured in the filtrate corresponded to both free Zn and small Zn (phosphate) complexes. In this context, it is difficult to explain the observed differences between the results obtained by SSCP (dissolved: 17-40%) and ultrafiltration (dissolved: 92 to 100%). While polyphosphates can be reduced at the mercury electrode surface at potentials more positive than -0.6 V, desorption should occur at potentials more negative than -0.6 V (Vetterl and Boháček 1968). Indeed, for the range of negative potentials used here (-1.250 to -1.075 V), HMP had no effect on either Zn amalgamation or the value of the reduction potential (Fig. S8). On the other hand, the centrifugation process itself did not appear to increase dissolution; SSCP performed on several dispersions of centrifuged nZnO-HMP showed no increase in dissolved or free Zn with respect to non-centrifuged dispersions (data not shown).

2.4.2 Biouptake of the nZnO

In the biouptake experiments, *C. reinhardtii* was exposed for 2 hours to a wide range of stabilized nZnO concentrations (42 – 1350 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$) in a buffered HEPES medium (pH

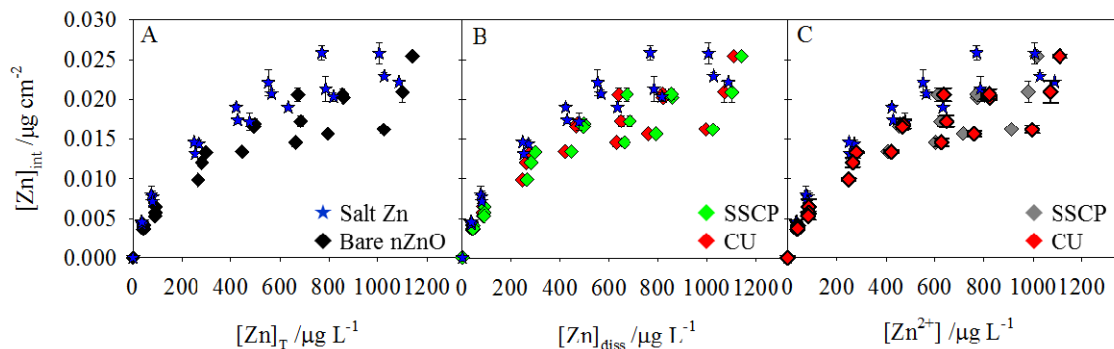
2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

7.0). As shown above, the variation in the nZnO exposure concentration also had the effect of varying the ratio of dissolved to nanoparticulate Zn, especially for nZnO-PAA.

2.4.2.1 Bare nZnO

When the non-functionalized nZnO was suspended in the exposure medium, it was mainly found in dissolved forms and, to a large extent (>85%), as free ion (Fig. 2.1A). Indeed, virtually no complexation of the dissolved Zn was observed (Fig. S3). Furthermore, relatively few NPs were found in addition to small nZnO agglomerates consisting of a few primary particles.

A slightly lower Zn biouptake was obtained for exposure solutions that contained the bare nZnO when compared with solutions containing the soluble Zn salt (Fig. 2.2). The slightly decreased bioaccumulation can be attributed to the reduced bioavailability of nZnO or its agglomerates. Nonetheless, given the large proportion of dissolved Zn (primarily Zn^{2+}) produced by the bare nZnO, it is not surprising that similar results were observed when plotting cellular Zn as a function of either total, dissolved or free Zn (*cf.* Figs. 2.2A, B and C). Bioaccumulation was mainly associated with ionic Zn^{2+} resulting from the dissolution of the nZnO.



2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

Figure 2.2 Cellular Zn as function of: (A) total, (B) dissolved or (C) free Zn measured for the Zn salt (stars) and bare nZnO (diamonds). In (A), total Zn was quantified by ICP-MS. In (B), the dissolved Zn was quantified by SSCP (◆) or centrifugal ultrafiltration (◆) and in (C) Zn^{2+} was determined by SSCP (◆). In (C), it was assumed that all ultrafiltered Zn corresponded to Zn^{2+} . In all figures, the blue stars (★) represented the cellular Zn that was obtained when *C. reinhardtii* was exposed to a soluble Zn salt.

2.4.2.2 nZnO-PAA

Zn biouptake was much lower for algae exposed to nZnO-PAA (Fig. 2.3A) as compared to either the Zn salt or the bare nZnO (Fig. 2.2A). Indeed, although an improved correlation was observed between the biouptake and dissolved Zn (Fig. 2.3B) as opposed to total Zn (Fig. 2.3A), Zn uptake was best predicted by the free ion concentration (Fig. 2.3C), in line with commonly accepted models of trace metal accumulation (Free ion activity model, Biotic ligand model) (Slaveykova and Wilkinson 2005). In this case, Zn concentrations determined by ultrafiltration corresponded mainly to free Zn. Due to the fabrication method of these NPs (Zn oxides are precipitated into the PAA shells), the Zn-PAA complexes are likely to be larger than the pore sizes of the ultrafilters (3 kDa; ~ 2 nm pore size) such that Zn complexes would be removed in a similar manner as the NP. Although much of the Zn in solution was found in the Zn-PAA complexes, bioaccumulation was best explained by the concentration of free Zn, similar to the observations made with the bare nZnO.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

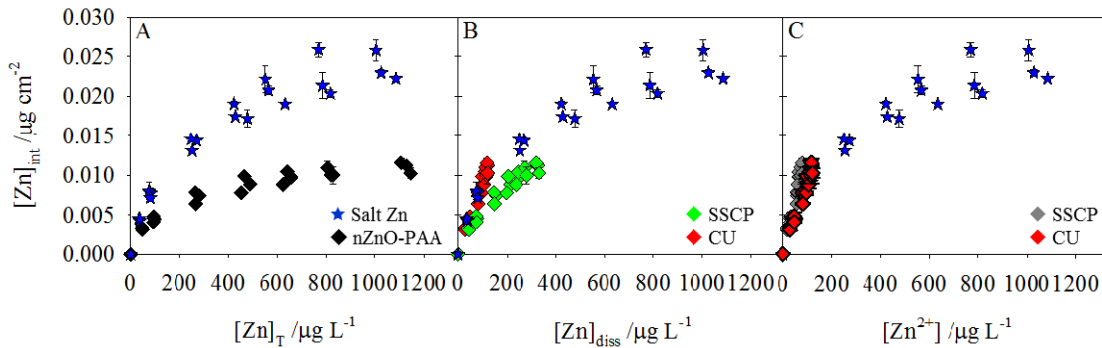


Figure 2.3 Cellular Zn as function of: (A) total, (B) dissolved and (C) free Zn measured for the salt of Zn (stars) and the nZnO-PAA (diamonds). In (A), total Zn was quantified by ICP-MS. In (B), the dissolved Zn was quantified by SSCP (◆) or centrifugal ultrafiltration (◆) and in (C) Zn^{2+} was determined by SSCP (◆). In (C), it was assumed that all ultrafiltered Zn corresponded to Zn^{2+} . In all figures, the blue stars (★) represent the cellular Zn that was obtained when *C. reinhardtii* was exposed to a soluble Zn salt.

2.4.2.3. nZnO-HMP

As could be anticipated from the dissolution results for the nZnO-HMP (Fig. 2.1C), different patterns were obtained for the cellular Zn when plotted as a function of total, dissolved or free Zn (Fig. 2.4). Biouptake was reduced slightly for the nZnO-HMP as compared to the Zn salt (Fig. 2.4A) when total Zn concentrations were used as the x-axis. Given the near total dissolution of the nZnO-HMP, a very similar result was obtained when cellular Zn was plotted as a function of the dissolved Zn obtained from the ultrafiltration results (*cf.* Fig. 2.1C and 2.4B). On the other hand, uptake was significantly **higher** than predicted when the SSCP data was used to quantify both particle dissolution (17 to 40 %) and free Zn concentrations (2-6 %) (Figs 2.4B and 2.4C).

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

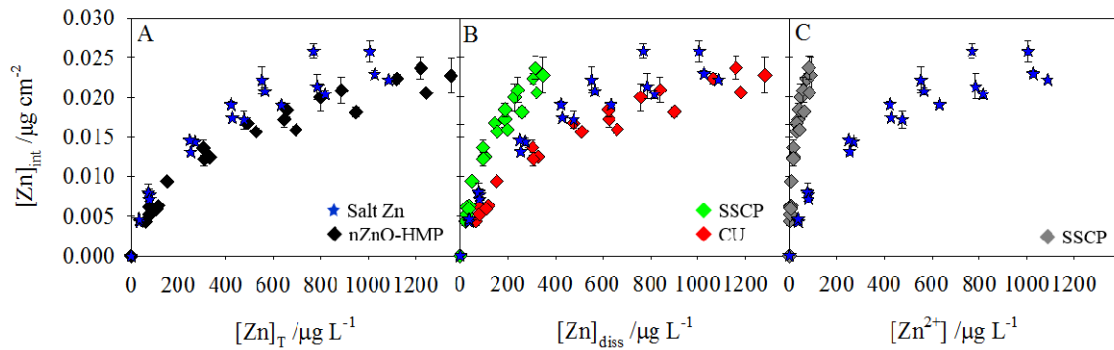


Figure 2.4 Cellular Zn as function of (A) total, (B) dissolved and (C) free Zn measured for the salt of Zn (stars) and the nZnO-HMP (diamonds). In (A), total Zn was quantified by ICP-MS. In (B), the dissolved Zn was quantified by SSCP (◆) or centrifugal ultrafiltration (CU, ◆) and in (C) Zn^{2+} was determined by SSCP (◆). Unlike Fig. 2.2 and 2.3, ultrafiltration results were not plotted in (C), given that Zn phosphate complexes are assumed to pass through the filters. In all figures, the blue stars (★) represent the cellular Zn that was obtained when *C. reinhardtii* was exposed to a soluble Zn salt.

The SSCP results indicated that either the dissolved or surface bound HMP played an important role in the uptake of the nZnO. Indeed, phosphate (Na_2HPO_4 , SigmaUltra, minimum 99.0%) could be seen to have strong influence on Zn uptake (Fig. 2.5). For phosphate concentrations ranging from 8.4×10^{-8} M to 7.5×10^{-6} M, Zn uptake increased at the lower phosphate concentrations whereas it decreased at the highest concentrations.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

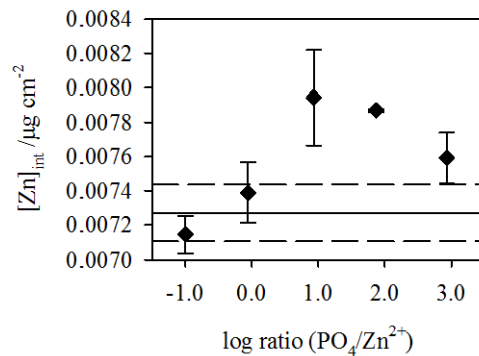


Figure 2.5 Cellular Zn as function of various phosphate concentrations expressed as log ratios (total constant Zn concentration of $55.6 \mu\text{g L}^{-1}$ while phosphate concentrations in solution varied from 8.4×10^{-8} to 7.5×10^{-4} M). The lines represent the cellular Zn obtained in absence of phosphate with the corresponding standard deviation.

Phosphorous is known to be taken up by *C. reinhardtii* as the inorganic anion and accumulated as polyphosphate in vacuole-like organelles (Hebeler et al. 1992) and in the cell wall (Werner et al. 2007). Furthermore, polyphosphates are known to stimulate Zn uptake (Yu and Wang 2004) and it is reasonable to assume that a similar mechanism could be at play for the HMP (Figs 2.4 and 2.5). At the highest phosphate concentrations examined, Zn complexation by phosphate would increase (as verified using SSCP and thermodynamic calculations (Visual MINTEQ version 2.5.3); Fig. S9), which could attenuate the phosphate effect (and reduce Zn biouptake) (*cf.* Fig. S9 and Fig. 2.5).

2.4.2.4 All NP

For the soluble Zn salt, Zn internalization fluxes were strongly correlated to the Zn concentrations (Fig. 2.6) but 2 orders of magnitude lower than the maximum diffusive flux of free Zn (Fig. 2.6, solid blue line), as calculated from Fick's second law for the steady-state, radial diffusion of free Zn ($D_{\text{Zn}} = 6.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) (Kariuki and Dewald 1996) to an organism

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

of radius 3.5×10^{-4} cm (Wilkinson and Buffle 2004). This implies that the diffusive supply of free Zn was more than enough to sustain uptake and that internalization fluxes were not mass transport limited. Indeed, under these conditions, nZnO would only be expected to decrease uptake if: (i) the particles were much larger than those observed (*ca.* >100 nm) so that diffusion limitation would occur, or (ii) the particle dissolution kinetics became rate-limiting. Given the measured sizes of the particles, which are smaller than 100 nm (only few larger agglomerates are present), and the fact that solutions were all pre-equilibrated for 24 h (decreasing the possibility of a limitation due to the particle dissolution rate), neither factor should cause a large decrease in bioaccumulation. Rather, only a small decrease in bioaccumulation in the presence of the NPs would be predicted, consistent with the observations made when then cells were exposed to the NPs as opposed to the Zn salt (Figs. 2.2A, 2.3A, 2.4A). For the bare nZnO and the nZnO-PAA, Zn biouptake could be predicted almost completely on the basis of particle dissolution (Figs. 2.2B, 2.2C, 2.3B, 2.3C). Such results are in fact in agreement with several reports demonstrating that the dissolution of bare nZnO is largely responsible for its toxicity (Franklin et al. 2007; Miao et al. 2010; Wiench et al. 2009). The slight discrepancy from theoretical predictions for these two NPs could likely be attributed to the presence of a few large agglomerates (*i.e.* >100 nm), incomplete particle dissolution and/or Zn complexation by the PAA carboxylate groups, therefore lowering bioavailable zinc.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

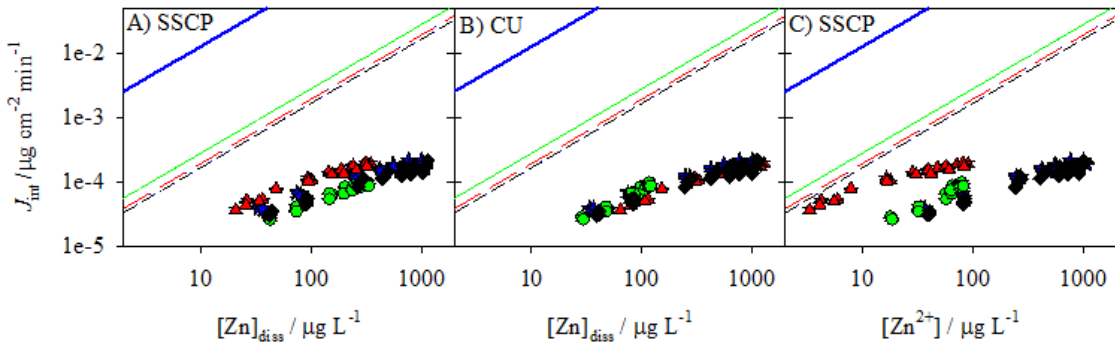


Figure 2.6 Internalization flux as a function of dissolved zinc for *C. reinhardtii* at pH 7.0 (A - determined by SSCP; B - determined by ultrafiltration) or free (C – determined by SSCP). (★) Salt of Zn; (◆) bare nZnO; (●) nZnO-PAA; (▲) nZnO-HMP. The lines represent the calculated maximal diffusive fluxes for Zn (solid bold, blue), bare nZnO (short dash, black), nZnO-PAA (solid, green), and nZnO-HMP (long dash, red).

For the nZnO-HMP, the free Zn (SSCP) was significantly lower than the total dissolved Zn leading to two possible interpretations: either biouptake could be predicted from the particle dissolution (ultrafiltration) or biouptake was significantly greater than what could be predicted by particle dissolution alone (SSCP). The SSCP results might therefore lead to the conclusion that *the algae were accumulating nZnO in addition to the free ion*. While this possibility cannot be discounted, it is more probable that the HMP coating stimulated the Zn uptake. In any case, both possibilities clearly demonstrate the importance of the particle surface coating when dealing with the bioaccumulation and/or toxicity of NPs.

2.5 Conclusion

The inherent instability of the NP often results in the use of stabilizers to increase their electrostatic or steric repulsion. In addition to the stabilizing effects of the surface coatings,

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

they were shown to: (i) complex the free ions in solution; (ii) increase particle dissolution due to a displacement of the solubility equilibria, and (iii) interact with the organism by producing their own (biological) effects (including increased uptake of the soluble ions). The fate of NP in complex media is clearly not straightforward to understand nor easy to quantify. Particle solubilization, metal complexation and metal biouptake were all influenced by the presence and nature of a given stabilizer. Clearly, this leads to the conclusion that it is not possible to extrapolate the results for a given NP to other NP with dissimilar surface coatings. Future research will need to be focused both on the roles of the NP core and the nature of its surface.

2.6 Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal: Science 2008 IST-CQE3 “Environmental Chemistry” Assistant Researcher position to RFD and Project PTDC/AAC-AMB/111998/2009).

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.7 References

- Bagkar N, Ganguly R, Choudhury S, Hassan PA, Sawant S, Yakhmi JV (2004) Synthesis of surfactant encapsulated nickel hexacyanoferrate nanoparticles and deposition of their Langmuir–Blodgett film. *J Mater Chem* 14:1430-1436. doi:doi: 10.1039/b315866g
- Bian S-W, Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Grassian VH (2011) Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. *Langmuir* 27 (10):6059-6068. doi:10.1021/la200570n
- Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y, Reid MM, Tufenkji N, Lead JR, Leppard GG, Wilkinson KJ (2009) Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol* 43:7277-7284. doi:doi: 10.1021/es900249m
- Domingos RF, Benedetti MF, Pinheiro JP (2007) Application of permeation liquid membrane and scanned stripping chronopotentiometry to metal speciation analysis of colloidal complexes. *Anal Chim Acta* 589:261-268. doi:doi:10.1016/J.ACA.2007.02.056
- Domingos RF, Franco C, Pinheiro JP (2013a) Stability of core/shell quantum dots - role of pH and small organic ligands. *Environ Sci Pollut Res* 20:4872-4880. doi:Doi: 10.1007/s11356-012-1457-0
- Domingos RF, Huidobro C, Companys E, Galceran J, Puy J, Pinheiro JP (2008) Comparison of AGNES (absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping) and SSCP (scanned stripping chronopotentiometry) for trace metal speciation analysis. *J Electroanal Chem* 617:141-148. doi:doi:10.1016/J.JELECHEM.2008.02.002

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

- Domingos RF, Rafiei Z, Monteiro CE, Khan MAK, Wilkinson KJ (2013b) Agglomeration and dissolution of zinc oxide nanoparticles: role of pH, ionic strength and fulvic acid. *Environ Chem* 10 (4):306-312. doi:10.1071/EN12202
- Elson EL, Magde D (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* 13:1-27. doi:doi:10.1002/BIP.1974.360130102
- Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS (2007) Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environ Sci Technol* 41:8484-8490. doi:doi: 10.1021/es071445r
- Gendron P-O, Avaltroni F, Wilkinson KJ (2008) Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluoresc* 18:1093-1101. doi:doi:10.1007/S10895-008-0357-7
- Hadioui M, Leclerc S, Wilkinson KJ (2013) Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* 105:15-19. doi:doi: 10.1016/j.talanta.2012.11.048
- Hassler CS, Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2004) Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol Oceanogr Methods* 2:237-247. doi:doi: 10.4319/lom.2004.2.237
- He W, Yan S, Wang Y, Zhang X, Zhou W, Tian X, Sun X, Han X (2009) Biomimetic synthesis of mesoporous zinc phosphate nanoparticle. *J Alloy Compd* 477:657-660. doi:doi: 10.1016/j.jallcom.2008.10.136

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

- Hebeler M, Hentrich S, Mayer A, Leibfritz D, Grimme LH (1992) Phosphate regulation and compartmentation in *Chlamydomonas reinhardtii* studied by in vivo ^{31}P -NMR. In: Murat N (ed) Research in photosynthesis. Kluwer, The Netherlands, pp 717-720
- Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71:1308-1316. doi:doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047
- Kariuki S, Dewald HD (1996) Evaluation of diffusion coefficients of metallic ions in aqueous solutions. *Electroanalysis* 8:307-313. doi:doi: 10.1002/elan.1140080402
- Kola H, Laglera LM, Parthasarathy N, Wilkinson KJ (2004) Cadmium adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environ Chem* 1 (3):172-179. doi:10.1071/EN04061
- Kola H, Wilkinson KJ (2005) Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ Sci Technol* 39:3040-3047. doi:doi: 10.1021/es048655d
- Leung YH, Chan CM, Ng AM, Chan HT, Chiang MW, Djuricic AB, Ng YH, Jim WY, Guo MY, Leung FC, Chan WK, Au DT (2012) Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. *Nanotechnology* 23:475703-475715. doi:doi: 10.1088/0957-4484/23/47/475703
- Li M, Zhu L, Lin D (2011) Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environ Sci Tehnol* 45:1977-1983. doi:doi: 10.1021/es102624t

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

- Lv J, Zhang S, Luo L, Han W, Zhang J, Yang K, Christie P (2012) Dissolution and microstructural transformation of ZnO nanoparticles under the influence of phosphate. *Environ Sci Technol* 46:7215-7221. doi:doi: 10.1021/es301027a
- Ma H, Bertsch PM, Glenn TC, Kabengi NJ, Williams PL (2009) Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 28:1324-1330. doi:doi: 10.1897/08-262.1
- Ma H, Williams PL, Diamond SA (2013) Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environ Poll* 172:76-85. doi:doi: 10.1016/j.envpol.2012.08.011
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, echal-Drouard LM, Marshall WF, Qu L-H, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Team CA, Team JA, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-251. doi:doi: 10.1126/science.1143609
- Miao A-J, Zhang X-Y, Luo Z, Chen C-S, Chin W-C, Santschi PH, Quigg A (2010) Zinc oxide-engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environ Toxicol Chem* 29:2814-2822. doi:doi: 10.1002/etc.340
- Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E (2012) The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ* 438:225-232. doi:doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.066
- Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Wu C-M, Grassian VH (2012) Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir* 28:396-403. doi:doi: 10.1021/la203542x

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

- Parab HJ, Huang J-H, Lai T-C, Jan Y-H, Liu R-S, Wang J-L, Hsiao M, Chen C-H, Hwu Y-K, Tsai DP, Chuang S-Y, Pang J-HS (2011) Biocompatible transferrin-conjugated sodium hexametaphosphate-stabilized gold nanoparticles: synthesis, characterization, cytotoxicity and cellular uptake. *Nanotech* 22:395706-395713. doi:doi:10.1088/0957-4484/22/39/395706
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. *J Nanopart Res* 14:1109-1120. doi:doi: 10.1007/s11051-012-1109-9
- Pinheiro JP, van Leeuwen HP (2004) Scanned stripping chronopotentiometry of metal complexes: lability diagnosis and stability computation. *J Electroanal Chem* 570:69-75. doi:doi:10.1016/J.JELECHEM. 2004.03.016
- Planken KL, Colfen H (2010) Analytical ultracentrifugation of colloids. *Nanoscale* 10:1849-1869. doi:doi: 10.1039/c0nr00215a
- Pomogailo AD, Kestelman VN (2005) Principles and mechanisms of nanoparticle stabilization by polymers. In: *Metallopolymer Nanocomposites*, vol 81. Springer, Berlin Heidelberg,
- Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model. *Environ Chem* 2:9-24. doi:doi: 10.1071/EN04076
- Starchev K, Wilkinson KJ, Buffle J (2000) Application of fluorescence correlation spectroscopy to the study of environmental systems. In: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications* Springer, Heidelberg, pp 251-275

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

- Vetterl V, Boháček J (1968) Interaction of polyphosphate with the mercury electrode surface. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 16:313-318. doi:doi: 10.1016/S0022-0728(68)80078-6
- Wang ZL (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *J Phys: Condens Matter* 16:R829-R858. doi:doi: 10.1088/0953-8984/16/25/R01
- Warad HC, Ghosh SC, Hemtanon B, Thanachayanont C, Dutta J (2005) Luminescent nanoparticles of Mn doped ZnS passivated with sodium hexametaphosphate. *Sci Technol Adv Mat* 6:296-301. doi:doi:10.1016/j.stam.2005.03.006
- Werner TP, Amrhein N, Freimoser FM (2007) Inorganic polyphosphate occurs in the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* and accumulates during cytokinesis. *BMC Plant Biol* 7:51-62. doi:doi:10.1186/1471-2229-7-51
- Widengren J, Mets U, Rigler R (1995) Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J Phys Chem* 99:13368-13379. doi:doi:10.1021/J100036A009
- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76:1356-1365. doi:doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.025
- Wilkinson KJ, Buffle J (2004) Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modeling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In: van Leeuwen HP, Koester W (eds) *Physicochemical kinetics and transport at chemical - biological interphases*. Wiley, Chichester, pp 445-533

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

Yin H, Casey PS, McCall MJ, Fenech M (2010) Effects of surface chemistry on cytotoxicity, genotoxicity, and the generation of reactive oxygen species induced by ZnO nanoparticles. *Langmuir* 26:15399-15408. doi:doi: 10.1021/la101033n

Yu R-Q, Wang W-X (2004) Biological uptake of Cd, Se(IV) and Zn by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to different phosphate and nitrate additions. *Aquat Microb Ecol* 35:163-173. doi:doi:10.3354/ame035163

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8 Supporting Information

2.8.1 Biouptake as a function of time

Uptake was linear over the first two hours of an uptake experiment.

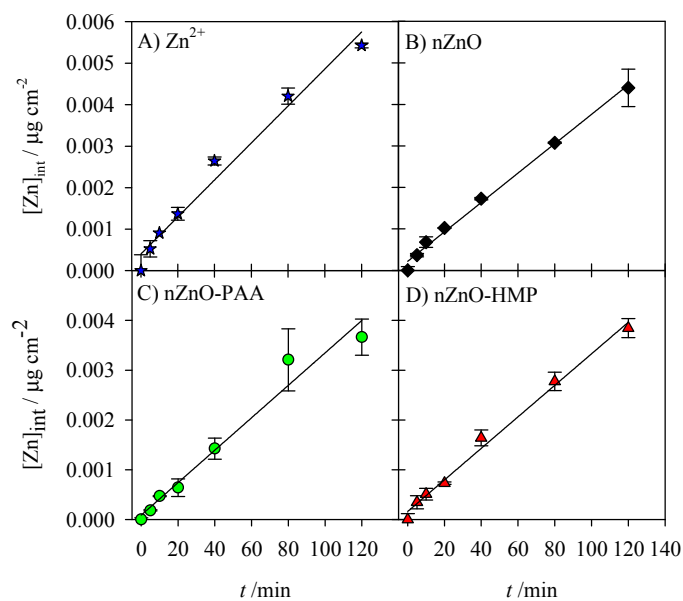


Figure S1 – Cellular Zn as function of time for the salt of Zn (★), nZnO- (◆), nZnO-PAA (●), and nZnO-HMP (▲). The parameters for the linear regressions are as follows: Zn^{2+} : $y = 4.4 \times 10^{-5}x + 4.0 \times 10^{-4}$, $R^2 = 0.978$; nZnO: $y = 3.5 \times 10^{-5}x + 2.2 \times 10^{-4}$, $R^2 = 0.994$; nZnO-PAA: $y = 3.3 \times 10^{-5}x + 9.1 \times 10^{-5}$, $R^2 = 0.970$; nZnO-HMP: $y = 3.2 \times 10^{-5}x + 1.6 \times 10^{-4}$, $R^2 = 0.992$.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.2 Optimization of the algal washing procedure

The washing procedure used to desorb the Zn from the algal surface following its exposure to Zn or nZnO was optimized. Bioaccumulation experiments were performed with 1200 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ of the Zn salt or each of the nZnOs. Algae were washed with different volumes (5, 10, 20 and 40 mL) of 10^{-2} M EDTA (Fig. S2). The results showed no significant differences between the Zn remaining in the cells (presumed to be internalized) when using either 20 or 40 mL of EDTA. Therefore, 20 mL of EDTA were used in all subsequent bioaccumulation experiments.

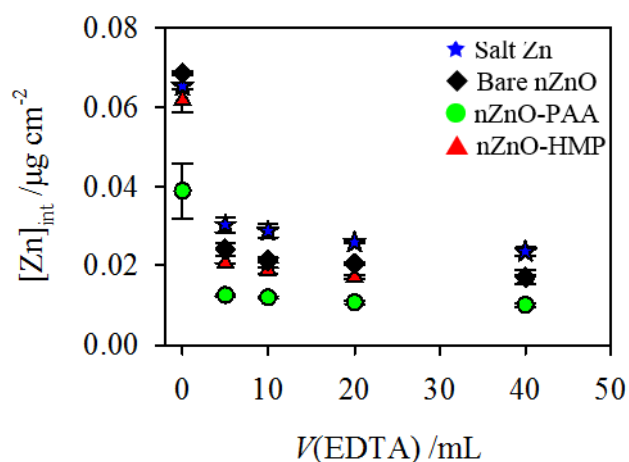


Figure S2 – Cellular Zn as function of the volume of a 10^{-2} M EDTA wash solution employed following the exposure of *C. reinhardtii* to a Zn salt (\star), bare nZnO (\blacklozenge), nZnO-PAA (\bullet) or nZnO-HMP (\blacktriangle). A total Zn concentration of 1200 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ was used in exposure solutions composed of 10^{-2} M HEPES, 10^{-5} M Ca, $I = 0.01$ M at pH 7.0.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.3 Scanned Stripping Chronopotentiometry (SSCP)

In a stripping chronopotentiometry, the reoxidation of the accumulated metal is performed by application of a constant oxidizing current (stripping current, I_s). The analytical signal is the time require to reoxidise the amalgamated metal, i.e., the transition time, τ . SSCP curves are constructed from a series of τ measurements made over a range of deposition potentials, E_d . The limiting value of the transition times, τ^* , which is obtained for deposition potentials that are much larger than the standard potential, reflects the magnitude of the original flux irrespective of its nature, i.e., diffusion control (fully labile complex) or kinetic control (non-labile complex) (Pinheiro and van Leeuwen 2004). The shift in the SSCP half-wave deposition potential, $\Delta E_{d,1/2}$, will occur due to complex formation and is directly related to the complex stability, irrespective of the degree of lability (Pinheiro and van Leeuwen 2004). In a labile system, the amalgamated metal is larger than that in a kinetic regime, which also results in a higher $\Delta E_{d,1/2}$ value.

The thermodynamic complex stability constant (K') can be calculated from the shift in the half-wave deposition potential, $\Delta E_{d,1/2}$, (analogous to the DeFord–Hume expression (DeFord and Hume 1951)), irrespective of the degree of lability of the system (Pinheiro and van Leeuwen 2004):

$$\Delta E_{d,1/2} = -\left(\frac{RT}{nF}\right) \left[\ln(1 + K') + \ln\left(\frac{\tau_{ML}^*}{\tau_M^*}\right)\right] \quad (2.2)$$

where τ_{ML}^* and τ_M^* are the limiting wave heights in the presence and in absence of ligands, R is the gas constant, F is the Faraday constant, n is the number of electrons involved in the faradaic process, and T is the temperature. The plots of τ vs. E_d are very rich in speciation

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

information since they can cover the most relevant part of the stability distribution spectrum and the corresponding parts of distribution of rate constants.

Computation of the dissolved ZnO

$E_{d,1/2}$ values obtained for the bare nZnO and nZnO-HMP were slightly more negative than those observed for the metal-only system (~ 5 mV; Fig. S3), indicating that virtually all of the dissolved Zn was uncomplexed. Under these conditions, quantification of the total dissolved Zn using SSCP data is straightforward; the dissolved metal ion concentration will be directly proportional to the limiting value of the electrolysis time, with a proportionality factor (that can be obtained from calibration).

At the lowest concentrations of bare nZnO and nZnO-HMP and for the entire range of the nZnO-PAA concentrations, a clear shift in potential was observed in the SSCP wave (> 5 mV; Fig. S3) indicating that the metal was being complexed by the ligands present in the system (PAA in the case of the nZnO-PAA; phosphate for the nZnO-HMP; or metal adsorption on the oxide surface). For adsorption by the oxide surface (bare nZnO) or the complexation by phosphate groups (nZnO-HMP), weak, labile complexes were formed, which is indicated by the small shift in the half-wave deposition potential (~ 5 - 15 mV; Fig. S3) and the relatively low K' values that were obtained (~ 0.1 - 2 and ~ 1 - 10 for the nZnO and nZnO-HMP, respectively). For the nZnO-PAA, larger $\Delta E_{d,1/2}$ were obtained (~ 15 - 25 mV, Fig. S3), although K' values were low, ranging from 0.2 to 11.5 , also indicating the formation of labile complexes. These data allowed the computation of the dissolved Zn since the dissolved Zn concentration should be directly proportional to the limiting value of the electrolysis time and a proportionality factor.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

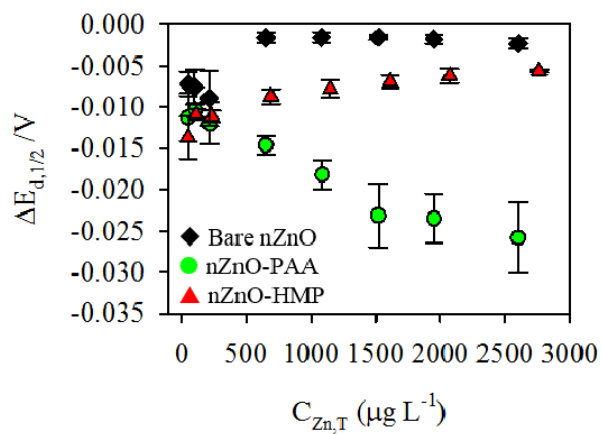


Figure S3 – SSCP shift of the half-wave deposition potential for the bare nZnO (◆), nZnO-PAA (●), and nZnO-HMP (▲) as function of the total Zn present in the exposure solutions (10^{-2} M HEPES, 10^{-5} M Ca, $I = 0.01$ M, pH = 7.0). Measurements were made after 24 h of sample equilibration.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.4 Centrifugal ultrafiltration

When using centrifugal ultrafiltration, it is generally very important to pre-equilibrate the filter devices with samples in order to avoid important losses of dissolved metal to the filter surfaces. Usually, samples are added to the ultrafiltration devices, spun down and then the filtration is repeated with a new volume of sample. Nevertheless, for nZnO, the pre-equilibration did not appear to be critical since results were similar for 1 to 4 cycles of filtration (Fig. S4):

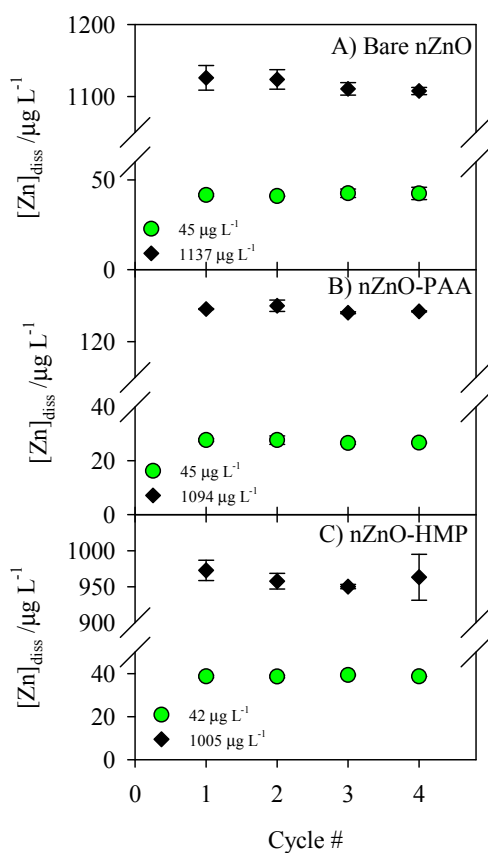


Figure S4 – Equilibration of the centrifugal ultrafilters measured for successive equilibration cycles. The number of equilibration cycles was optimized for the lowest (●) and highest (◆) total Zn concentrations used. (A) bare nZnO; (B) nZnO-PAA and (C) nZnO-HMP dispersed in the exposure solution (10^{-2} M HEPES, 10^{-5} M Ca, $I = 0.01$ M, pH 7.0). The error bars represent the standard deviations for technical duplicates.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.5 Resin-based ICP-MS

A cation-exchange resin (styrene-divinylbenzene with sulfonic acid functional groups, Dowex 50W-X8 with 50-100 mesh and exchange capacity of 5.1 ± 1 meq g^{-1} , Sigma) was added just before the entrance of the nebulizer chamber on the ICP-MS. The resin was conditioned prior to use by (i) passing 30 mL of 1.5 M HNO_3 , (ii) rinsing the resin with 30 mL of Milli-Q water, (iii) converting the resin to its sodium form with NaOH 0.1 M, and (iv) rinsing with Milli-Q water to neutralize the pH. During the passage of the nZnO dispersions through the resin, the Na ions will be exchanged by the ionic Zn, ideally letting only the NPs into the nebulizer chamber and consequently lowering the ionic zinc background (Fig. S5):

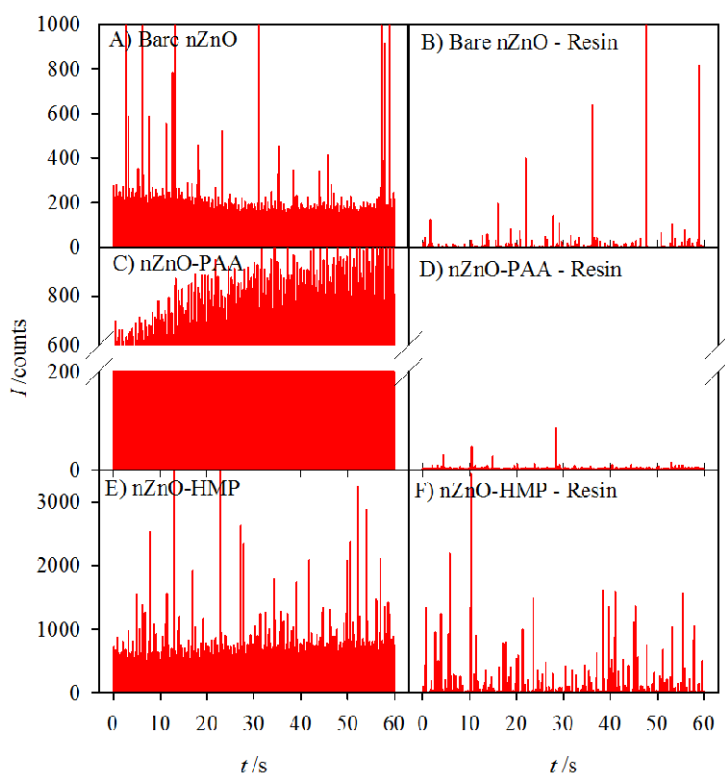


Figure S5 – Resin-based ICP-MS temporal profiles without (A, C and E) and with background suppression (B, D and F) by using the cation-exchange resin: bare nZnO (A and B), nZnO-PAA (C and D) and nZnO-HMP (E and F) at $\sim 160 \mu g Zn L^{-1}$ in MilliQ water.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.6 Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

In FCS, a laser light is focused into the sample using confocal optics, creating an open and illuminated volume element (confocal volume) with dimensions of approximately $0.5 - 1.0 \mu\text{m}^3$. At any point in time, only a few fluorescent molecules occupy the confocal volume. In the absence of chemical reactions or other dynamic processes, temporal fluctuations in the measured fluorescence intensity in the confocal volume can be attributed solely to the translational diffusion of the fluorescent particle. An autocorrelation function that assumes a three-dimensional Gaussian distribution, $G(t)$, can be used to analyse the variations in the fluorescence intensity. For a 1-component system in the absence of phosphorescence (Aragon and Pecora 1975):

$$G(t) = a + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{(\omega_0/z_0)^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (2.3)$$

where a is the limiting value of $G(t)$ for $t \rightarrow \infty$ (usually $a = 1$), N is the average number of fluorescent particles diffusing into the confocal volume, τ_D is the characteristic diffusion time of the fluorescent species through the sample volume, t is the delay time, and ω_0 and z_0 are the transversal and longitudinal radii of the sample volume, respectively. The values of ω_0 and z_0 can be determined by calibration of the system with rhodamine 110 (R110, Fluka), which has a known diffusion coefficient of $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Gendron et al. 2008).

The values of diffusion times for the bare nZnO labelled with rhodamine 6G (R6G) were determined from a best fit of an autocorrelation function that assumed a three-dimensional Gaussian distribution, and which was given as the weighted sum of a number i of individual G_i (Widengren et al. 1995):

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \prod_{i=1}^n [1 + A_i \exp(-t/\tau_i)] \frac{1}{(1+t/\tau_D)(1+t/[(z_0/\omega_0)^2 \tau_D])^{1/2}} \quad (2.4)$$

where $A_i = F_i/(1 - F_i)$. F corresponds to the fraction of molecules that reside in the dark state at any time. Diffusion coefficients, D , of the nZnO were subsequently calculated from measured diffusion times using the following relationship:

$$D = \omega_0^2/4\tau_D \quad (2.5)$$

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.7 Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images and size distributions are presented in Fig. S6:

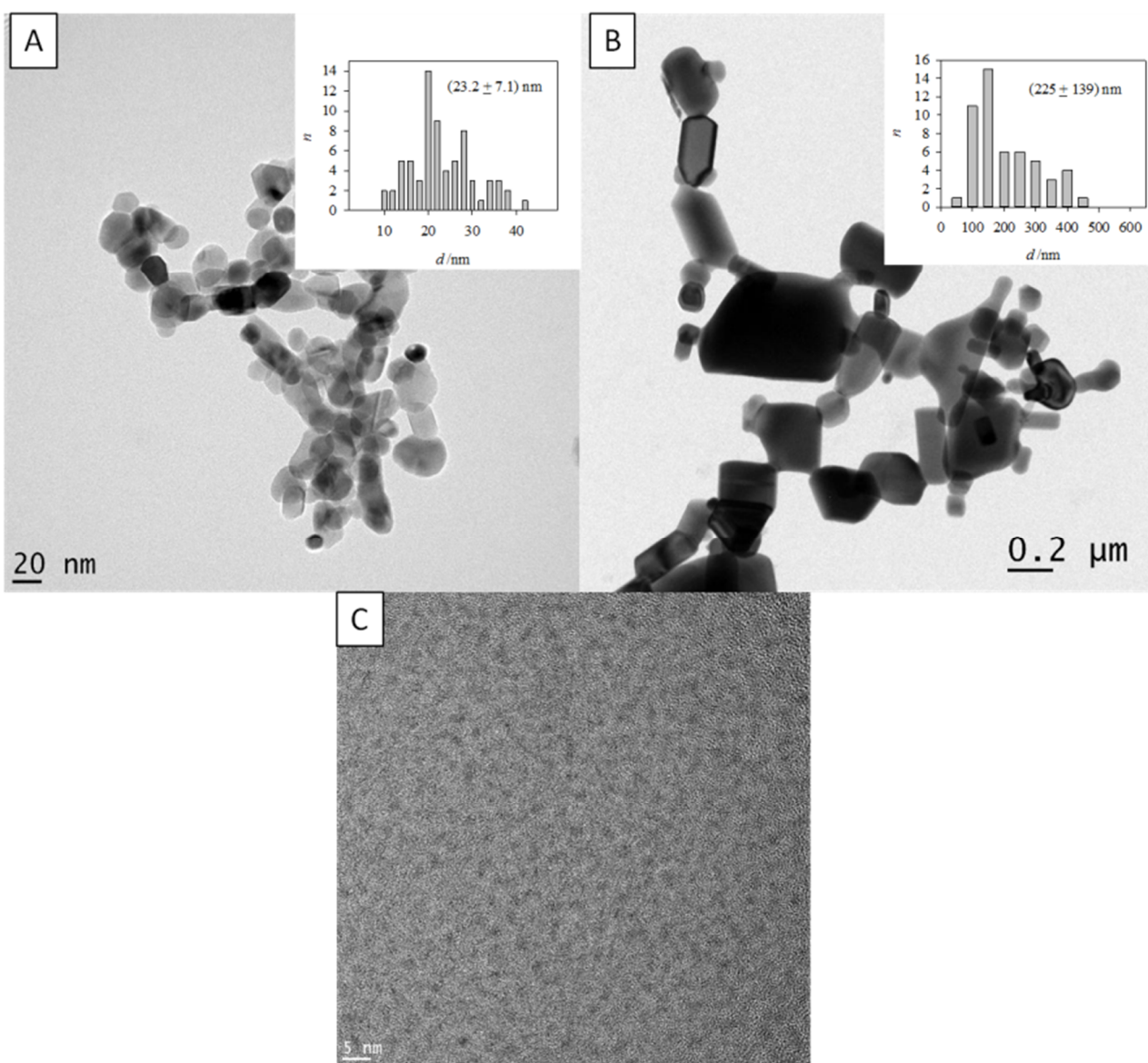


Figure S6 – TEM images of bare nZnO (A), nZnO-HMP (B) and nZnO-PAA (C). The insert graphs in (A) and (B) correspond to the measured particle size distributions. In (C), discrete nanoparticles could not be observed.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.8 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The specific IR absorption bands of the characteristic peaks of PO_4^{3-} are illustrated in Fig. S7 below:

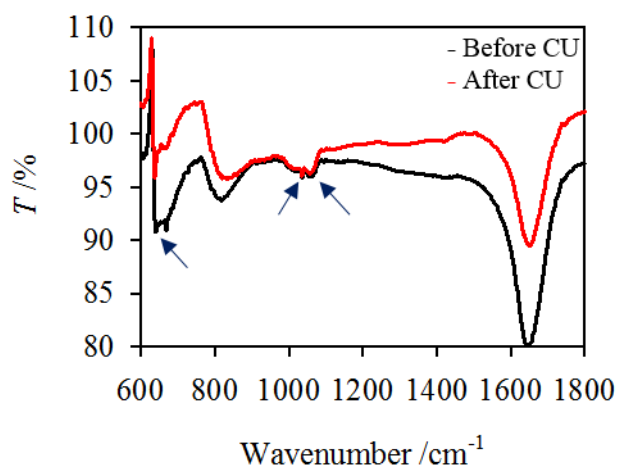


Figure S7 – FTIR spectra of nZnO-HMP before (black) and after (red) centrifugal ultrafiltration (20 minutes, centrifugation at $3700 \times g$). The peaks at ca. 640, 1038 and 1068 cm^{-1} (indicated by arrows), which appear in both samples, are characteristic of the presence of PO_4^{3-} .

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.9 The effect of HMP on the SSCP

The effect of HMP on the Zn SSCP wave is presented below (Fig. S8):

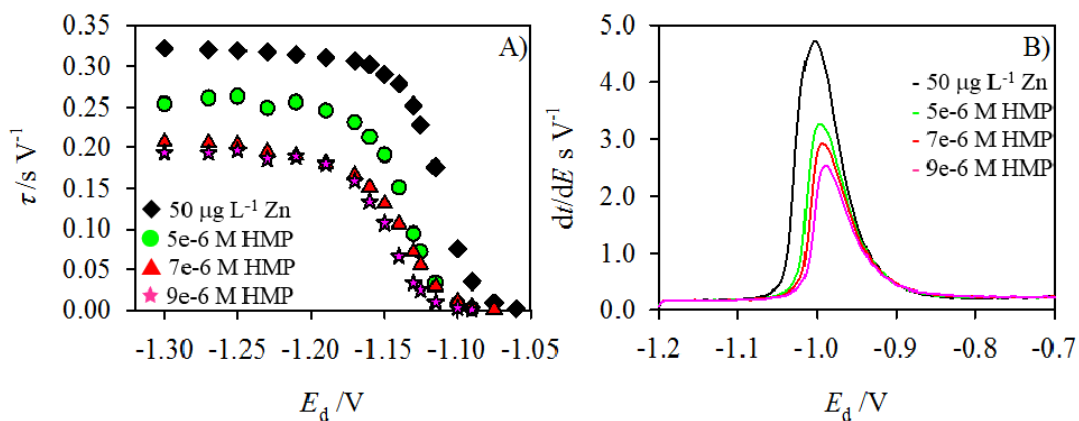


Figure S8 – (A) SSCP waves and (B) SCP curves obtained for a total Zn concentration of 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the absence (calibration; \blacklozenge) and presence of different HMP concentrations: 5.0×10^{-6} (\bullet), 7.0×10^{-6} (\blacktriangle), and 9.0×10^{-6} M (\blackstar).

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.8.10 Thermodynamic speciation calculations of Zn in presence of phosphate

The effect of the concentration of phosphate on the speciation of the free Zn is shown below for calculations performed using VISUAL MINTEQ (Fig. S9):

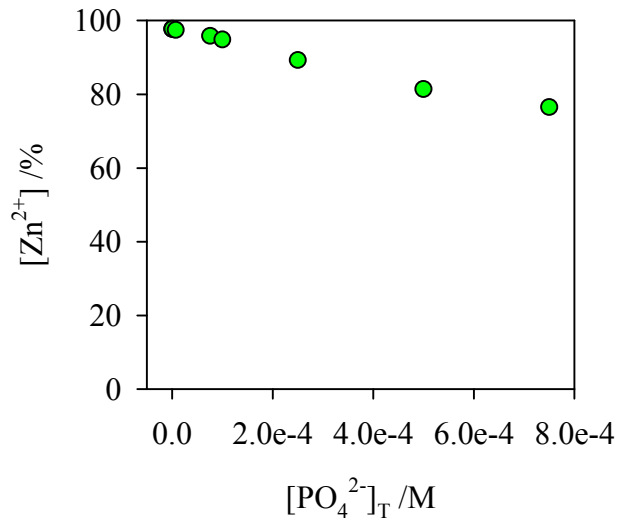


Figure S9 – Free Zn as a function of added phosphate concentrations, as determined by Visual Minteq.

Conditions: 50 µg L⁻¹ Zn, 10⁻² M NaHEPES, 10⁻⁵ M Ca(NO₃)₂, pH 7.0.

2. Effets des enrobages des nanoparticules de ZnO sur leur dissolution et bioaccumulation

2.9 References for supporting information

Aragon SR, Pecora R (1975) Fluorescence Correlation Spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J Chem Phys* 64:1791-1803. doi:doi: 10.1063/1.432357

DeFord DD, Hume DN (1951) The determination of consecutive formation constants of complex ions from polarographic data. *J Am Chem Soc* 73:5321-5322. doi:doi:10.1021/ja01155a093

Gendron P-O, Avaltroni F, Wilkinson KJ (2008) Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluoresc* 18:1093-1101. doi:doi:10.1007/S10895-008-0357-7

Pinheiro JP, van Leeuwen HP (2004) Scanned stripping chronopotentiometry of metal complexes: lability diagnosis and stability computation. *J Electroanal Chem* 570:69-75. doi:doi:10.1016/J.JELECHEM. 2004.03.016

Widengren J, Mets U, Rigler R (1995) Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J Phys Chem* 99:13368-13379. doi:doi:10.1021/J100036A009

3. Résultats supplémentaires

3. Résultats supplémentaires

3.1 L'utilisation de l'EDTA pour le rinçage de nanoparticules sur les filtres

L'objectif ici était d'évaluer l'efficacité d'un complexant fort (ethylenediamine-tetraacetic acid, EDTA) pour le rinçage des filtres de nitrocellulose suite au passage des solutions de nanoparticules seules (sans algues) afin de quantifier le zinc adsorbé sur ces filtres.

3.1.1 Matériel et méthode

Préparation des solutions :

L'eau MilliQ a été utilisée pour préparer toutes les solutions. Les solutions étaient tamponnées à pH 7.0 en utilisant 10^{-2} M de HEPES. Les solutions contenaient également 10^{-5} M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ afin d'avoir les mêmes conditions qu'avec les expériences de bioaccumulation (se référer à l'article, sections 2.3.6). L'acide nitrique (65 %, trace select ultra) ainsi que la soude (NaOH, SigmaUltra, minimum 98%) ont été utilisés pour ajuster le pH. Les solutions des différentes nanoparticules (nZnO, nZnO-PAA et nZnO-HMP) étaient préparées à partir de leurs solutions mères. Les échantillons étaient préparées en diluant les solutions stocks dans des solutions tampons de HEPES ($I = 0.01$ M; pH = 7.0) préalablement préparées. Trois concentrations nominales de nZnO ont été préparées; 50, 500 et $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ (les concentrations quantifiées différaient légèrement) en zinc total en plus d'un contrôle ne possédant pas de zinc. Les solutions étaient agitées pendant 24 h avant de commencer l'expérience.

3. Résultats supplémentaires

Filtration des solutions de nanoparticules :

Les solutions contenant les nanoparticules (sans algues) ont été filtrées à travers un filtre à base de nitrocellulose (4.7 cm de diamètre et 3.0 μm taille des pores, Millipore) sous vide dans des unités de filtration. Un volume de 30 mL d'échantillon a été filtré suivi de 20 mL d'EDTA préparé dans du HEPES ($I = 0.01 \text{ M}$; $\text{pH} = 7.0$). Les filtres sont récupérés à l'aide de pinces et digérés en ajoutant 300 μL d' HNO_3 ultrapur (65 %, trace select ultra) puis les échantillons sont chauffés dans un bain-marie à 80 °C pendant 4 heures.

3.1.2 Résultats et discussion

Une expérience similaire avait été faite pour optimiser le rinçage des algues (Figure S2 de la section 2.8.2 de l'article). Cependant, avec les concentrations relativement élevées avec les nanoparticules de zinc, il fallait avoir la certitude que la bioaccumulation des algues n'était pas un artefact dû à l'adsorption des nanoparticules, soit sur les algues ou sur les filtres de nitrocellulose. Deux types d'expériences ont été menés en parallèle pour vérifier l'efficacité de l'EDTA dans la désorption des métaux et/ou nanoparticules de zinc (Fig. 3.1). D'un côté, les histogrammes bleus représentent l'adsorption des nanoparticules sur le filtre de nitrocellulose sans rinçage avec l'EDTA. D'un autre côté, les histogrammes rouges représentent les résultats obtenus lorsque le rinçage par l'EDTA a suivi l'étape d'adsorption. L'EDTA est un ligand très utilisé pour complexer les métaux divalents, spécialement le zinc en raison de la forte constante de stabilité du complexe ZnEDTA^{2-} , $\log K = 17.94$ (Hassler et al. 2004a; Vercauteren and Blust 1996). On voit à la figure 3.1 qu'il est possible de conclure que l'EDTA a un effet très important dans la désorption des métaux des filtres, autant dans les faibles concentrations que dans les grandes. De plus, les résultats des contrôles avec et sans ajout

3. Résultats supplémentaires

d'EDTA (histogrammes ayant des astérisques) ont renforcé cette observation. En effet les histogrammes rouges montrent sensiblement la même concentration adsorbée et il ne semble pas y avoir de différence significative entre les diverses concentrations filtrées.

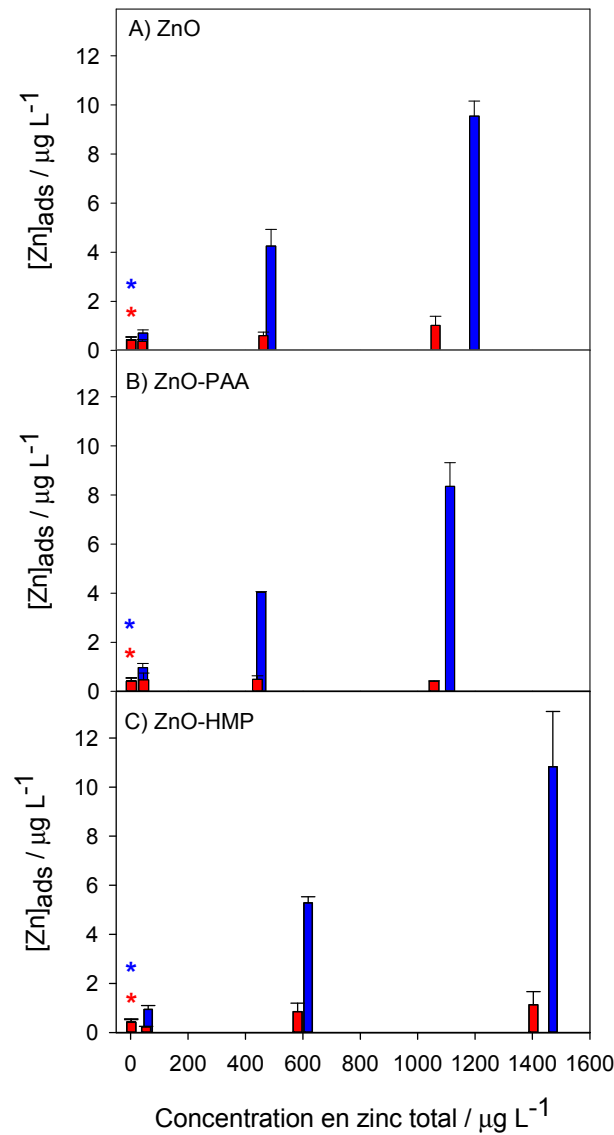


Figure 3.1 Quantification du Zn adsorbé sur filtres de nitrocellulose (3.0 μm de taille des pores) provenant de trois types de nZnO suite à l'utilisation de l'EDTA (barres rouges) et sans EDTA (barres bleues) en fonction de la concentration de zinc passé à travers le filtre : (A) nZnO sans enrobage; (B) nZnO ayant un enrobage de polyacrylate (PAA) et (C) nZnO ayant un enrobage d'hexamétaphosphate (HMP). Trois différentes

3. Résultats supplémentaires

concentrations ont été testées ainsi que d'un contrôle (aucun zinc ajouté). Les expériences ont été faites en duplicata technique. Les astérisques bleus (*) et rouges (*) représentent les contrôles sans et avec l'ajout d'EDTA respectivement.

3.2 Cinétique de bioaccumulation de différentes nanoparticules de ZnO

L'expérience de cinétique avait pour but de vérifier si les exsudats (débris cellulaires pouvant complexer les métaux, dont le Zn^{2+}) pouvaient affecter la bioaccumulation de *C. reinhardtii* après une période d'exposition de 2 heures en présence de différents types de nanoparticules de zinc (nZnO, nZnO-PAA et nZnO-HMP). Il était important d'élucider cette question car les exsudats relâchés par les algues *C. reinhardtii* peuvent complexer fortement les métaux en solution et ainsi modifier leur spéciation. De plus, *C. reinhardtii* est cultivée dans une solution de croissance ayant du zinc jusqu'à 1.9×10^{-8} M (solution obtenue par dilution 1000x de la solution de micronutriments pour l'obtention de la solution tris-acetate-phosphate, TAP) tandis que la concentration la plus faible de zinc total étudiée pour la bioaccumulation est $\sim 7.7 \times 10^{-7}$ M ($50 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.2.1 Matériel et méthode

Culture des algues :

Se référer à la section matériel et méthode de l'article (section 2.3.5) pour la culture des algues.

Préparation des solutions :

Se référer à la section matériel et méthode de l'article (section 2.3.6) pour la préparation des solutions.

3. Résultats supplémentaires

Bioaccumulation des nanoparticules :

Se référer à la section matériel et méthode de l'article pour la bioaccumulation du zinc (section 2.3.6). La seule différence avec le protocole de bioaccumulation énoncé plus tôt est que dans la présente section, l'expérience est réalisée avec différents temps d'exposition des nanoparticules, soit 5, 10, 20, 40, 80 et 120 minutes. La méthodologie pour le rinçage avec l'EDTA suite à la bioaccumulation demeure inchangée.

3.2.2 Résultats et discussion

L'adsorption algale, tout comme la complexation des métaux par les exsudats des algues peuvent donner lieu à des artefacts et fausser la quantification réelle de la bioaccumulation des métaux dans l'algue. Par exemple, la production d'exsudats par les algues dans le milieu d'exposition peut mener à une modification chimique de la spéciation des métaux qui pourrait diminuer leur bioaccumulation (Kola et al. 2004; Mirimanoff and Wilkinson 2000). Selon la figure 3.2, les régressions linéaires obtenues semblent montrer une augmentation constante de la bioaccumulation du zinc avec le temps, signifiant qu'il était probable que les exsudats n'affectent pas de façon significative la bioaccumulation, même avec l'utilisation de faibles concentrations (37 à 46 $\mu\text{g L}^{-1}$) dans la gamme prévue pour la bioaccumulation. Effectivement, si la complexation des exsudats avec le Zn^{2+} était importante, on s'attendrait à observer une saturation de la bioaccumulation ce qui n'est pas le cas dans la présente situation, même jusqu'à une période de 120 minutes. L'utilisation de ce temps d'exposition est avantageux car lors de la quantification des échantillons de bioaccumulation, un meilleur signal sur bruit peut être obtenu.

3. Résultats supplémentaires

Finalement, il est également intéressant de noter que les pentes des figures 3.2 B), C) et D) correspondant aux nanoparticules ZnO, ZnO-PAA et ZnO-HMP respectivement sont inférieures à la figure de bioaccumulation obtenue pour le zinc libre en 3.2 A). Cela est explicable par le fait que les nanoparticules, présent en concomitance avec leur produit de dissolution Zn^{2+} , ne participent pas à la bioaccumulation dans les algues et donc procurent des pentes relativement plus faibles par rapport à l'ion libre (Se référer à la section de bioaccumulation de l'article, section 2.4.2).

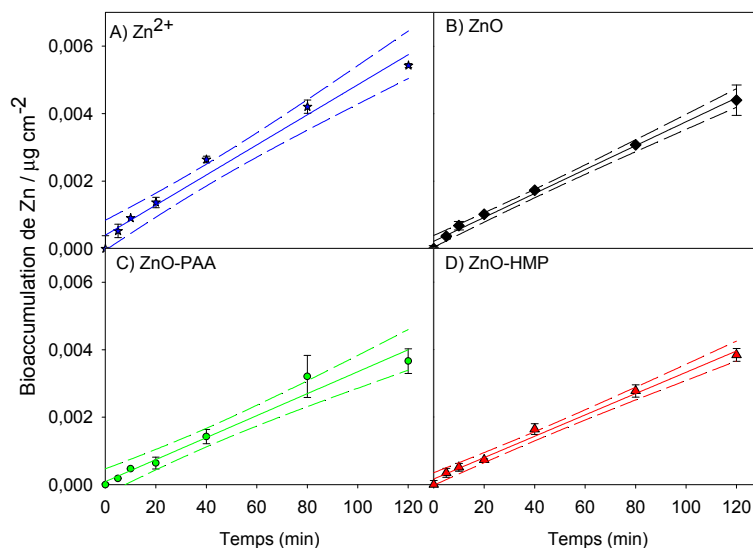
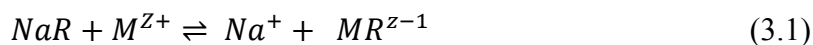


Figure 3.2 Bioaccumulation effectuée en fonction du temps (0 à 120 min) pour les différentes nanoparticules et l'ion libre : (A) Bioaccumulation du Zn^{2+} (exposé à $54.3 \mu\text{g L}^{-1} Zn^{2+}$) ayant une pente d'internalisation de $4.5 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-6} \mu\text{g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9775$; (B) Bioaccumulation du nZnO (exposé à $45.6 \mu\text{g L}^{-1} Zn$ total) sans enrobage ayant une pente d'internalisation de $3.5 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-6} \mu\text{g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9945$; (C) Bioaccumulation de nZnO (exposé à $46.5 \mu\text{g L}^{-1} Zn$ total) avec enrobage de polyacrylate (PAA) ayant une pente d'internalisation de $3.3 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-6} \mu\text{g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9697$ et (D) Bioaccumulation de nZnO (exposé à $37.3 \mu\text{g L}^{-1} Zn$ total) avec enrobage d'hexaméthaphosphate (HMP) ayant une pente d'internalisation de $3.2 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-6} \mu\text{g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9920$. Les lignes pointillées représentent des intervalles de confiance de 95% tandis que les lignes pleines sont les régressions linéaires.

3. Résultats supplémentaires

3.3 Quantification du zinc libre avec une technique échangeuse d'ions

L'objectif de l'utilisation de la technique échangeuse d'ions à base de styrène divinylbenzène (Dowex 50W-X8, capacité d'échange de 5.1 ± 1 meq/g) est la détermination du Zn^{2+} dans les différentes solutions de nanoparticules étudiées lors de la bioaccumulation (ZnO, ZnO-PAA et ZnO-HMP). L'intérêt était de comprendre l'influence de la présence de différents enrobages sur la dissolution des trois nanoparticules dans l'eau tamponnée HEPES ($I = 0.01$ M; pH = 7.0). C'est une technique réputée fiable et reproductible comme cela a été le cas avec la détermination de l' Ag^+ relâchés des nanoparticules de nAg et de la quantification du Ni^{2+} dans les eaux naturelles (Hadioui et al. 2013; Worms and Wilkinson 2008). Cependant pour des raisons qui seront élaborées plus loin dans ce chapitre, cette technique n'a pas donné les résultats escomptés dans le cas des nanoparticules de ZnO. L'utilisation de la résine s'avérait un choix intéressant pour la détermination du zinc libre (Zn^{2+}) issu de la dissolution des trois différentes nanoparticules pour l'étude de la spéciation. En effet, cette technique est simple d'utilisation et la théorie est bien connue. Brièvement, une solution contenant un métal libre passe à travers une résine de masse connue (m_{res}) chargée en ions sodium (Na^+) avec un débit constant. Le métal libre (M^{Z+}) dans la solution échange ensuite avec la résine selon l'équation suivante :



Cet échange entre le métal libre d'intérêt et la résine se fera jusqu'à l'atteinte de l'équilibre entre la résine et la solution. Le temps d'équilibre (t_{eq}) est une étape cruciale pour l'utilisation de la technique d'échange d'ions. En effet, le t_{eq} donne le temps maximal que va prendre la résine pour saturer tous ses sites avec le métal libre d'intérêt. Ce dernier est ensuite élué avec un acide fort (HNO_3 1.5 M) afin de pouvoir déterminer la concentration de métal

3. Résultats supplémentaires

adsorbée sur la résine, $\{M-R\}$ en mol g^{-1} . Cette concentration est déterminée avec la formule suivante :

$$\{M - R\} = \frac{V_{el} * [M^{Z+}]_{el}}{m_{res}} \quad (3.2)$$

où V_{el} correspond au volume qui est nécessaire à l'élution totale du métal adsorbé sur la résine, $[M^{Z+}]_{el}$ est la concentration du métal élué par l'acide et m_{res} est la masse de la résine pesée.

Connaissant la concentration du métal adsorbé sur la résine ainsi que de la concentration totale de la solution injectée dans la colonne, il est donc possible de déterminer le coefficient de partage (λ') qui sera utilisé dans la détermination de concentration du métal libre d'intérêt dans des solutions inconnues ($L g^{-1}$) :

$$\lambda' = \frac{\{M-R\}}{[M^{Z+}]_{sol}} \quad (3.3)$$

où $[M^{Z+}]_{sol}$ est la concentration du métal libre dans la solution. Finalement, il est possible de trouver la concentration du métal libre dans une solution inconnue, $[M^{Z+}]_{inc}$, en combinant les équations 3.2 et 3.3 pour obtenir :

$$[M^{Z+}]_{inc} = \frac{\{M-R\}}{\lambda'} = \frac{V_{el} * [M^{Z+}]_{el}}{\lambda' * m_{res}} \quad (3.4)$$

3.3.1 Matériel et méthodes

Préparation des solutions :

L'eau MilliQ a été utilisée pour préparer toutes les solutions. Les solutions étaient tamponnées à pH 7.0 en utilisant 10^{-2} M de HEPES. Les solutions contenaient également 10^{-5} M de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ afin d'avoir les mêmes conditions qu'avec les expériences de bioaccumulation (se référer à l'article, section 2.3.6). Afin d'ajuster le pH, l'acide nitrique

3. Résultats supplémentaires

HNO₃ (65 %, trace select ultra) ainsi que la soude NaOH (SigmaUltra, minimum 98%) ont été utilisés. Les solutions d'essais étaient préparés en ajoutant le Zn²⁺ après avoir dilué la solution mère de 1000 mg L⁻¹ dans une solution de HEPES ($I = 0.01$ M; 10^{-5} M Ca²⁺; pH = 7.0). Les concentrations en Zn²⁺ préparées étaient de 338 et 350 µg L⁻¹ (5.1×10^{-6} M et 5.3×10^{-6} M respectivement).

Préparation, conditionnement de la résine et récolte des fractions :

Les procédures suivantes proviennent de Hadioui et al. (2013). Avant l'utilisation de la résine (styrène-divinylbenzène avec des groupements fonctionnels d'acide sulfonique), des impuretés ont été enlevées par sédimentation et décantation dans l'eau MilliQ. La résine a été ensuite rincée avec l'acide nitrique 1.5 M, suivi d'un rinçage à nouveau avec l'eau MilliQ puis séchée à 60 °C. Deux quantités de résine ont été pesées, soit 11.4 mg et 52.2 mg. Ces masses ont été mises en suspension dans l'eau MilliQ puis, grâce à une pompe péristaltique, ont pu être acheminées dans des tubes de propylènes de ~1.5 cm de longueur afin de former les 2 colonnes d'échange d'ions. Elles étaient maintenues en place avec l'introduction d'une fibre de verre.

La résine doit être conditionnée avant son utilisation. Pour ce faire, elle est tout d'abord rincée avec l'acide nitrique 1.5 M pendant 5 min à l'aide d'une pompe péristaltique avec un débit de 5 mL min⁻¹ afin d'enlever tout ce qui pourrait y être adsorbé. Ensuite, afin de neutraliser l'acide sur la résine, l'eau MilliQ est passée pendant 5 min avec le même débit. La résine est par la suite convertie dans sa forme Na⁺ en passant une solution de NaOH 0.1 M pendant 5 min. Enfin, l'eau est passée à nouveau afin de neutraliser la base forte.

Pour l'étape de percolation, les solutions contenant 338 et 350 µg L⁻¹ Zn²⁺ dans une solution tamponnée de 10⁻² M HEPES ($I = 0.01$ M; 10^{-5} M Ca²⁺; pH = 7.0) sont passées à

3. Résultats supplémentaires

travers deux colonnes échangeuses d'ions avec un débit de 5 mL min^{-1} . À la sortie des résines, des fractions sont récoltées à des temps précis pour être ensuite acidifiées à 2% HNO_3 afin d'être dosés avec l'ICP-MS.

3.3.2 Résultats et discussion

La figure 3.3 montre deux tentatives échouées pour l'obtention d'un temps d'équilibre entre le zinc libre et la résine. Deux masses de résines ont en effet été utilisées, soit 11.4 mg et 52.2 mg. Une plus grande masse de résine signifie qu'il y a présence d'un plus grand nombre de sites qui peuvent échanger avec le zinc ce qui en résulte en un temps d'équilibre plus long (cercles verts). D'un autre côté, les résultats obtenus avec une masse de résine significativement plus faible (cercles rouges) ne semblent pas montrer un signe de saturation même après 330 minutes de percolation. Il serait théoriquement possible d'atteindre un équilibre plus rapidement si la masse de la résine était encore plus petite. Il est cependant important de noter que les masses de résines inférieures à 10 mg ne sont pas faciles à peser en raison des grandes fluctuations de la balance et apportent donc d'autres incertitudes.

3. Résultats supplémentaires

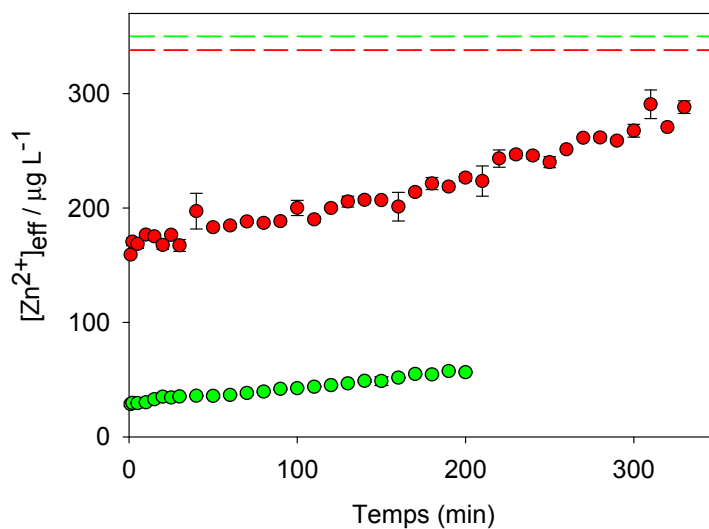


Figure 3.3 Tentative d'obtention du temps d'équilibration de deux solutions de Zn^{2+} contenant 10^{-2} M Na^{+} et 10^{-5} M Ca^{2+} dans une solution tamponnée de HEPES à pH 7.0 sur une résine échangeuse d'ions. L'expérience faite sur 330 minutes (cercles rouges) était réalisée avec une masse de résine de 11.4 mg alors que l'expérience faite sur 200 minutes (cercles verts) était réalisée avec une résine de masse 52.2 mg. Les lignes pointillées vertes et rouges représentent les concentrations totales des solutions injectées dans les colonnes de résine. Leurs concentrations respectives sont $350 \mu g L^{-1}$ et $338 \mu g L^{-1}$.

Dans les solutions utilisées pour la percolation, il faut mentionner la présence d'ions compétiteurs avec le Zn^{2+} pour un site commun sur la résine, soit Ca^{2+} et Na^{+} présents dans les solutions de HEPES. Pour une concentration identique, le zinc libre possède une meilleure affinité pour les sites de la résine mais dans le contexte de l'expérience, les ions Ca^{2+} et Na^{+} ont des concentrations respectives de 10^{-5} M et 10^{-2} M qui sont plus élevées que ceux du Zn^{2+} (5.1 et 5.3×10^{-6} M). Ce genre de phénomène a été observé avec le nickel (Worms and Wilkinson 2008). Le temps d'équilibre était supérieur à 200 minutes lorsque la concentration en Na^{+} était 10^{-2} M. A une force ionique plus élevée, il est possible de diminuer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, cependant cette modification risque de changer la

3. Résultats supplémentaires

spéciation du Zn. Également, notre but était de préserver les mêmes conditions que celles utilisées pour la bioaccumulation. La technique d'échangeuse d'ions ne s'avère donc pas une solution viable pour la détermination du zinc libre dans les solutions contenant les différentes nanoparticules. Ceci est donc la raison pour laquelle la technique SSCP a été utilisée à cette fin afin de déterminer le zinc libre et dissous (se référer aux informations supplémentaires de l'article, section 2.8.3).

4. Conclusions et perspectives :

Cette étude a confirmé, sans aucun doute, que la nature d'un enrobage joue un rôle primordial dans le comportement des nanoparticules testées, et en conséquence la bioaccumulation obtenue. Un temps considérable a été consacré au choix et à l'approfondissement de techniques de spéciation afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles sur la dissolution. Les nanoparticules nZnO et nZnO-PAA ont montré une bioaccumulation dépendante de la quantité de Zn dissous provenant de ces particules. Cependant, contre toute attente, nZnO-HMP a affiché une bioaccumulation accrue par rapport au zinc libre. Il en découle évidemment une importance capitale du choix de l'enrobage pour les stabilisations des nanoparticules car cela pourrait affecter les organismes d'eaux douces, comme cela a été le cas avec notre algue modèle. Il reste à savoir si cela pourrait s'appliquer à d'autres types d'espèces retrouvées dans les milieux naturels.

Bien que très peu d'études aient été publiées sur l'internalisation des nanoparticules de zinc en tenant compte de leurs produits de dissolution, il serait fort intéressant de réussir à élucider ce mystère selon lequel il est possible ou pas d'observer une bioaccumulation des nanoparticules de zinc. Cela aiderait dans la distinction de la toxicité provenant des nanoparticules elles-mêmes et de leur produit de dissolution. Présentement, une pléthore d'études dans la littérature montre la dissolution des nZnO comme étant l'hypothèse la plus soutenue de la toxicité face aux divers organismes naturels.

5. Bibliographie

5. Bibliographie

- Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res* 40 (19):3527-3532. doi:10.1016/j.watres.2006.08.004
- Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, Hull M (2006) Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup Med (Lond)* 56 (5):300-306
- Alivisatos AP, Gu W, Larabell C (2005) Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng* 7:55-76, 53 plates. doi:10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100432
- American Society for Testing and Materials (2006) Standard terminology relating to nanotechnology. West Conshohocken, PA
- Aragon SR, Pecora R (1975) Fluorescence Correlation Spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J Chem Phys* 64:1791-1803. doi:doi: 10.1063/1.432357
- Arepalli S, Nikolaev P, Holmes W, Files BS (2001) Production and measurements of individual single-wall nanotubes and small ropes of carbon. *Appl Phys Lett* 78 (11):1610-1612. doi:10.1063/1.1352659
- Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 407 (4):1461-1468. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.053
- Bagkar N, Ganguly R, Choudhury S, Hassan PA, Sawant S, Yakhmi JV (2004) Synthesis of surfactant encapsulated nickel hexacyanoferrate nanoparticles and deposition of their Langmuir–Blodgett film. *J Mater Chem* 14:1430-1436. doi:doi: 10.1039/b315866g

5. Bibliographie

- Batley GE, Kirby JK, McLaughlin MJ (2013) Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Acc Chem Res* 46 (3):854-862. doi:10.1021/ar2003368
- Bellardita M, Addamo M, Di PA, Palmisano L (2007) Photocatalytic behavior of metal-loaded TiO₂ aqueous dispersions and films. *Chem Phys* 339 (1-3):94-103. doi:10.1016/j.chemphys.2007.06.003
- Bian S-W, Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Grassian VH (2011) Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. *Langmuir* 27 (10):6059-6068. doi:10.1021/la200570n
- British Standards Institution (2007) Terminology for nanomaterials. London, UK.
- Brunet L, Lyon DY, Hotze EM, Alvarez PJJ, Wiesner MR (2009) Comparative Photoactivity and Antibacterial Properties of C₆₀ Fullerenes and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environ Sci Technol* 43 (12):4355-4360. doi:10.1021/es803093t
- Buffle J, Wilkinson KJ, Stoll S, Filella M, Zhang J (1998) A Generalized Description of Aquatic Colloidal Interactions: The Three-colloidal Component Approach. *Environ Sci Technol* 32 (19):2887-2899. doi:10.1021/ES980217H
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3 (1):3-8
- Campbell PGC, Errecalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* 133C (1-2):189-206. doi:10.1016/S1532-0456(02)00104-7

5. Bibliographie

- Chen P, Powell BA, Mortimer M, Ke PC (2012) Adaptive interactions between zinc oxide nanoparticles and *Chlorella* sp. *Environ Sci Technol* 46 (21):12178-12185. doi:10.1021/es303303g
- Chiang LY, Bhonsle JB, Wang L, Shu SF, Chang TM, Hwu JR (1996) Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols. *Tetrahedron* 52 (14):4963-4972. doi:10.1016/0040-4020(96)00104-4
- Dabrowski A (2001) Adsorption - from theory to practice. *Adv Colloid Interface Sci* 93 (1-3):135-224. doi:10.1016/S0001-8686(00)00082-8
- Danovaro R, Bongiorno L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, Greci L, Pusceddu A (2008) Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ Health Perspect* 116 (4):441-447. doi:10.1289/ehp.10966
- DeFord DD, Hume DN (1951) The determination of consecutive formation constants of complex ions from polarographic data. *J Am Chem Soc* 73:5321-5322. doi:doi:10.1021/ja01155a093
- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN (2004) Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett* 4 (1):11-18. doi:10.1021/nl0347334
- Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y, Reid MM, Tufenkji N, Lead JR, Leppard GG, Wilkinson KJ (2009) Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol* 43:7277-7284. doi:doi: 10.1021/es900249m
- Domingos RF, Benedetti MF, Pinheiro JP (2007) Application of permeation liquid membrane and scanned stripping chronopotentiometry to metal speciation analysis of colloidal complexes. *Anal Chim Acta* 589:261-268. doi:doi:10.1016/J.ACA.2007.02.056

5. Bibliographie

- Domingos RF, Franco C, Pinheiro JP (2013a) Stability of core/shell quantum dots - role of pH and small organic ligands. *Environ Sci Pollut Res* 20:4872-4880. doi:10.1007/s11356-012-1457-0
- Domingos RF, Huidobro C, Companys E, Galceran J, Puy J, Pinheiro JP (2008) Comparison of AGNES (absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping) and SSCP (scanned stripping chronopotentiometry) for trace metal speciation analysis. *J Electroanal Chem* 617:141-148. doi:10.1016/J.JELECHEM.2008.02.002
- Domingos RF, Rafiei Z, Monteiro CE, Khan MAK, Wilkinson KJ (2013b) Agglomeration and dissolution of zinc oxide nanoparticles: role of pH, ionic strength and fulvic acid. *Environ Chem* 10 (4):306-312. doi:10.1071/EN12202
- Domingos RF, Simon DF, Hauser C, Wilkinson KJ (2011) Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticles or the Free Ions? *Environ Sci Technol* 45 (18):7664-7669. doi:10.1021/es201193s
- Elsaesser A, Howard CV (2012) Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Delivery Rev* 64 (2):129-137. doi:10.1016/j.addr.2011.09.001
- Elson EL, Magde D (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* 13:1-27. doi:10.1002/BIP.1974.360130102
- Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS (2007) Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environ Sci Technol* 41 (24):8484-8490. doi:10.1021/es071445r
- Gendron P-O, Avaltroni F, Wilkinson KJ (2008) Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance and

5. Bibliographie

- fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluoresc* 18:1093-1101.
doi:doi:10.1007/S10895-008-0357-7
- Gilles AM, Glaser P, Perrier V, Meier A, Longin R, Sebald M, Maignan L, Pistotnik E, Barzu O (1994) Zinc, a structural component of adenylate kinases from Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 176 (2):520-523
- Gottschalk F, Nowack B (2011) The release of engineered nanomaterials to the environment. *J Environ Monit* 13 (5):1145-1155. doi:10.1039/c0em00547a
- Hadioui M, Leclerc S, Wilkinson KJ (2013) Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* 105:15-19. doi:10.1016/j.talanta.2012.11.048
- Hassler CS, Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2004a) Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol Oceanogr: Methods* 2 2:237-247
- Hassler CS, Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2004b) Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ Toxicol Chem* 23 (2):283-291. doi:10.1897/03-149
- He W, Yan S, Wang Y, Zhang X, Zhou W, Tian X, Sun X, Han X (2009) Biomimetic synthesis of mesoporous zinc phosphate nanoparticle. *J Alloy Compd* 477:657-660. doi:doi: 10.1016/j.jallcom.2008.10.136
- Hebeler M, Hentrich S, Mayer A, Leibfritz D, Grimme LH (1992) Phosphate regulation and compartmentation in *Chlamydomonas reinhardtii* studied by in vivo ³¹P-NMR. In: Murat N (ed) *Research in photosynthesis*. Kluwer, The Netherlands, pp 717-720
- Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna*

5. Bibliographie

- and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71:1308-1316. doi:doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.047
- Hudson RJM, Morel FMM (1990) Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol Oceanogr* 35 (5):1002-1020. doi:10.4319/lo.1990.35.5.1002
- Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, Pocock R, Imani M, Seifalian AM (2007) Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28 (31):4717-4732. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.014
- Ju-Nam Y, Lead JR (2008) Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ* 400 (1-3):396-414. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.042
- Kaegi R, Ulrich A, Sinnet B, Vonbank R, Wichser A, Zuleeg S, Simmler H, Brunner S, Vonmont H, Burkhardt M, Bollner M (2008) Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ Pollut (Oxford, U K)* 156 (2):233-239. doi:10.1016/j.envpol.2008.08.004
- Kaegi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M, Siegrist H (2011) Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environ Sci Technol* 45 (9):3902-3908. doi:10.1021/es1041892
- Kariuki S, Dewald HD (1996) Evaluation of diffusion coefficients of metallic ions in aqueous solutions. *Electroanalysis* 8:307-313. doi:doi: 10.1002/elan.1140080402
- Keller AA, Wang H, Zhou D, Lenihan HS, Cherr G, Cardinale BJ, Miller R, Ji Z (2010) Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. *Environ Sci Technol* 44 (6):1962-1967. doi:10.1021/es902987d

5. Bibliographie

- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27 (9):1825-1851. doi:10.1897/08-090.1
- Kola H, Laglera LM, Parthasarathy N, Wilkinson KJ (2004) Cadmium adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environ Chem* 1 (3):172-179. doi:10.1071/EN04061
- Kola H, Wilkinson KJ (2005) Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ Sci Technol* 39:3040-3047. doi:doi:10.1021/es048655d
- Lavoie M (2010) Toxiques les métaux? Les modèles écotoxicologiques aident à y voir plus clair. Capsule INRSciences, no. 9, INRS
- Lead JR, Wilkinson KJ (2006) Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends. *Environ Chem* 3 (3):159-171. doi:10.1071/EN06025
- Lekas D (2005) Analysis of nanotechnology from an industrial ecology perspective. Part II: Substance flow analysis of carbon nanotubes. Project on Emerging Nanotechnologies Report. Woodrow Wilson International Centre for Scholars, Washington, DC
- Leung YH, Chan CM, Ng AM, Chan HT, Chiang MW, Djuricic AB, Ng YH, Jim WY, Guo MY, Leung FC, Chan WK, Au DT (2012) Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. *Nanotechnology* 23:475703-475715. doi:doi: 10.1088/0957-4484/23/47/475703

5. Bibliographie

- Li M, Lin D, Zhu L (2013) Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to *Escherichia coli*. *Environ Pollut (Oxford, U K)* 173:97-102. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.026
- Li M, Zhu L, Lin D (2011) Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environ Sci Technol* 45:1977-1983. doi:doi:10.1021/es102624t
- Limbach LK, Bereiter R, Muller E, Krebs R, Galli R, Stark WJ (2008) Removal of Oxide Nanoparticles in a Model Wastewater Treatment Plant: Influence of Agglomeration and Surfactants on Clearing Efficiency. *Environ Sci Technol* 42 (15):5828-5833. doi:10.1021/es800091f
- Lowry GV, Gregory KB, Apte SC, Lead JR (2012) Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol* 46 (13):6893-6899. doi:10.1021/es300839e
- Luoma SN (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Sci Total Environ* 28:1-22. doi:10.1016/S0048-9697(83)80004-7
- Lv J, Zhang S, Luo L, Han W, Zhang J, Yang K, Christie P (2012) Dissolution and microstructural transformation of ZnO nanoparticles under the influence of phosphate. *Environ Sci Technol* 46:7215-7221. doi:doi: 10.1021/es301027a
- Ma H, Bertsch PM, Glenn TC, Kabengi NJ, Williams PL (2009) Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 28:1324-1330. doi:doi: 10.1897/08-262.1
- Ma H, Williams PL, Diamond SA (2013) Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environ Pollut (Oxford, U K)* 172:76-85. doi:10.1016/j.envpol.2012.08.011

5. Bibliographie

- Maillard J-Y, Hartemann P (2013) Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol* 39 (4):373-383. doi:10.3109/1040841X.2012.713323
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* 157 (2):183-193. doi:10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Echal-Drouard LM, Marshall WF, Qu L-H, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Team CA, Team JA, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-251. doi:doi: 10.1126/science.1143609
- Miao A-J, Zhang X-Y, Luo Z, Chen CS, Chin W-C, Santschi PH, Quigg A (2010) Zinc oxide-engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environ Toxicol Chem* 29:2814-2822. doi:doi: 10.1002/etc.340
- Miller RJ, Lenihan HS, Muller EB, Tseng N, Hanna SK, Keller AA (2010) Impacts of Metal Oxide Nanoparticles on Marine Phytoplankton. *Environ Sci Technol* 44 (19):7329-7334. doi:10.1021/es100247x
- Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E (2012) The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ* 438:225-232. doi:doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.066
- Morel FMM, Hering JG (1993) Principles and applications of aquatic chemistry. John Wiley & Sons,

5. Bibliographie

- Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Wu C-M, Grassian VH (2012) Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir* 28:396-403. doi:doi: 10.1021/la203542x
- Mueller NC, Nowack B (2008) Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environ Sci Technol* 42 (12):4447-4453. doi:10.1021/es7029637
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi PH, Sigg L (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17 (5):372-386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0
- Nel A, Xia T, Maedler L, Li N (2006) Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* (Washington, DC, U S) 311 (5761):622-627. doi:10.1126/science.1114397
- Niemeyer CM (2001) Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew Chem, Int Ed* 40 (22):4128-4158. doi:10.1002/1521-3773(20011119)40:22<4128::AID-ANIE4128>3.0.CO;2-S
- Nowack B, Ranville JF, Diamond S, Gallego-Urrea JA, Metcalfe C, Rose J, Horne N, Koelmans AA, Klaine SJ (2012) Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ Toxicol Chem* 31 (1):50-59. doi:10.1002/etc.726
- O'Carroll D, Sleep B, Krol M, Boparai H, Kocur C (2013) Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources* 51 (0):104-122. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.02.005>
- Parab HJ, Huang J-H, Lai T-C, Jan Y-H, Liu R-S, Wang J-L, Hsiao M, Chen C-H, Hwu Y-K, Tsai DP, Chuang S-Y, Pang J-HS (2011) Biocompatible transferrin-conjugated sodium hexametaphosphate-stabilized gold nanoparticles: synthesis, characterization,

5. Bibliographie

- cytotoxicity and cellular uptake. *Nanotech* 22:395706-395713. doi:doi:10.1088/0957-4484/22/39/395706
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 14 (9):1-11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Pinheiro JP, van Leeuwen HP (2004) Scanned stripping chronopotentiometry of metal complexes: lability diagnosis and stability computation. *J Electroanal Chem* 570:69-75. doi:doi:10.1016/J.JELECHEM.2004.03.016
- Planken KL, Colfen H (2010) Analytical ultracentrifugation of colloids. *Nanoscale* 10:1849-1869. doi:doi: 10.1039/c0nr00215a
- Pomogailo AD, Kestelman VN (2005) Principles and mechanisms of nanoparticle stabilization by polymers. In: *Metallopolymer Nanocomposites*, vol 81. Springer, Berlin Heidelberg,
- Poole C, Owens F (2003) *Introduction to nanotechnology*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey
- Roberts SB, Lane TW, Morel FMM (1997) Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 33 (5):845-850. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00845.x
- Santomauro G, Srot V, Bussmann B, van APA, Bruemmer F, Strunk H, Bill J (2012) Biomineralization of zinc-phosphate-based nano needles by living microalgae. *J Biomater Nanobiotechnol* 3 (3):362-370. doi:10.4236/jbnb.2012.33034
- Schelter EJ (2013) Cerium under the lens. *Nat Chem* 5 (4):348-348
- Schmid G (2004) *Nanoparticles: From theory to application*. Wiley-VCH, Weinheim

5. Bibliographie

- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2007) The appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing the risks the risks of nanomaterials. Brussels, Belgium
- Singh S, Thiagarajan P, Kant KM, Anita D, Thirupathiah S, Rama N, Tiwari B, Kottaisamy M, Rao MSR (2007) Structure, microstructure and physical properties of ZnO based materials in various forms: bulk, thin film and nano. *J Phys D: Appl Phys* 40 (20):6312-6327. doi:10.1088/0022-3727/40/20/S15
- Sivry Y, Gelabert A, Cordier L, Ferrari R, Lazar H, Juillot F, Menguy N, Benedetti MF (2014) Behavior and fate of industrial zinc oxide nanoparticles in a carbonate-rich river water. *Chemosphere* 95:519-526. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.110
- Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model. *Environ Chem* 2:9-24. doi:doi:10.1071/EN04076
- Starchev K, Wilkinson KJ, Buffle J (2000) Application of fluorescence correlation spectroscopy to the study of environmental systems. In: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications* Springer, Heidelberg, pp 251-275
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17 (1):3-8
- Vallee BL, Auld DS (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29 (24):5647-5659. doi:10.1021/bi00476a001

5. Bibliographie

- Vercauteren K, Blust R (1996) Bioavailability of dissolved zinc to the common mussel *Mytilus edulis* in complexing environments. *Mar Ecol: Prog Ser* 137 (1 to 3):123-132. doi:10.3354/meps137123
- Vetterl V, Boháček J (1968) Interaction of polyphosphate with the mercury electrode surface. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 16:313-318. doi:doi: 10.1016/S0022-0728(68)80078-6
- Wang ZL (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *J Phys: Condens Matter* 16:R829-R858. doi:doi: 10.1088/0953-8984/16/25/R01
- Warad HC, Ghosh SC, Hemtanon B, Thanachayanont C, Dutta J (2005) Luminescent nanoparticles of Mn doped ZnS passivated with sodium hexametaphosphate. *Sci Technol Adv Mat* 6:296-301. doi:doi:10.1016/j.stam.2005.03.006
- Werner TP, Amrhein N, Freimoser FM (2007) Inorganic polyphosphate occurs in the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* and accumulates during cytokinesis. *BMC Plant Biol* 7:51-62. doi:doi:10.1186/1471-2229-7-51
- Widengren J, Mets U, Rigler R (1995) Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J Phys Chem* 99:13368-13379. doi:doi:10.1021/J100036A009
- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76:1356-1365. doi:doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.025
- Wilkinson KJ, Buffle J (2004) Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modeling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic)

5. Bibliographie

- systems. In: van Leeuwen HP, Koester W (eds) Physicochemical kinetics and transport at chemical - biological interphases. Wiley, Chichester, pp 445-533
- Wong SWY, Leung PTY, Djurisic AB, Leung KMY (2010) Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: Influences of aggregate size and ion solubility. *Anal Bioanal Chem* 396 (2):609-618. doi:10.1007/s00216-009-3249-z
- Woodrow Wilson International Center for Scholars. A nanotechnology consumer products inventory. www.nanotechproject.org/consumerproducts (2013).
- Worms IAM, Wilkinson KJ (2008) Determination of Ni²⁺ using an equilibrium ion exchange technique: Important chemical factors and applicability to environmental samples. *Anal Chim Acta* 616 (1):95-102. doi:10.1016/j.aca.2008.04.004
- Yin H, Casey PS, McCall MJ, Fenech M (2010) Effects of surface chemistry on cytotoxicity, genotoxicity, and the generation of reactive oxygen species induced by ZnO nanoparticles. *Langmuir* 26:15399-15408. doi:doi: 10.1021/la101033n
- Yu R-Q, Wang W-X (2004) Biological uptake of Cd, Se(IV) and Zn by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to different phosphate and nitrate additions. *Aquatic Microbial Ecology* 35 (2):163-173. doi:10.3354/ame035163
- Zhang F, Chan S-W, Spanier JE, Apak E, Jin Q, Robinson RD, Herman IP (2002) Cerium oxide nanoparticles: Size-selective formation and structure analysis. *Appl Phys Lett* 80 (1):127-129. doi:10.1063/1.1430502