



**HAL**  
open science

**Ecotoxicité des nanoparticules et des sous produits  
d'altération de dioxyde de titane sur le ver de terre,  
*Eisenia fetida***

Emilie Bigorgne

► **To cite this version:**

Emilie Bigorgne. Ecotoxicité des nanoparticules et des sous produits d'altération de dioxyde de titane sur le ver de terre, *Eisenia fetida*. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2011. Français. NNT : 2011METZ034S . tel-01749081

**HAL Id: tel-01749081**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749081>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse de doctorat présentée par

**Emilie BIGORGNE**

en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'université Paul Verlaine- Metz  
**mention Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes**

# ECOTOXICITE DES NANOPARTICULES ET DES SOUS PRODUITS D'ALTERATION DE DIOXYDE DE TITANE SUR LE VER DE TERRE, *EISENIA FETIDA*

Soutenue publiquement le **15 novembre 2011** devant le jury composé de

A. THIERY	Professeur, Université de Provence	Rapporteur
F. VANDENBULCKE	Professeur, Université Lille 1	Rapporteur
J-Y. BOTTERO	Directeur de recherche, Université Aix/Marseille	Examineur
C. MOUNEYRAC	Professeur, Université Catholique de l'Ouest, Angers	Examineur
F. RODIUS	Maître de Conférences, Université Paul Verlaine-Metz	Directeur de thèse
J. NAHMANI	Chargé de recherche CNRS	Co-directeur de thèse
L. FOUCAUD	Maître de Conférences, Université Paul Verlaine-Metz	Encadrant scientifique
A. BISPO	Ingénieur, ADEME	Invité



## REMERCIEMENTS

*Il est temps pour moi de faire le bilan de ces 3 années inoubliables et de remercier l'ensemble des personnes qui ont participé à l'aboutissement de ce travail.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse Johanne Nahmani et François Rodius. Honneur aux dames, j'adresse mes premiers remerciements à Johanne pour son aide précieuse (même envers un certain blaireau), son soutien et sa disponibilité jusqu'au bout du monde... Mes remerciements s'adressent également à François, pour ses conseils avisés, sa confiance, sa disponibilité et sa passion pour le seigneur des anneaux...*

*Je remercie chaleureusement Laurent Foucaud pour son dynamisme, ses conseils, et pour avoir participé à mon encadrement scientifique. Un grand merci pour tout le temps qu'il a su m'accorder en parallèle de ses nouvelles activités. Je lui souhaite bonne chance et réussite pour cette nouvelle expérience...*

*J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : Catherine Mouneyrac, Jean-Yves Bottero, Antonio Bispo, ainsi que Alain Thiéry et Franck Vandenbulcke qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail.*

*Je remercie les membres de mon comité de pilotage de thèse Marie Carrière, Jérôme Labille et Antonio Bispo. Ces réunions ont été l'occasion pour moi de faire le point sur l'avancée de mes travaux et de prendre du recul.*

*Je remercie également l'Agence de l'Environnement et de Maîtrise de l'Energie (ADEME), la région Lorraine et le GdRi iCEINT pour leur soutien financier. Un grand merci au LIEBE, particulièrement à Laure Giambérini et François Guérol, pour avoir participé au bon démarrage de ma thèse.*

*Je tiens à remercier l'ADEME et ses journées des doctorants qui m'ont permis de rencontrer Camille Larue, doctorante au CEA. Je la remercie pour nos nombreux échanges d'emails sur nos travaux respectifs, nos projets à venir et pour les bons moments passés ensemble en congrès.*

*Cette thèse a été le fruit de nombreuses collaborations notamment pour la caractérisation des nanomatériaux. Je tiens à remercier l'équipe du CEREGE : Jérôme Labille, Jérôme Rose, Céline Botta, Perrine Chaurand pour leur accueil et leur disponibilité au cours de mon séjour à Aix en Provence et à distance via l'analyse de mes vers par  $\mu$ -XRF. Je remercie plus*

*particulièrement Jérôme Labille et Céline Botta pour m'avoir initiée aux techniques de granulométrie et de turbidimétrie, pour tous les envois de SPA altérés et pour la disponibilité de Jérôme L. pour répondre à mes nombreuses questions.*

*J'ai eu également l'occasion de travailler avec le LEM à Vandoeuvre-Lès-Nancy et je remercie Céline Caillet et Fabien Thomas pour notre collaboration sur le comportement des P25 dans le milieu de culture et leur précieux conseils.*

*Je tiens à remercier l'équipe de Bioforsk en Norvège et plus particulièrement, Emmanuel Lapiéd pour ses connaissances sur les vers et la réalisation des tests apoptose ainsi qu'Erik Joner pour nos échanges constructifs au moment de la rédaction de notre article. Je remercie également Catherine Sirguy du LSE à Vandoeuvre-Lès-Nancy, pour m'avoir appris à minéraliser mes vers de terre.*

*Je remercie l'équipe de direction du LIEBE avec Monsieur Jean-François Férard, et Madame Pascale Bauda pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LIEBE que j'ai pu côtoyer avec une pensée particulière pour Carole, Laure, Sandrine et Simon. Je remercie bien sûr Christophe et Stéphane pour la préparation des nanos, Nelly pour toute l'énergie qu'elle a donnée pour les coupes ultra-fines (et aussi pour ses dons d'infirmière, encore merci !), Chantal pour sa bonne humeur, Jonathan, Françoise et Bénédicte, les derniers arrivés. Je remercie également Catherine et Maryline pour leur aide en matière de démarches administratives; Mireille et ses info-docs annonceurs du WE ; Yann W., notre héros de l'informatique; Rosy, Nathalie, Jean-François, les Philippe(s) et Etienne pour leur bonne humeur!*

*Enfin merci à notre authentique maître des clefs, pour avoir ravivé nos fins de journées ou début de soirées au labo !*

*Je remercie l'équipe de Thionville Laurent, Amar, Catherine, Aynur, Stéphane, Claudia, Didier, Nicolas et M. Falla pour m'avoir accueillie au laboratoire de l'IUT. Merci à tous pour votre disponibilité, convivialité et votre esprit d'équipe, c'était un plaisir de venir travailler à l'IUT !*

*Enfin, un grand merci aux anciens du labo, Anne-Marie pour l'élevage des vers, un travail de longue haleine que j'ai avec regret du mal à maintenir depuis son départ, Claudine pour sa rigueur et sa sympathie, Marie-Aline pour nos longues discussions et sa gentillesse (bonne chance pour la suite !), Marc pour m'avoir fait découvrir les joies de la recherche, Aurélie pour m'avoir fait découvrir les joies de la bio mol, Anne-So pour m'avoir inculqué le*

*stoïcisme, et Renaud, alias « kayakman », pour les bons souvenirs des soirées passées ensemble !*

*Je tiens à remercier chaleureusement mon bureau et plus particulièrement la « girl team » que j'ai formée avec Fanny et Apolline, merci les filles ! Je n'oublierai pas nos fabuleux paris récompensés par des apéros Buffalo... Apo, grâce à toi ma vie roule comme sur des « Heelys », et Fanny, merci pour ton franc parler presque Franc-comtois..., encore merci pour toutes les fois où tu m'as raccompagnée avec ta Visa. Merci aux garçons, Manu et Julio, pour nous avoir supportées, ça n'était pas de tout repos ! Bonne continuation à tous les 2 !*

*Je remercie également Laetitia M. et Tiphaine pour notre soutien mutuel pendant la rédaction, Yann L. et Karen pour m'avoir aidée (entre autres) à dompter le cytomètre, mille mercis à tous les deux ! Merci à Cédric, Céline, Pascal, Nelly, Olivier et Hela, pour leur sympathie. Un grand merci à Audrey alias la plante carnivore et Jésus, Eric alias Esteban et Indiana Jones, Hugues alias D. House et Abby, Cécile ou le Petit Chaperon Rouge et Letitia R. la star des années folles, pour toutes les soirées passées ensembles, que de bons souvenirs ! Elvis vous dit merci à toutes et à tous !*

*Enfin, je remercie mes proches qui me supportent depuis bien avant la thèse... et j'ai une pensée particulière pour mes amis (Jonathan, Christelle, Emilie, Linsey, Sylvain) et pour les moments privilégiés passés ensemble ! Je remercie de tout cœur ma famille toujours présente à mes côtés et plus particulièrement mes parents, pour leur confiance et leur soutien à toute épreuve !*

*Pierrick, mon mari, mon supporter de tous les instants, merci pour tout ! Je crois qu'il est temps de nous tourner vers de nouvelles aventures...*

## Résumé

La production et l'utilisation des nanomatériaux manufacturés est en plein essor, ce qui entraîne leur déversement dans l'environnement sous forme de nanoparticules ou de sous produits d'altération. Les nanoparticules de dioxyde de titane sont utilisées dans un grand nombre de produits manufacturés du fait de leurs propriétés photocatalytiques et d'absorption des UV. Les risques écotoxicologiques liés aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et aux sous produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  sur les organismes terrestres sont encore peu connus. A cette fin, des vers de terre ont été utilisés car ce sont des indicateurs clés de la qualité des écosystèmes terrestres. L'espèce *Eisenia fetida* employée présente l'avantage d'être facile à manipuler et est utilisée dans des tests normalisés d'écotoxicité. La toxicité potentielle des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et des sous produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  sur *Eisenia fetida* a été étudiée selon différentes approches: un test *in vitro* sur les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (1 à 25  $\mu\text{g/ml}$ ), une exposition *in vivo* en milieu liquide contaminé par des SPA de  $\text{TiO}_2$  (0,1 à 10  $\text{mg/l}$ ) et une exposition *in vivo* en milieu solide dans des sols artificiels contaminés par des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (2 à 200  $\text{mg/kg}$ ) ou par des sous produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  (2-20  $\text{mg/kg}$ ). La toxicité des nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  a été évaluée en utilisant une batterie de biomarqueurs à différentes échelles biologiques : la survie et la reproduction à l'échelle de l'individu, la viabilité cellulaire (test MTT et LDH), la phagocytose et l'apoptose à l'échelle cellulaire et l'expression des ARNm des gènes des systèmes de détoxification (métallothionéine, GST), antioxydant (SOD, CAT) et immunitaire (CCF et fétidines) par RT-qPCR à l'échelle moléculaire. Nos résultats ont montré que les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sont internalisées par les cellules immunitaires des vers de terre (*in vitro*) et que le titane est bioaccumulé par les vers exposés aux sous-produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  dans des conditions d'exposition artificielle (milieu liquide). Seuls les biomarqueurs moléculaires (métallothionéine, CCF et fétidines) sont sensibles aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  dans le test *in vitro* alors que les biomarqueurs moléculaire (métallothionéine et SOD) et cellulaire (apoptose et phagocytose) répondent aux sous-produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  en milieu liquide après seulement 24h d'exposition. En revanche, dans des conditions d'exposition plus réalistes, aucun effet biologique sur la survie, la reproduction et l'expression des ARNm des gènes de détoxification, antioxydant et immunitaire n'a été observé sur les vers exposés aux sols contaminés. La faible biodisponibilité des nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  dans les matrices solides expliquerait l'absence d'effet biologique aux concentrations testées. Ces travaux soulignent la nécessité d'étudier le comportement, la mobilité, et la biodisponibilité des nanomatériaux avant d'évaluer leur potentielle écotoxicité.

**Mots clés :**  $\text{TiO}_2$ , Nanoparticules, Sous-Produits d'Altération, Ver de terre, Ecotoxicité, Biomarqueurs



## Abstract

The amount of nanomaterials produced annually is constantly increasing and this trend may result in a strong input of manufactured nanoparticles in air, water, soils, and therefore in contact with organisms. Among the manufactured nanoparticles, titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles have been produced massively for their photocatalytic properties and UV absorption ability. Surprisingly, ecotoxicological risks associated with TiO<sub>2</sub> nanoparticles and TiO<sub>2</sub> byproducts resulting from the alteration and aging of nanomaterials are poorly documented on terrestrial organisms. The potential toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and TiO<sub>2</sub> byproducts on the earthworm *Eisenia fetida* has been evaluated, using different approaches: the first with *in vitro* assay to determine toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (1 to 25 µg/ml), the second with *in vivo* exposure of earthworm to liquid medium contaminated by TiO<sub>2</sub> byproducts (0.1 to 10 mg/l) and the third with *in vivo* exposure to artificial soil contaminated by TiO<sub>2</sub> nanoparticles (2 to 200 mg/kg) or TiO<sub>2</sub> byproducts (2-20 mg/kg). Ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanomaterials was determined using a battery of biomarkers at different biological levels: survival and reproduction at individual level, cell viability (MTT and LDH assay), phagocytosis and apoptosis at cellular level, mRNA expression of detoxification (metallothioneins, GST), antioxidant (SOD, CAT) and immune genes (CCF and fetidins) by RT-qPCR at molecular level. Our results showed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles were internalized by immune cells (*in vitro* assay) and titanium was bioaccumulated by worms exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts in artificial exposure assay (liquid medium). Molecular biomarkers (metallothioneins, CCF and fetidins) were sensitive to TiO<sub>2</sub> nanoparticles after *in vitro* exposures, while both molecular (metallothioneins and SOD) and cellular (phagocytosis, apoptosis) biomarkers were sensitive to TiO<sub>2</sub> byproducts in liquid medium after only 24 hours of exposure. In contrast, in more realistic conditions of exposure, no effect on life-history traits or molecular biomarker were noticed on earthworms exposed to soils contaminated by TiO<sub>2</sub> nanoparticles or byproducts. A low bioavailability of TiO<sub>2</sub> nanomaterials in soil matrixes could explain the lack of effect at the concentrations tested. These results underline the necessity to evaluate mobility, behaviour and bioavailability of nanomaterials in soil matrixes before their ecotoxicity assessment.

**Key words:** TiO<sub>2</sub>, nanoparticles, Byproducts, Earthworm, Ecotoxicity, Biomarkers

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. LES NANOMATERIAUX : ENJEUX, PROPRIETES ET RISQUES .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Développement des nanotechnologies.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Contexte économique .....	5
1.1.2. Réglementation.....	6
<b>1.2. Présentation .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Définitions .....	7
1.2.2. Origine naturelle ou anthropique .....	8
1.2.3. Propriétés et applications .....	8
1.2.4. Stabilité des nanoparticules .....	10
<b>1.3. Les Nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Propriétés des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	12
1.3.2. Les nanoparticules de TiO <sub>2</sub> dans l'environnement.....	13
<b>2. LES VERS DE TERRE, ORGANISMES BIOINDICATEURS DE LA QUALITE DES SOLS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Les vers de terre .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. L'espèce, <i>Eisenia fetida</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>3. ECOTOXICITE DES NANOMATERIAUX A DIFFERENTES ECHELLES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Effets sur les systèmes antioxydant et de détoxification.....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Protéines des systèmes antioxydant et de détoxification .....	17
3.1.2. Effet des nanomatériaux sur le système antioxydant.....	19
3.1.2.1. Organismes aquatiques .....	19
3.1.2.2. Organismes terrestres : Approche toxicologique .....	22
3.1.2.3. Organismes terrestres : Approche environnementale .....	22
<b>3.2. Biomarqueur cellulaire .....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Viabilité cellulaire .....	25
3.2.1.1. Le test MTT .....	25
3.2.1.2. Le test LDH .....	26
3.2.1.3. Organismes terrestres : Approche toxicologique .....	26
3.2.2. Apoptose .....	30
3.2.2.1. Organismes aquatiques .....	31
3.2.2.2. Organismes terrestres : Approche toxicologique .....	31

3.2.2.3.	Organismes terrestres : Approche environnementale .....	32
<b>3.3.</b>	<b>Biomarqueurs du système immunitaire.....</b>	<b>33</b>
3.3.1.	Cellules du système immunitaire du ver de terre .....	33
3.3.2.	Phagocytose .....	34
3.3.2.1.	Organismes terrestres : Approche toxicologique .....	34
3.3.2.2.	Organismes terrestres : Approche environnementale .....	34
3.3.3.	Expression des ARNm des gènes du système immunitaire des vers de terre: Fétidines et CCF .....	36
<b>3.4.</b>	<b>Traits d'histoire de vie (THV) .....</b>	<b>38</b>
3.4.1.	Organismes aquatiques.....	38
3.4.2.	Organismes terrestres : Approche environnementale.....	43
<b>4.</b>	<b>BILAN.....</b>	<b>48</b>
<b>DEMARCHE SCIENTIFIQUE .....</b>		<b>49</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>		<b>52</b>
<b>1. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES ET SOUS-PRODUITS</b>		
<b>D'ALTERATION DE TiO<sub>2</sub>.....</b>		<b>53</b>
<b>1.1.</b>	<b>Présentation des nanomatériaux.....</b>	<b>53</b>
1.1.1.	Sous produits d'altération (SPA) de dioxyde de titane .....	53
1.1.2.	Nanoparticules de dioxyde de titane (NP TiO <sub>2</sub> , P-25) .....	54
<b>1.2.</b>	<b>Techniques de caractérisations physico-chimiques.....</b>	<b>55</b>
1.2.1.	Granulométrie par diffraction laser .....	55
1.2.2.	Turbidimètre .....	56
1.2.3.	Microscopie électronique à transmission (MET).....	56
1.2.4.	Micro spectroscopie à fluorescence X (μ-XRF).....	57
1.2.5.	Analyse chimique en solution : ICP-AES .....	58
<b>2.</b>	<b>MODELE BIOLOGIQUE .....</b>	<b>60</b>
<b>2.1.</b>	<b>Milieu d'élevage .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2.</b>	<b>Protocoles d'extrusion des cœlomocytes.....</b>	<b>60</b>
2.2.1.	Technique par agent mucolytique .....	60
2.2.2.	Technique par choc électrique .....	60
<b>3.</b>	<b>BIOMARQUEURS ET ECOTOXICITE DES NANOMATERIAUX DE TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.</b>	<b>Echelle moléculaire : expression des ARNm des gènes de détoxification et du système immunitaire..</b>	<b>61</b>
3.1.1.	Principe de la RT-qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).....	61
3.1.2.	Purification des ARN.....	62
3.1.3.	Retro-transcription .....	62
3.1.4.	Choix des amorces .....	63

3.1.5.	Conditions d'amplifications en qPCR .....	64
<b>3.2.</b>	<b>Echelle cellulaire .....</b>	<b>64</b>
3.2.1.	Evaluation de la viabilité cellulaire.....	64
3.2.1.1.	Test LDH .....	64
3.2.1.2.	Test MTT .....	65
3.2.2.	Phagocytose .....	66
<b>3.3.</b>	<b>Echelle de l'individu .....</b>	<b>68</b>
3.3.1.	Survie.....	68
3.3.2.	Reproduction.....	68
<b>4.</b>	<b>PROTOCOLES D'EXPOSITION <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> AUX NANOMATERIAUX .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.</b>	<b>Exposition des coelomocytes aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> : <i>in vitro</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.</b>	<b>Exposition <i>in vivo</i> des vers de terre aux nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>70</b>
4.2.1.	Milieu liquide.....	70
4.2.2.	Sol contaminé.....	71
4.2.2.1.	Préparation des sols.....	71
4.2.2.2.	Effets à court terme .....	72
4.2.2.3.	Effets chroniques .....	72
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>ETUDE <i>IN VITRO</i> DES NANOPARTICULES DE TIO<sub>2</sub> SUR LES CŒLOMOCYTES DE VERS DE TERRE .....</b>	<b>74</b>
<b>2.</b>	<b>EVALUATION DE LA TOXICITE DES SOUS-PRODUITS D'ALTERATION DE TIO<sub>2</sub> EN MILIEU LIQUIDE SUR LE VER TERRE, <i>EISENIA FETIDA</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>3.</b>	<b>ECOTOXICITE DES NANOPARTICULES DE TIO<sub>2</sub> ET DES SOUS PRODUITS D'ALTERATION DE TIO<sub>2</sub> SUR LE VER DE TERRE, <i>EISENIA FETIDA</i>, DANS DES SOLS ARTIFICIELS.....</b>	<b>111</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>125</b>
	<b>CONCLUSION PERSPECTIVES.....</b>	<b>136</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>140</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>163</b>



## Liste des Figures

<u>Figure 1.</u> Nombre total de produits contenant des nanomatériaux manufacturés au 10/03/11(Nanotechproject, 2011b).....	5
<u>Figure 2.</u> Nombre de produits manufacturés contenant chaque type de matériaux au 10/03/11 (Nanotechproject, 2011a) .....	6
<u>Figure 3.</u> Classification des nanomatériaux selon la localisation de la nanostructure dans le matériau (Hansen et al., 2007) .....	7
<u>Figure 4.</u> Différents états de configuration des particules à l'état de poudre et dispersé en milieu liquide (Jiang et al., 2009) .....	11
<u>Figure 5.</u> Espèces réactives à l'oxygène produites via la réaction de Fenton (Valko et al., 2006) et au cours de la photocatalyse du TiO <sub>2</sub> (Hoffmann et al., 1995) .....	12
<u>Figure 6.</u> Photographie de cocons (a), vers juvéniles (b) et adultes (c) <i>Eisenia fetida</i> .....	16
<u>Figure 7.</u> Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et la glutathion réductase (GRd) .....	18
<u>Figure 8.</u> Photographie des 2 types cellulaires de cœlomocytes, amœbocytes et éléocytes, du ver de terre <i>E. fetida</i> au microscope optique (x400) .....	33
<u>Figure 9.</u> Rôle du CCF en tant que protéine de reconnaissance dans la réponse immunitaire du ver de terre (Bilej et al., 2010) .....	37
<u>Figure 10.</u> Photographie au MET et schéma du nanocomposé de TiO <sub>2</sub> non altéré (Labille et al., 2010) .....	53
<u>Figure 11.</u> Formule du diméthicone, nom commercial du polydiméthylsiloxane (PDMS) .....	53
<u>Figure 12.</u> Distribution de taille du nanocomposé dispersé dans l'eau au cours du temps mesurée par diffraction laser (a) et potentiel zêta des SPA en fonction du pH (Labille et al., 2010) .....	54
<u>Figure 13.</u> Caractérisation physique de la suspension mère de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> (P-25; Degussa) en suspension dans de l'eau ultrapure. Diamètre hydrodynamique et indice de polydispersion des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> après différents temps de sonication, distribution de taille (B) et image par MET (C) des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> après 30 min de sonication (Pagnout et al. soumis) .....	55
<u>Figure 14.</u> Principe du test LDH.....	65
<u>Figure 15.</u> Réduction du MTT en sel de formazan.....	65

<u>Figure 16.</u> Observation de cœlomocytes phagocytant des billes fluorescentes au microscope confocal (magnitude x400) .....	67
<u>Figure 17.</u> Profil de distribution des cœlomocytes témoins ayant phagocytés 1 bille (M1), au moins 2 billes (M2) et au moins 3 billes (M3) au cytomètre de flux .....	68
<u>Figure 18.</u> Photographie du protocole d'exposition en milieu liquide.....	71
<u>Figure 19.</u> Photographie du protocole d'exposition en milieu solide.....	72
<u>Figure 20.</u> Schéma des réponses des différents biomarqueurs des vers de terre aux NP et aux SPA de TiO <sub>2</sub> dans différentes conditions d'exposition: les flèches pleines pour le test <i>in vitro</i> , les flèches épaisses pour l'exposition en milieu liquide et les flèches fines pour l'exposition en sol. Les pointillés correspondent aux conditions non testées.....	135

## **RESULTATS - Partie 1**

<u>Figure 1.</u> X-ray diffractogram (XRD) of TiO <sub>2</sub> nanoparticles with red peaks corresponding to anatase (A) and blue peaks corresponding to rutile.....	86
<u>Figure 2.</u> TEM observation of TiO <sub>2</sub> nanoparticles in the cell culture medium at 25 µg/ml.....	86
<u>Figure 3.</u> Size distribution of TiO <sub>2</sub> NP suspension (25 µg/ml) in ultrapure water (red line), in MEM 85% (green line), in MEM 85% and HEPES 1% (blue line) and in MEM 85%, HEPES 1% and FBS 10% (black line) at 1 h (a), 16 h (b) and 23h (c) measured on supernatants by DLS.....	87
<u>Figure 4.</u> Turbidity (mean +/- SD) of TiO <sub>2</sub> NP suspension (25 µg/ml) in 4 media tested after 1, 16 and 23.5 hours of settling: ♦ ultrapure water; ▲ MEM 85%; ● MEM 85% and HEPES 1%; ■ MEM 85%, HEPES 1% and FBS 10%. Measures were performed on supernatants.....	88
<u>Figure 5.</u> TEM observation of control cells (a) and cells exposed to TiO <sub>2</sub> nanoparticles. Cœlomocytes were exposed during 4h (b), 12h (c) and 24h (d) to 25 µg/ml of TiO <sub>2</sub> NP. Nanoparticle localizations are indicated by arrows. M: mitochondria, N: cell nucleus.....	89
<u>Figure 6.</u> Typical EDS spectrum of X-ray fluorescence from TiO <sub>2</sub> NP uptake by cœlomocytes. The peaks are labeled by their associate element (e.g. Pb).....	89
<u>Figure 7.</u> Partial protein and coding sequences of <i>E. fetida</i> pi-GST.....	91
<u>Figure 8.</u> Expression levels of Fetidin (a) and CCF (b) mRNA (arbitrary unit) in cœlomocytes of <i>E. fetida</i> after 4, 12 and 24 hours of exposure to different concentrations of TiO <sub>2</sub> NP: 0 as control (white), 1 (points), 5 (hatchings), 10 (grey) and 25 µg/ml (black), followed by a LPS treatment of 500 ng/ml for 5 hours. Asterisk shows significant difference in	

comparison with the corresponding control (post-hoc Tukey test after ANOVA,  $p < 0.05$ )... 92

**Figure 9.** Expression levels of MT (a), GST (b), CAT (c) and SOD (d) mRNA (arbitrary unit) in cœlomocytes of *E. fetida* after 4, 12 and 24 hours of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> NP: 0 as control (white), 1 (points), 5 (hatchings), 10 (grey) and 25 µg/ml (black), followed by a LPS treatment of 500 ng/ml for 5 hours. Asterisk shows significant difference in comparison with the corresponding control (post-hoc Tukey test after ANOVA,  $p < 0.05$ )... 93

## RESULTATS - Partie 2

**Figure 1.** TEM image of TiO<sub>2</sub> byproducts recovered just after the 48 h alteration process of nanocomposite (T-lite™ SF, BASF, Germany) ..... 2699

**Figure 2.** Volumic size distribution of TiO<sub>2</sub> byproducts (10 mg/L) in the earthworm exposure medium (1:1 milliQ water:mineral water; v/v) at 20 sec (thick black line), 10 min (grey line), 2 h (thin black line) and 10 h (dotted line) measured by laser diffraction..... 2700

**Figure 3.** Mean ( $\pm$  SD) of Al (a) and Ti (b) body concentrations (mg/kg, d.w.) in *Eisenia fetida* exposed for 24 h to TiO<sub>2</sub> byproducts. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) ..... 2701

**Figure 4.** Expression levels of MT and SOD mRNA (mean  $\pm$  SD) in gut tissues of *Eisenia fetida* after 24 h of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: 0, 0.1, 1 and 10 mg/L. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) ..... 2701

**Figure 5.** Mean densities ( $\pm$  SEM) of Apoptain positive cells recorded in *Eisenia fetida* after 24 hours of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: a) Comparison of apoptotic response between different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: 0, 0.1, 1 and 10 mg/L b) Comparison of apoptotic response between different type of tissue. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) ..... 2702

**Figure 6.** Analyses par  $\mu$ -XRF d'une section transversale de ver de terre après 24h d'exposition à 83 mg SPA/l. Distribution du soufre (a), calcium (b), phosphore (c), titane (d) et S/Ti/P combiné en rouge, vert et bleu respectivement (1 px=28 µm, 128 px) ..... 109

## RESULTATS - Partie 3

**Figure 1.** Teneurs en titane (◆) et en aluminium (■) dans les sols artificiels témoins (0) et contaminés aux SPA (20 mg/kg) ou aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (200 mg/kg). Les astérisques montrent les différences significatives comparées au témoin correspondant (Anova,  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ) ..... 114



Figure 2. Teneurs en titane (◆) et en aluminium (■) dans les vers, *E. fetida*, exposés aux sols artificiels témoins (0) et contaminés aux SPA (20 mg/kg) ou aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (200 mg/kg). Les astérisques montrent les différences significatives comparées au témoin correspondant (Anova, p<0,05 ; n=5) .....115

Figure 3. Niveaux d'expressions des ARNm (u.a. unités arbitraires) des gènes du système immunitaire (Fétidines, a; CCF, b) des cœlomocytes du ver *E. fetida* exposé à des sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20, 200 mg/kg) après 2 (gris) et 28 jours (noir). Une même lettre signifie qu'il n'y a pas de différences significatives (Anova, p<0,05 n=3) .....117

Figure 4. Niveaux d'expressions des ARNm (u.a. unités arbitraires) des gènes du système de détoxification et antioxydant (MT, a; GST, b ; SOD, c) des cœlomocytes du ver *E. fetida* exposé à des sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20, 200 mg/kg) après 2 (gris) et 28 jours (noir). Les lettres différentes indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant (Anova, p<0,05 ; n=3) .....119

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I.</b> Principales applications des nanoparticules dans différents secteurs.....	9
<b>Tableau II.</b> Nombre d'atomes en surface et pourcentage d'atomes en surface pour différentes tailles des NP de GaAs (taille unitaire, $a = 0.565$ nm) (Poole et Owens, 2003) .....	10
<b>Tableau III.</b> Concentrations prédites en nanoparticules de $TiO_2$ dans l'environnement dans différents compartiments (E-U : Etats-Unis) .....	14
<b>Tableau IV.</b> Effets des nanoparticules de $TiO_2$ sur le système antioxydant des organismes aquatiques.....	21
<b>Tableau V.</b> Effets des nanoparticules de $TiO_2$ sur le système antioxydant des invertébrés terrestres.....	24
<b>Tableau VI.</b> Cytotoxicité des nanomatériaux de $TiO_2$ sur des cellules humaines et de mammifères.....	28
<b>Tableau VII.</b> Effets des nanomatériaux de $TiO_2$ sur les traits d'histoire de vie des organismes aquatiques.....	41
<b>Tableau VIII.</b> Effets des nanomatériaux sur les traits d'histoire de vie des invertébrés terrestres.....	46
<b>Tableau IX.</b> Séquences des amorces utilisées en qPCR.....	63
<b>Tableau X.</b> Composition de l'eau minérale, Evian® .....	70

### RESULTATS - Partie 1

<b>Table I.</b> Sequences of primers used for PCR and RT-qPCR amplifications. ....	84
<b>Table II.</b> Cell viability and phagocytic activity of coelomocytes of earthworms. <i>Eisenia fetida</i> . exposed to $TiO_2$ NP (0, 1, 5, 10 and 25 $\mu\text{g/ml}$ ) <i>in vitro</i> to three times of exposure (4, 12 and 24 hours) for cytotoxicity assay and 24h for phagocytosis. Results of cell viability (MTT and LDH assay) are expressed as the % of control cells. Different letters showed significant differences (ANOVA; $p < 0.05$ )... ..	90

### RESULTATS - Partie 2

<b>Table 1.</b> Sequences of primers used for PCR amplifications.....	2700
<b>Table 2.</b> Supernatant relative turbidity of $TiO_2$ byproducts suspension at concentration tested after 24 h settling.....	2701

**Table 3.** Viability and phagocytosis activity (mean  $\pm$  SD) of cœlomocytes from earthworms exposed 24 h to TiO<sub>2</sub> byproducts. Different letters indicate significant differences (n= 4,  $p < 0.05$ ).....2702

### **RESULTATS - Partie 3**

**Tableau I.** Paramètres du test reproduction mesurés chez le ver de terre, *E. fetida*, exposé au sol témoin ou contaminé aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20 et 200 mg/kg). Une même lettre signifie qu'il n'y a pas de différences significatives (Anova,  $p < 0,05$ ; n=5) .....116

## Liste des abréviations

### A

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ASB: albumine de sérum bovin

ATP: adénosine triphosphate

### B

BLAST: basic local alignment search tool

### C

CAT: catalase

CCF: facteur cytolytique cœlomique

CEC : capacité d'échange cationique

CEREGE : Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de  
l'Environnement

CE<sub>50</sub>: concentration efficace qui entraîne 50 % de l'effet maximum

CL<sub>50</sub> : concentration létale pour 50 % des individus

Ct: threshold cycle

### D

DDSA: dodecanyl succinic anhydride

DMSO: Dimethyl sulfoxide

dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate

DWNT: nanotubes de carbone double-feuillet

### E-F

E: Efficacité

EDTA: acide ethylenediaminetetraacétique

EPA : environmental protection Agency

ERO : espèces réactives à l'oxygène

### G

GATC: guanidium isothiocyanate

GGE: Guaiacol Glyceryl Ether

GPx : glutathion peroxydase

GRd : glutathion réductase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion S-transférases

## **H**

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

HSP: heat shock protein

## **I-K**

ICP AES: spectrométrie d'émission atomique à source plasma

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

INT: 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-6-phenyltetrazolium chloride

ISO: International Organization for Standardization

## **L**

LBSS: lumbricus balanced salt solution

LDH: lactate dehydrogenase

LEM: Laboratoire Environnement et Minéralurgie

LOEC: low observed effect concentration

LPS: lipopolysaccharide

## **M**

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

μXRF: micro spectroscopie à fluorescence X

MEM: minimum Essential Media

MET: microscopie électronique à transmission

MON : matières organique naturelles

MT: métallothionéine

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MWNT : nanotubes de carbone multi-feuillet

## **N**

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NM: nanomatériaux

NOEC : no observed effect concentration

NP: nanoparticules(s)

## **O**

OCDE – OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economique

## **P**

PAMPs: pathogen-associated molecular pattern

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDMS : polydiméthylsyloxane

PFA : paraformaldéhyde

## **Q**

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

## **R**

REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques)

ROS: Reactive Oxygen Species

RT: retro-transcription

## **S**

SDS: sodium dodecyl sulfate

SOD: superoxyde dismutase

SPA : sous-produits d'altération

SVF : sérum de veau fétal

SWNT nanotubes de carbone simple feuillet

## **T**

TAE: tris acétate EDTA

Tm: melting temperature

TNF: facteur de nécrose tumorale

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ and labeling

## **U-Z**

UV: ultra violet

XTT: 2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2Htetrazolium-5-carboxyanilide

## Communication des travaux de recherche

### ❖ Publications internationales

#### Article publiés (dans le cadre de la thèse)

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF  $\text{TiO}_2$  BYPRODUCTS ON THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Lapied E., Labille J., Botta C., Sirguy C., Falla J., Rose J., Joner E.J., Rodius F., Nahmani J., 2011. Environmental Pollution 159, 2698-2705.

ENVIRONMENTAL IMPACT OF SUNSCREEN NANOMATERIALS: ECOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITES ON *VICIA FABA*. Foltête A.-S., Masfaraud J.-F., **Bigorgne E.**, Nahmani J., Chaurand P., Botta C., Labille J., Rose J., Féraud J.-F., Cotelle S., 2011. Environmental Pollution 159, 2515-2522.

#### Article soumis (dans le cadre de la thèse)

CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES OF *E. FETIDA* CÉLOMOCYTES EXPOSED TO  $\text{TiO}_2$  NANOPARTICLES. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Caillet C., Giamberini L., Nahmani J., Thomas F., Rodius F. *Soumis à Journal of Nanoparticle Research*.

#### Article publiés (hors cadre de la thèse)

GENOTOXIC EFFECTS OF NICKEL, TRIVALENT AND HEXAVALENT CHROMIUM ON THE *EISENIA FETIDA* EARTHWORM. **Bigorgne E.**, Cossu-Leguille C., Bonnard M., Nahmani J., 2010. Chemosphere 80, 1109-1112.

### ❖ Communications orales et affichées

#### Communications orales (dans le cadre de la thèse)

MULTI APPROACH OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITE EFFECTS ON THE EARTHWORM, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Lapied E., Joner E., Oughton D.H., Botta C., Chaurand P., Labille J., Rose J., Moudilou E., Exbrayat J.M., Falla J., Rodius F., Nahmani J., 2010. 20th Annual meeting of SETAC Europe. Science and technology for environmental protection. Seville, Spain, 05/23-05/27/2010.

ECOTOXICITY OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITE ON THE EARTHWORM, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Rodius F., Labille J., Rose J., Falla J., Nahmani J., 2009. ICEIN. International Conference on the Environmental Implications of NanoTechnology 2009. Washington DC, USA, 09/09-09/10/2009.

ECOTOXICITY OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITE ON THE EARTHWORM, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Rodius F., Labille J., Rose J., Falla J., Nahmani J., 2009. ISTA14. 14th International symposium on toxicity assessment. Metz, France, 08/30-09/04/2009.

### **Communications affichées (dans le cadre de la thèse)**

IMMUNOTOXICITY OF  $\text{TiO}_2$  NANOPARTICLES ON EARTHWORM'S CŒLOMOCYTES (*E. FETIDA*) USING AN *IN VITRO* APPROACH. **Bigorgne E.**, Dagtekin A., Rodius F., Falla J., Caillet C., Thomas F., Nahmani J., Foucaud L., 2010. Nanosafe. Grenoble, France, 11/16-11/18/2010.

BIOAVAILABILITY AND ECOTOXICITY OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITE ON THE EARTHWORM, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Lapied E., Botta C., Chaurand P., Labille J., Rose J., Moudilou E., Exbrayat J.M., Falla J., Rodius F., Nahmani J., 2010. ISEE9. 9th International symposium on earthworm ecology. Xalapa, Veracruz, Mexico, 09/05-09/10/2010.

TOXICITY OF ALTERED  $\text{TiO}_2$  NANOCOMPOSITES ON *VICIA FABA*. Foltête A.-S., Masfaraud J.-F., **Bigorgne E.**, Nahmani J., Botta C., Labille J., Rose J., Ferard J.-F., Cotelle S., 2010. 20th Annual meeting of SETAC Europe. Science and technology for environmental protection. Seville, Spain, 05/23-05/27/2010.

QUELLE EST L'INFLUENCE DU PH SUR L'ECOTOXICITE DE NANOCOMPOSITES DE  $\text{TiO}_2$  VIEILLIS ARTIFICIELLEMENT CHEZ *VICIA FABA*? Foltête A.-S., Masfaraud J.-F., **Bigorgne E.**, Nahmani J., Botta C., Labille J., Rose J., Ferard J.-F., Cotelle S., 2010. Colloque de la Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée. INRA de Versailles-Grignon, 03/31-04/01/2010.



SOUS-PRODUITS D'ALTERATION DE NANOMATERIAUX : BIODISPONIBILITE ET EFFETS SUR L'EXPRESSION DES ARNm DES GENES DE DETOXICATION DU VER DE TERRE, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Botta C., Chaurand P., Rose J., Labille J., Sirguy C., Lapied E., Falla J., Foucaud L., Rodius F., Nahmani J., 2010. Séminaire de l'Ecole doctorale RP2E. Nancy, 01/28/2010.

ECOTOXICOLOGICAL EFFECT OF ALTERED TiO<sub>2</sub> NANOCOMPOSITE ON THE EARTHWORM, *EISENIA FETIDA*. **Bigorgne E.**, Foucaud L., Falla J., Labille J., Rose J., Rodius F., Nahmani J., 2009. SETAC Europe 19th Annual Meeting. Göteborg, Sweden, 05/31 - 06/04/2009.

**Communications affichées (hors cadre de la thèse)**

GENOTOXICITE DU NICKEL, DU CHROME TRIVALENT ET DU CHROME HEXAVALENT SUR LES CÉLOMOCYTES D'*EISENIA FETIDA*. DEUXIEMES RENCONTRES NATIONALES DE LA RECHERCHE SUR LES SITES ET SOLS POLLUES: POLLUTIONS LOCALES ET DIFFUSES. **Bigorgne E.**, Bonnard M., Vasseur P., Nahmani J., Cossu-Leguille C., 2009. Paris, France, 10/20 – 10/21/2009.



# *Introduction*

Le développement des nanotechnologies est en plein essor depuis une dizaine d'années. En effet, les nanomatériaux manufacturés présentent de nouvelles propriétés physico-chimiques qui permettent leur utilisation dans un grand nombre de produits. Ainsi, les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  présentent des propriétés photocatalytiques et d'absorption des UV élevées, ce qui justifie leur incorporation dans les textiles, les peintures, les ciments et verres auto nettoyants mais aussi leur utilisation pour la remédiation des sols pollués. L'épandage volontaire ou non des nanoparticules entraînent de ce fait leur déversement dans l'environnement et la contamination des écosystèmes (Moore, 2006; Wiesner et al., 2006). Les teneurs en nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  modélisées dans les différents compartiments sont amenées à augmenter avec l'utilisation et les rejets croissants des nanoparticules dans l'environnement que les perspectives de développement des nanotechnologies suggèrent. Malgré l'engouement suscité par les avancées technologiques que représente l'utilisation de ces nanoparticules ; leur biodisponibilité supposée élevée suscite parallèlement une réelle prise de conscience en ce qui concerne le comportement, le devenir et la potentielle toxicité des nanomatériaux manufacturés et de leurs sous-produits d'altération.

Le développement croissant des équipements incorporant des nanomatériaux, la dispersion inévitable des nanoparticules dans l'environnement nécessite donc d'évaluer leur impact sur l'Homme et l'environnement. La toxicité des nanoparticules est d'ores et déjà largement étudiée sur les cellules humaines et de mammifères (Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006; Oberdörster et al., 2007; Warheit et al., 2007b; Park et al., 2008; Magrez et al., 2009). La majorité des études écotoxicologiques sur les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  est quant à elle réalisée pour l'essentiel sur des organismes aquatiques (Lovern et Klaper, 2006; Heinlaan et al., 2008; Reeves et al., 2008; Wiench et al., 2009; Canesi et al., 2010b). Seuls, quelques travaux concernent l'écotoxicité des nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  sur les organismes terrestres (Jemec et al., 2008; Drobne et al., 2009; Hu et al., 2010; Lapied et al., 2011). Cependant, aucune de ces études n'a utilisé une batterie de biomarqueurs allant de l'échelle moléculaire à celle d'individu pour évaluer la toxicité de ces nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  sur les invertébrés du sol.

L'ensemble de ces problématiques fait que l'écotoxicité des nanomatériaux est devenu un axe de recherche émergent pour les sciences environnementales. Les recherches présentées s'inscrivent directement dans ce contexte associant une approche physico-chimique du comportement des nanoparticules, de leurs produits de dégradation dans les milieux d'expérimentation et de leur toxicité.

Un premier projet a pour but d'évaluer le devenir de nanoparticules dans l'environnement, leur dégradation et la toxicité de leurs sous-produits d'altération sur les écosystèmes. Le nanocomposé étudié est constitué de nanoparticules de dioxyde de titane enrobées et il entre dans la composition de crèmes solaires commerciales (T-lite<sup>TM</sup> SF, BASF, Germany) (projet EC2CO (Ecosphère continentale et côtière) : « Ecotoxicité des sous-produits d'altération de Nanomatériaux », CEREGE (CNRS UMR 6635, Aix en Provence). Le CEREGE porteur du projet a développé le vieillissement accéléré de ces nanocomposés pour produire des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub>. Dans le cadre de cette thèse, l'écotoxicité de ces sous-produits d'altérations est étudié sur le modèle ver de terre, *Eisenia fetida*.

Un second projet a pour objectif de comprendre l'impact de l'état d'agrégation des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub> P25-Degussa) sur leur toxicité vis-à-vis du ver de terre *Eisenia fetida*, dans des conditions d'études *in vitro* (projet FR-EST (Fédération de Recherche Eau-Sol-Terre) : « Caractérisation physico-chimiques des nanoparticules dans les milieux biologiques en vue de l'étude *in vitro* de leur toxicité », LIEBE (UMR7146, Metz/LEM (CNRS UMR7569, Nancy).

Cette thèse a pour objectif d'évaluer l'écotoxicité des nanoparticules et des sous produits d'altération de TiO<sub>2</sub> sur le ver de terre, *Eisenia fetida*, en utilisant une approche multi biomarqueurs associée à des analyses physico-chimiques pour la caractérisation et la biodisponibilité des particules. Pour répondre à cet objectif, nous allons tenter de répondre aux hypothèses suivantes :

H1 : Dans les milieux d'exposition, les nanomatériaux ont tendance à s'agréger bien qu'une proportion de particules reste à l'échelle nanométrique. Cette proportion diminue à mesure que le milieu d'exposition se complexifie.

H2 : Ces particules nanométriques sont biodisponibles pour les vers de terre.

H3 : Leur internalisation et/ou bioaccumulation induit des effets toxiques aux échelles moléculaire, cellulaire et individuelle.

H4 : Les biomarqueurs moléculaires sont les plus sensibles aux nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

# 1. Les nanomatériaux : enjeux, propriétés et risques

## 1.1. Développement des nanotechnologies

### 1.1.1. Contexte économique

Le développement des nanotechnologies est considéré comme la révolution industrielle du XXIème siècle (Roco, 2001). En effet, les nanotechnologies ont un impact sur l'économie mondiale du fait de leurs applications dans un grand nombre de secteurs. Le marché global des produits issus des nanotechnologies est en plein expansion avec 11,7 milliards de dollars en 2009, il devrait atteindre plus de 26 milliards de dollars en 2015 avec un taux de croissance annuel de 11,1% (BBC Research, 2010). Le secteur majeur des nanotechnologies qui concerne les nanomatériaux représentait 9 milliards de dollars en 2009 et devrait atteindre 19.7 milliards de dollars en 2015 avec un taux de croissance annuel de 14,7% (BBC Research, 2010). L'utilisation des nanosciences dans les produits de consommation est en plein essor avec seulement 212 produits contenant des nanomatériaux manufacturés en mars 2006 pour atteindre plus de 1317 produits en mars 2011 (Fig. 1). Si la tendance actuelle continue, le nombre de produits pourrait atteindre 3400 d'ici 2020 (Nanotechproject, 2011b).

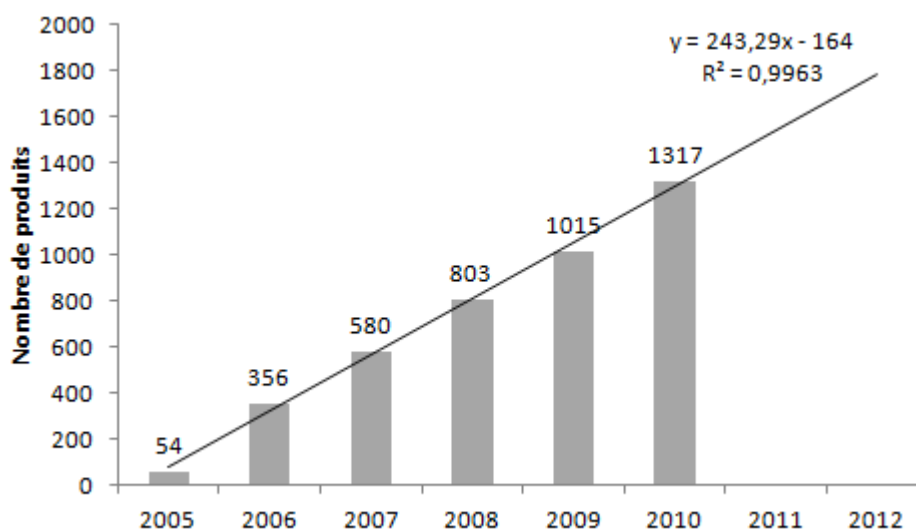


Figure 1. Nombre total de produits contenant des nanomatériaux manufacturés au 10/03/11(Nanotechproject, 2011b)

Le matériau le plus utilisé dans les produits manufacturés est l'argent suivi du carbone (y compris les fullerènes) et du titane ( $\text{TiO}_2$ ) (Fig.2). Les nanoparticules Ag présentent l'avantage d'être utilisées dans différents secteurs et d'avoir une production maîtrisée.

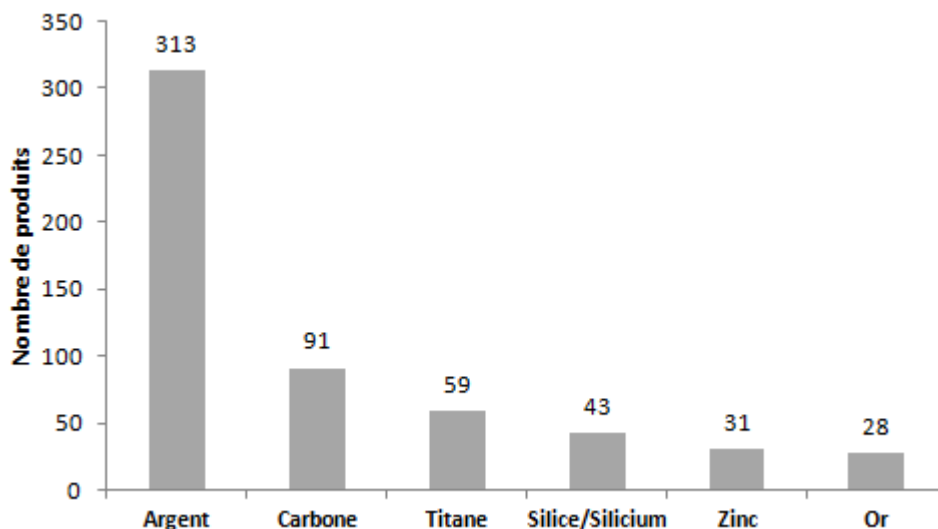


Figure 2. Nombre de produits manufacturés contenant chaque type de matériaux au 10/03/11 (Nanotechproject, 2011a)

### 1.1.2. Réglementation

Le dispositif réglementaire concernant les nanoparticules et les nanomatériaux n'est pas encore adapté au développement et à l'utilisation des nanotechnologies dans la société. En France, l'article 42 de la Loi Grenelle 1 du 3 août 2009 a été écrit dans le cadre du Grenelle de l'environnement. Cet article demande l'organisation d'un débat public et la déclaration obligatoire pour la fabrication, l'importation ou la mise sur le marché de substances à l'état nanoparticulaire ou de matériaux destinés à rejeter de telles substances en vue d'une meilleure information du public, des consommateurs et des travailleurs (Légifrance, consulté le 23 août 2011a). En 2010, l'article 185 de la Loi Grenelle 2 (12/07/10) a pour objectif la connaissance des nanomatériaux produits, importés ou mis sur le marché (identité, quantités, usages), la traçabilité (fabricant, distributeur, importateur et utilisateur professionnel) et le rassemblement de connaissances sur les nanomatériaux en vue de l'évaluation des risques et de l'information du public : les informations relatives à l'usage et à l'identité des substances seront mises à la disposition du public (Légifrance, consulté le 23 août 2011b).

En Europe, REACH (enRegistration, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques) demande que chaque substance, y compris celles de taille nanométrique, produites ou importées en quantité de 1 tonne ou plus par an doit être enregistré sous REACH. Pour des quantités égales ou supérieures à 10 tonnes par an, un rapport de sécurité chimique



supplémentaire doit être fourni. A l'heure actuelle, les nanoparticules échappent à ce règlement, car il inclut des seuils de tonnages annuels de production que n'atteignent pas les laboratoires et industries produisant des nanoparticules.

## 1.2. Présentation

### 1.2.1. Définitions

**Nanométrieque** : domaine de dimension compris entre 1 et 100 nm (ISO/TS 27687, 2008).

**Nano-objets**: matériaux présentant une, deux ou trois dimensions externes de taille nanométrique (ISO/TS 27687, 2008).

**Nanoparticules** : nano-objets dont les trois dimensions externes sont de taille nanométrique (ISO/TS 27687, 2008).

**Nanomatériaux** : matériaux dont les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique ou possédant une structure interne ou surface à l'échelle nanométrique (ISO/TS 80004-1, 2010).

Les trois catégories principales de nanomatériaux sont présentées sur la figure 3 (Hansen et al., 2007).

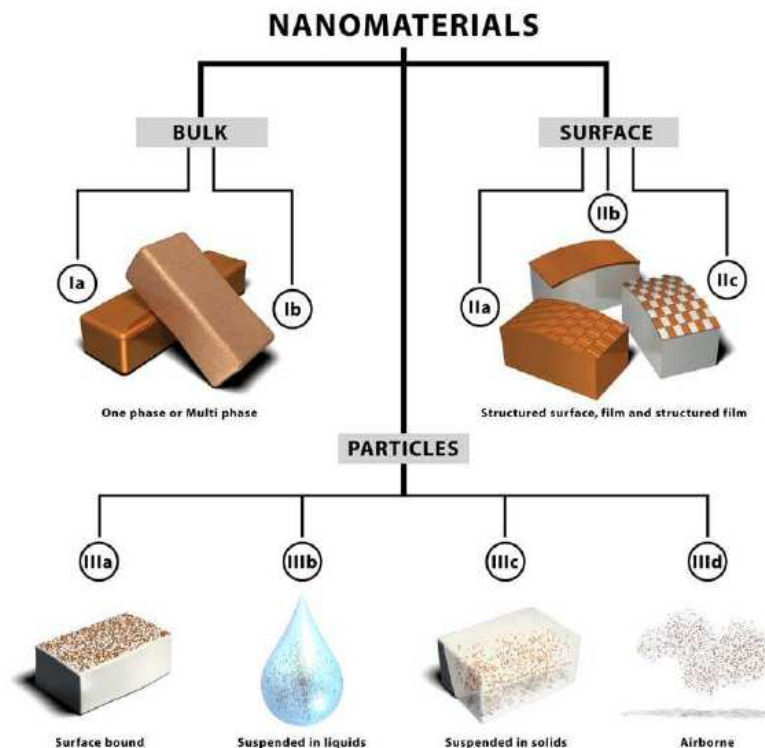


Figure 3. Classification des nanomatériaux selon la localisation de la nanostructure dans le matériau (Hansen et al., 2007)

**Nanocomposés**: composés multiphasiques dans lesquels au moins une des phase a une taille nanométrique (Ajayan et al., 2003).

### 1.2.2. Origine naturelle ou anthropique

Les nanoparticules sont présentes de manière ubiquitaire et sont généralement désignées sous le terme « particules ultra-fines ». Les particules présentes naturellement dans l'environnement proviennent, entre autres, des éruptions volcaniques, des aérosols marins, de l'érosion des sols et des feux de forêts (Buzea et al., 2007). Les sources non intentionnelles d'origine anthropique rejettent des particules ultra-fines principalement par le biais des procédés industriels, la combustion, le chauffage, les rejets de diesel, les fumées de tabac... (Buzea et al., 2007). Les nanomatériaux manufacturés correspondent à des matériaux intentionnellement produits avec des particules nanométriques. Il existe actuellement 2 méthodes de production des nanomatériaux :

- l'approche ascendante ou de bas en haut (« *bottom-up* »), qui correspond à l'assemblage à partir des éléments de base de la matière, atome par atome ou molécule par molécule, pour construire des systèmes plus grands. Les techniques pour la méthode ascendante sont l'auto-assemblage, l'érosion laser, la pyrolyse laser ou la synthèse chimique;
- l'approche descendante ou de haut en bas (« *top-down* »), qui correspond à la réduction des matériaux existant à des dimensions nanométriques, est réalisée en utilisant les techniques de broyage, compactage ou frittage.

### 1.2.3. Propriétés et applications

L'engouement pour les nanomatériaux manufacturés vient du fait que les nanoparticules (NP) possèdent des propriétés uniques par rapport aux matériaux macroscopiques de même nature et qu'elles présentent une variété d'applications (Tab.I). En effet, les nanoparticules présentent une réactivité de surface plus importante que les plus grandes du fait de leurs petites tailles (Poole et Owens, 2003). Outre la taille, les nanomatériaux ont des propriétés mécaniques qui permettent d'améliorer la résistance des matériaux sans compromettre leur plasticité et des propriétés électriques qui améliorent l'isolation par leur conductivité électrique (Afsset, 2010). Les nanoparticules présentent également des propriétés de barrière, d'inflammabilité car certaines d'entre elles permettent la résistance et l'isolation des matériaux (Afsset, 2010). Les propriétés optiques de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et de  $\text{ZnO}$ , sont généralement utilisées dans les matériaux (ex : peintures, verre, dentifrice, produits cosmétiques) du fait de leurs longueurs d'ondes inférieures au visible (transparence) et leur

absorbance des UV (Afsset, 2010). Les propriétés magnétiques et catalytiques de certaines nanoparticules (ex : nanoparticule d'oxyde de fer) ainsi que leur utilisation en tant que membranes nanostructurées, ou nano-adsorbants montrent que les nanoparticules peuvent être des outils prometteurs pour la dépollution des eaux et des sols et le traitement des eaux de consommation (Masciangioli et Zhang, 2003; Zhang, 2003; Hu et al., 2005; Auffan et al., 2007).

Les nanosciences et les nanotechnologies interviennent à l'échelle moléculaire, et permettent donc de mieux comprendre l'organisation et la structure des cellules, jusqu'aux protéines et à l'ADN. Les nano biotechnologies permettent de concevoir des nano-transporteurs utilisés pour la vectorisation des médicaments. Les nano transporteurs ont pour but de franchir les barrières biologiques et, grâce à un encapsulage, permettre au principe actif d'atteindre la cible (Brigger et al., 2002). Ces techniques permettraient de distribuer un médicament à la dose adéquate, précisément sur l'organe ou le tissu cible (Duncan, 2006). Les nanoparticules enrobées de polymères et/ou de ligands cibles sont également utilisées dans les traitements anti cancer pour réduire la prolifération des cellules des tumeurs (Brigger et al., 2002; Kukowska-Latallo et al., 2005).

**Tableau I.** Principales applications des nanoparticules dans différents secteurs

Nanoparticules	Propriétés	Applications	Secteurs
C60	conductivité	Fil conducteur, transistor, diode	Electronique
Nanotube de carbone	résistance	amélioration performance des raquettes	Sport
	résistance	résistance mécanique et imperméabilité	Textile
	adsorption	traitement eau potable/ pollution	Environnement
Noir de carbone	résistance	élastomère	Matériaux
Silice	isolant	électronique	Electronique
	anti-agglomérant	additif	Alimentation
	poreux	nanovecteur- délivrance ciblée de médicaments	Santé, pharmacie
	adhérence	pneu	Automobile
Argent	antibactérien	vêtements	Textile
		pansements	Santé, pharmacie
Dioxyde de Titane	pigment	dentifrice	Cosmétique
	anti UV	crème solaire	
	pigment	peinture	Matériaux
	photocatalytique	vitrage/ béton autonettoyant	
Oxyde d'Aluminium	adsorption	traitement eau potable/ pollution	Environnement
	catalyse	traitement eau potable/ pollution	Environnement
Oxyde de Fer	adsorption/magnétique	traitement eau potable/ pollution	Environnement
Oxyde de zinc	anti UV	crème solaire	Cosmétique
	anti vieillissement	soin pour la peau	

## 1.2.4. Stabilité des nanoparticules

La stabilité des NP dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Les NP présentent un ratio surface/volume (S/V) élevé du fait de leur taille nanométrique. En effet, plus les particules sont de petites tailles, plus le pourcentage d'atomes en surface est important (Tab.II). Ainsi, les nanoparticules présentent généralement une plus forte réactivité de surface que les particules de taille macroscopique. La charge portée par la particule et sa réactivité chimique jouent un rôle important dans les propriétés des nanoparticules (Hoet et al., 2004).

**Tableau II.** Nombre d'atomes en surface et pourcentage d'atomes en surface pour différentes tailles des NP de GaAs (taille unitaire,  $a = 0.565$  nm) (Poole et Owens, 2003)

Nombre de NP N	Taille (nm) $n \times a$	Nombre total d'atomes	Nombre d'atomes en surface	Pourcentage d'atomes en surface
2	1.13	94	48	51.1
3	1.7	279	108	38.7
4	2.26	620	192	31
5	2.83	1165	300	25.8
6	3.39	1962	432	22
10	5.65	8630	1200	13.9
15	8.48	$2.84 \times 10^6$	2700	9.5
25	14.1	$1.29 \times 10^6$	7500	5.8
50	28.3	$1.02 \times 10^6$	$3.0 \times 10^4$	2.9
100	56.5	$8.06 \times 10^6$	$1.2 \times 10^5$	1.5

Les nanoparticules peuvent être présentes sous forme de particules primaires libres, d'agglomérats ou d'agrégats (Fig. 4). Les agglomérats correspondent à un ensemble de particules liées par des forces faibles (ex : force de Van der Waals) alors que les agrégats sont des particules maintenues par des liaisons chimiques fortes. Contrairement aux agrégats (difficilement séparables), les agglomérats sont facilement dissociables et peuvent être dispersés en nanoparticules libres en utilisant différentes techniques (ex : la sonication). La capacité des NP à former des agrégats ou des agglomérats peut s'expliquer par leur grande réactivité de surface. La stabilité des NP dépend de la double couche électrique dont les propriétés sont le potentiel zêta (charge de surface) et l'épaisseur de la double couche électrique. En effet, une augmentation de la force ionique diminue l'épaisseur de la double couche électrique et le potentiel zeta, ce qui entraîne l'agglomération des nanoparticules (French et al., 2009; Jiang et al., 2009). Le potentiel zeta correspond à la charge de surface

des particules. Pour des valeurs de pH éloignées du point isoélectrique, les particules chargées (positivement ou négativement) se repoussent car les forces électrostatiques répulsives sont dominantes. En revanche, la taille des agrégats de NP augmente lorsque les valeurs de pH s'approchent du point isoélectrique (point de charge nul) (Dunphy Guzman et al., 2006). En effet, les particules sont faiblement chargées et les forces électrostatiques répulsives sont faibles. L'ajout d'ions multichargés ainsi que de polymères enrobant la surface des NP favorisent les forces électrostatiques répulsives et les forces répulsives stériques ce qui diminue l'agglomération (Ju-Nam et Lead, 2008; Jiang et al., 2009). Les forces stériques et électrostatiques conditionnent la stabilité des suspensions de NP.

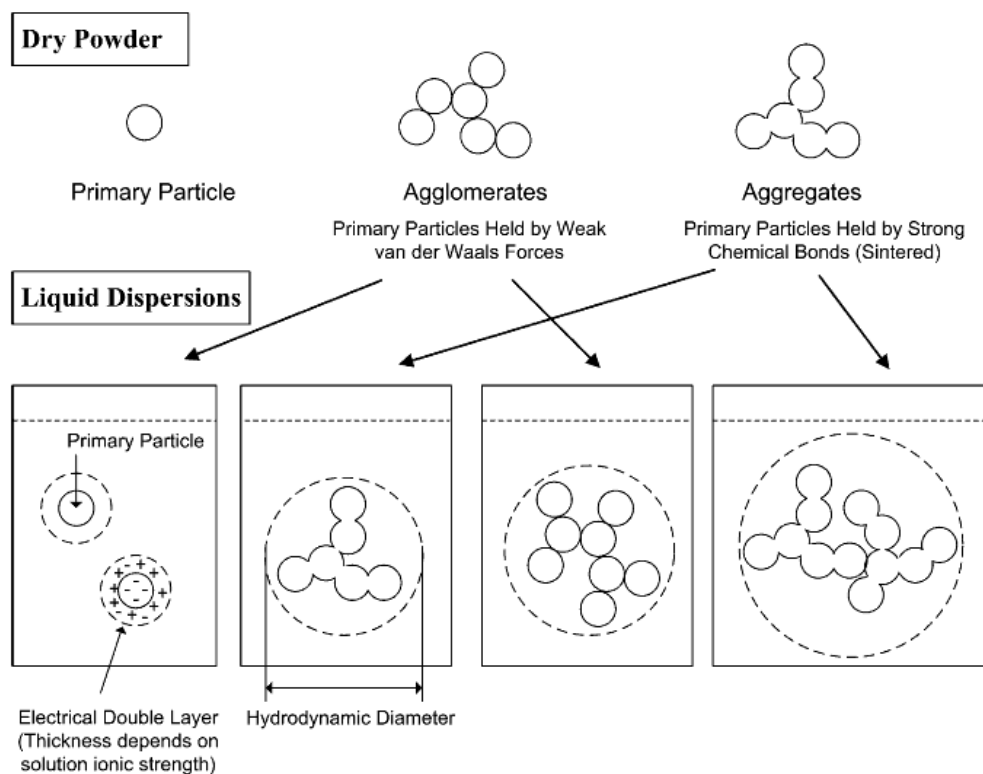


Figure 4. Différents états de configuration des particules à l'état de poudre et dispersé en milieu liquide (Jiang et al., 2009)

### 1.3. Les Nanoparticules de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ )

Le dioxyde de titane est un minéral naturel qui existe sous 3 formes cristallines : anatase, rutile et brookite. Il est présent dans l'environnement principalement sous la forme rutile et il peut être produit à partir de minerai contenant du titane comme l'ilmenite ( $\text{FeTiO}_3$ ). La méthode la plus courante de production de dioxyde de titane sous ses 3 formes cristallines est l'utilisation du tétrachlorure de titane ( $\text{TiCl}_4$ ). Les principaux pays producteurs de minerais de

titane sont les Etats-Unis, le Canada, l’Australie, la Chine, l’Inde, l’Afrique du Sud et la Norvège (EPA, 2010). Les NP de TiO<sub>2</sub> sont photocatalytiques et sont capables d’absorber les UV. Ainsi, elles sont utilisées dans un grand nombre de produits comme les crèmes solaires, les vêtements, les piles solaires, les peintures, les vitrages et les ciments autonettoyants ou dans les systèmes de traitement des eaux potables. Cependant, les particules de dioxyde de titane ont été classées par l’IARC (International Agency for Research on Cancer) en 2006 dans le groupe des carcinogènes 2B, c’est à dire des carcinogènes possibles pour l’Homme.

### 1.3.1. Propriétés des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>

Le TiO<sub>2</sub> génère la production d’espèces réactives à l’oxygène (ERO) via les propriétés photocatalytiques et la réaction de Fenton (Valko et al., 2006). Les principales ERO produites sont : l’anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le peroxyde d’hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (Fig.5) (Hoffmann et al., 1995). Ces ERO peuvent induire la dégradation des polluants organiques mais aussi la lyse des cellules, lipides, protéines et des dommages à l’ADN.

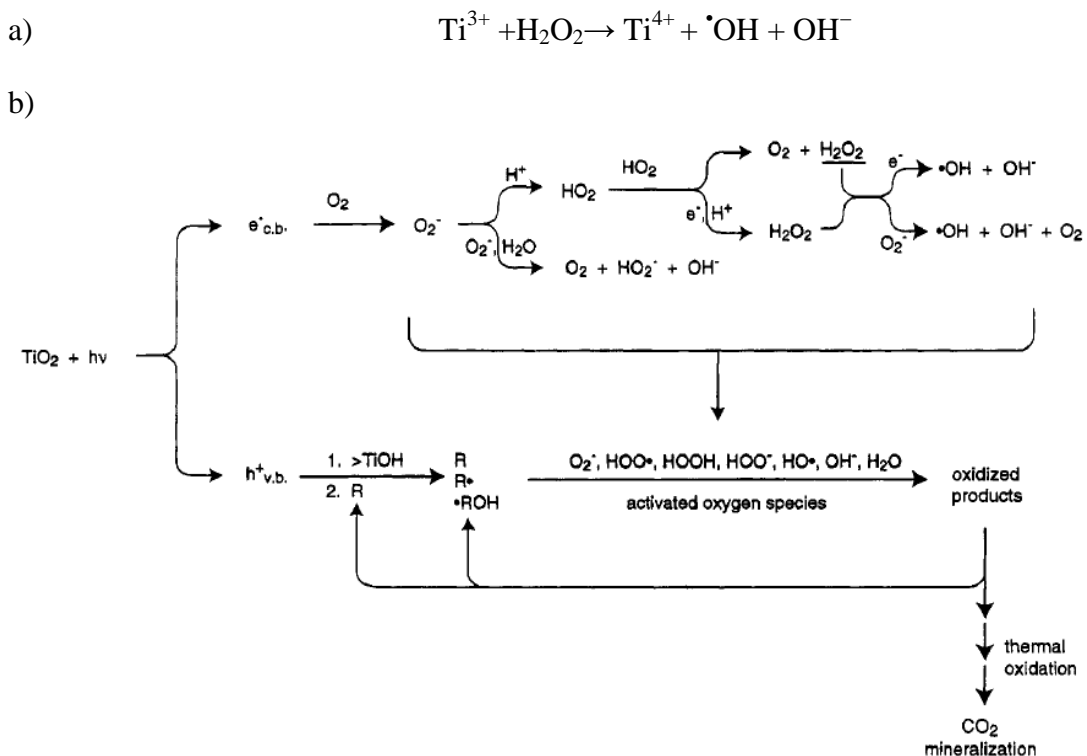


Figure 5. Espèces réactives à l’oxygène produites via la réaction de Fenton (Valko et al., 2006) et au cours de la photocatalyse du TiO<sub>2</sub> (Hoffmann et al., 1995)

Plusieurs études ont évalué l'effet des UV sur la production de ERO par les NP de TiO<sub>2</sub> (Zhang et Sun, 2004; Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006). Les UV semblent activer le stress oxydant avec l'augmentation des effets cytotoxiques des NP de TiO<sub>2</sub> anatase ou rutile (Zhang et Sun, 2004; Sayes et al., 2006). En revanche, il a été montré que des NP de 10 et 20 nm (anatase) induisent une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène et d'acide nitrique dans des cellules pulmonaires, à l'obscurité en l'absence de photocatalyse (Gurr et al., 2005). Ces ERO, issues du stress oxydant des NP, seraient responsables d'altérations de la cellule telles que la génotoxicité ou la lipoperoxydation. Ces effets ne sont pas observés avec des NP de forme cristalline anatase de plus grande taille (200 nm). La petite taille des NP (10 et 20 nm) et leurs fortes réactivités de surface pourraient expliquer la plus grande capacité des NP à produire un stress oxydant en l'absence de photoactivation (Gurr et al., 2005). En plus des propriétés photocatalytiques, la production d'ERO dépend de la forme cristalline des NP de TiO<sub>2</sub> (Sayes et al., 2006; Jin et al., 2010).

Selon le type d'application des NP de TiO<sub>2</sub>, l'enrobage est nécessaire pour réduire la production de radicaux libres due à la photocatalyse. L'aluminium, la silice, le diméthicone ou le diméthicone sont des enrobants qui permettent d'améliorer la photostabilité des NP de TiO<sub>2</sub>. Il existe donc différents types de NP de TiO<sub>2</sub> avec différentes propriétés physico-chimique selon la taille, la forme cristalline, la pureté (enrobage ou non), ou la réactivité de surface. L'enrobage des NP est un autre paramètre qui peut réduire la capacité du TiO<sub>2</sub> à produire des ERO (Carlotti et al., 2009).

### 1.3.2. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans l'environnement

Les principales sources de contamination de l'environnement sont les eaux usées, les boues de stations d'épuration et les déchets solides (EPA 2010). Les nanocomposés de TiO<sub>2</sub> libèrent des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> mais aussi des résidus ou sous-produits d'altération au cours de leur cycle de vie (Reijnders, 2009). Botta et al. (2011) a montré que les crèmes solaires induisent la production de résidus de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> qui tendent à s'agréger et sédimenter au cours de leur cycle de vie. Le processus d'altération des nanocomposés de TiO<sub>2</sub>, utilisés dans les crèmes solaires, a été mimé pour produire des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> qui se sont révélés être stables en suspension dans l'eau (Auffan et al., 2010; Labille et al., 2010). Il a été montré que les propriétés photocatalytiques des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> contenues dans les crèmes solaires sont conservées même après leur utilisation (Barker et Branch, 2008) et l'altération de leur enrobage.

Quelques études ont modélisé les concentrations prédites dans l'environnement du TiO<sub>2</sub> de taille nanométrique dans les différents compartiments : air, eau, sol, sédiments (Tab. III). Les concentrations dans l'air sont très faibles de l'ordre du ng/m<sup>3</sup>, alors que celles dans l'eau varient de l'ordre du ng/l au µg/l (Mueller et Nowack, 2008; Gottschalk et al., 2009; Johnson et al., 2011). Les concentrations les plus fortes sont prédites dans les effluents, les boues de stations d'épuration et les sédiments. Les teneurs dans les sols sont de l'ordre de quelques µg/kg mais ils pourraient s'enrichir de 89 µg/kg en NP de TiO<sub>2</sub> chaque année dans le cadre d'une usure et d'un recyclage classique des nanoproduits (Gottschalk et al., 2009). Il est possible que les concentrations augmentent lors de l'introduction volontaire dans l'environnement ou d'une dissémination accidentelle.

**Tableau III.** Concentrations prédites en nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans l'environnement dans différents compartiments (E-U : Etats-Unis)

Air	<0,5 ng/m <sup>3</sup>	Europe	Gottschalk et al. (2009)
	<0,5 ng/m <sup>3</sup>	E-U	
	0,7-3 ng/m <sup>3</sup>	Suisse	
	1,5- 4,2 ng/m <sup>3</sup>	/	
Eau	0,7-16 µg/l	/	Mueller et Nowack (2008)
	0,5 – 8,8 µg/l	Tamise (UK)	Johnson et al. (2011)
Eau de surface	0,012 – 0,057 µg/l	Europe	Gottschalk et al. (2009)
	0,002 – 0,01 µg/l	E-U	
	0,016 – 0,085 µg/l	Suisse	
Effluents de stations d'épurations	2,5 – 10,8 µg/l	Europe	Gottschalk et al. (2009)
	1,37 – 6,7 µg/l	E-U	
	3,5 – 16,3 µg/l	Suisse	
Boues de station d'épuration	100 - 433 mg/kg	Europe	Gottschalk et al. (2009)
	107 - 523 mg/kg	E-U	
	172 - 802 mg/kg	Suisse	
Sol	0.4 - 4.8 µg/kg	/	Mueller et Nowack (2008)
Sédiment	273 - 1409 µg/kg/an	Europe	Gottschalk et al. (2009)
	44 - 251 µg/kg/an	E-U	
	426 - 2382 µg/kg/an	Suisse	

Contrairement aux milieux aquatiques, le suivi du devenir et du transport des NP de TiO<sub>2</sub> dans les sols est encore très peu étudié. Les principaux facteurs qui modifient l'état d'agrégation des nanoparticules sont la force ionique, la présence de matière organique naturelle, de cations divalents et le pH (Dunphy Guzman et al., 2006; Domingos et al., 2009; French et al., 2009; Solovitch et al., 2010). La mobilité des NP est généralement évaluée en



utilisant des colonnes de sols (Fang et al., 2009; Solovitch et al., 2010). Cette technique permet d'apprécier la proportion de particules retenues par la matrice solide. La mobilité des particules dans les matrices solides poreuses dépend de la taille des nanoparticules (Lecoanet et al., 2004). D'après ces auteurs, la mobilité diminuerait quand la taille des NP augmente. Les sols sont des matrices complexes qui peuvent retenir les NP de  $\text{TiO}_2$  en fonction de la salinité, de la teneur en argile ou en carbone organique dissous (Fang et al., 2009). Les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  traversent facilement les colonnes de sols constituées principalement de grosses particules (ex : sable) avec une faible force ionique, alors qu'elles sont fortement retenues dans les colonnes de sols avec des salinités et teneurs en argile élevées (Fang et al., 2009).

Les propriétés physico-chimiques et la mobilité des NP de  $\text{TiO}_2$  dans l'environnement peuvent modifier leur biodisponibilité et leur toxicité potentielle. Il est donc important d'évaluer le risque que ces nanoparticules présentent pour l'Homme et la qualité des écosystèmes terrestres et aquatiques tout en évaluant leurs capacités de diffusion dans l'environnement.

## 2. Les vers de terre, organismes bioindicateurs de la qualité des sols

### 2.1. Les vers de terre

La biomasse faunistique des sols est constituée principalement par les vers de terre. Ils ont un rôle important au niveau de l'écosystème terrestre en tant que décomposeurs (Edwards et Bohlen, 1996). Ils jouent en effet un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique du sol mais également dans la structuration (agrégats) et dans l'aération du sol en creusant des galeries. Ils ont un rôle important dans la chaîne alimentaire car ils sont une source d'alimentation pour les niveaux trophiques supérieurs.

Les vers de terre sont des organismes coelomates constitués d'une succession d'anneaux (métamères). Ce sont des organismes hermaphrodites qui se reproduisent par accouplement « tête-bêche » en produisant des cocons contenant les ovules et spermatozoïdes (Fig.6a). La fécondation a lieu dans les cocons et les juvéniles éclosent (Fig.6b). Une fois que les juvéniles atteignent leur maturité sexuelle, les vers de terre adultes sont alors caractérisés par un clitellum bien développé qui correspond à l'organe reproducteur (Fig.6c).

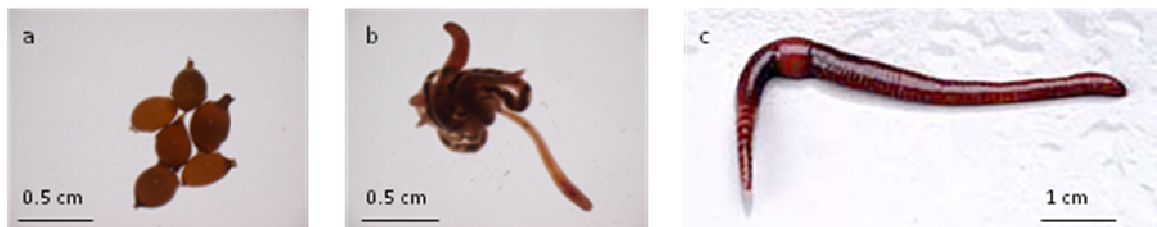


Figure 6. Photographie de cocons (a), vers juvéniles (b) et adultes (c) *Eisenia fetida*

Les vers de terre sont considérés comme de bons bioindicateurs de la qualité des sols en écotoxicologie. En effet, les voies dermale et intestinale sont les 2 principales voies de contamination des vers du fait de leur surface importante sur la masse du corps du ver et de l'ingestion des particules de sols (Goven et al., 2005). De nombreuses études ont évalué l'écotoxicité des métaux, HAPs, pesticides et sols multi-contaminés sur les vers de terre (Spurgeon et Hopkin, 1996; Bierkens et al., 1998; Saint-Denis et al., 1999; Reinecke et al., 2001; Lock et Janssen, 2002a; Lock et Janssen, 2002b; Maboeta et al., 2004; Spurgeon et al., 2004; Sivakumar et Subbhuraam, 2005; Eom et al., 2007; Nahmani et al., 2007a; b; Brulle et al., 2008a; Brulle et al., 2008b; Garcia et al., 2008; Bonnard et al., 2009).

## 2.2. L'espèce, *Eisenia fetida*

*Eisenia fetida* (Savigny, 1826) est un annélide oligochète de la famille des Lumbricidae. *Eisenia fetida* est une espèce corticole en milieu naturel ou épigé en milieu agricole et dans le fumier. Elle vit à la surface des milieux riches en matières organiques, sa stratégie biodémographique est de type « r » avec une capacité de reproduction élevée, une croissance rapide compensant une faible longévité, une mobilité importante et une homochromie avec l'environnement (Bouché, 1972)

*Eisenia fetida* est recommandée aussi bien par l'OCDE (1984) que par l'agence pour la protection environnementale aux Etats Unis (US-EPA, 1996) en tant que bioindicateur. La qualité environnementale des sols est déterminée grâce aux tests écotoxicologiques réalisés sur *Eisenia fetida*. Deux tests sont normalisés sur cette espèce: le test mortalité (ISO 11268-1, 1993) et le test reproduction (ISO 11268-2,1998). *Eisenia fetida* présente l'avantage d'être facile à maintenir en élevage. Les tests sur cette espèce sont réalisés dans des conditions de pH, température, humidité, cycle jour/nuit contrôlées. De nombreuses études ont utilisées cette espèce pour évaluer les effets des polluants sur les vers de terre ce qui permet la comparaison dans des mêmes conditions d'exposition. Cependant, *E. fetida* n'est pas une espèce représentative des écosystèmes terrestres. Il est alors difficile d'extrapoler les effets obtenus sur cette espèce à l'environnement.

## 3. Ecotoxicité des nanomatériaux à différentes échelles biologiques

### 3.1. Effets sur les systèmes antioxydant et de détoxification

#### 3.1.1. Protéines des systèmes antioxydant et de détoxification

Les NP sont connues pour produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (anion superoxyde,  $O_2^-$ ; peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ ; radical hydroxyle,  $OH\cdot$ ) qui peuvent conduire à un stress oxydant qui altère les protéines, les lipides et l'ADN de la cellule. Les cellules des organismes contiennent un grand nombre de systèmes de défense antioxydant qui les protègent des ERO.

Les principales enzymes de ce système sont les superoxydes dismutases (Xie et al., 2005), la catalase (Allouni et al., 2009), les glutathion peroxydases sélénium-dépendante (SeGPx) et sélénium-indépendantes (non-SeGPx), la glutathion réductase (GRd) et les glutathion S-transférases (GST) (Fig.7). La SOD convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène divalent (Fridovich, 1989). La CAT catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène moléculaire ( $1/2 O_2$ ) (Deisseroth et Dounce, 1970). Les GPx catalysent la réduction des ERO, en utilisant le glutathion (GSH) comme substrat pour réduire les composés oxydés. Les Se-GPx catalysent la réduction des peroxydes organiques et inorganiques alors que les GPx sélénium indépendantes réduisent uniquement les peroxydes organiques (Almar et al., 1998). La glutathion réductase est une enzyme NADPH dépendante qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) pour maintenir le niveau de glutathion réduit constant.

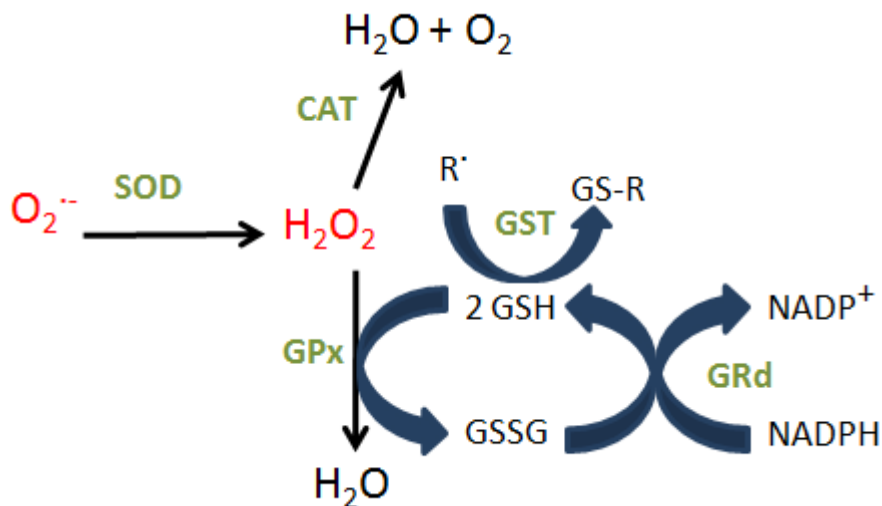


Figure 7. Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et la glutathion réductase (GRd)

Le système de défense des organismes est également constitué d'enzymes de détoxification. Parmi celles-ci, la GST est une enzyme ubiquitaire impliquée dans la phase II du système de biotransformation. Elle a pour but de conjuguer le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles pour faciliter leur élimination (Ketterer et al., 1983). Elle neutralise un grand nombre de xénobiotiques et de métabolites endogènes par conjugaison, par activité peroxydase glutathion dépendante ou par réaction d'isomérisation (Hayes et al., 2005). La métallothionéine (MT) est une protéine non enzymatique, inductible, de faible poids moléculaire et riche en cystéine. Elle permet la chélation et la détoxification des métaux mais

aussi l'homéostasie des métaux essentiels tels que le zinc ou le cuivre (Gruber et al., 2000; Kammenga et al., 2000). La MT est préconisée comme biomarqueur d'exposition métallique des invertébrés terrestres (Dallinger, 1996) dont les vers de terre (Morgan et al., 1989; Stürzenbaum et al., 1998).

### 3.1.2. Effet des nanomatériaux sur le système antioxydant

Les effets des contaminants sur les protéines de détoxification sont évalués par des analyses biochimiques mesurant les activités des enzymes antioxydantes (Saint-Denis et al., 1999; Hao et al., 2009; LaCourse et al., 2009; Xiong et al., 2011; Posgai et al., *in press*) ou par des analyses de biologie moléculaire évaluant le niveau d'expression des ARNm des gènes codant pour les protéines des systèmes antioxydant et de détoxification des organismes étudiés (Usenko et al., 2008; Roh et al., 2010; Chen et al., 2011). La méthode de biologie moléculaire présente l'avantage d'être prédictive mais elle nécessite le séquençage des gènes étudiés. Les 2 techniques principalement utilisées sont la PCR en temps réel et les puces à ADN. Elles nécessitent l'extraction des ARN des tissus et/ou organismes étudiés et leur rétrotranscription en ADNc. La PCR en temps réel permet de quantifier le niveau d'expression des ARNm des gènes étudiés dans différentes conditions. Les puces à ADN sont généralement utilisées pour les organismes dont un grand nombre de gènes sont séquencés, ce qui permet une analyse en batterie. Elles permettent d'évaluer les variations de l'expression des ARNm d'un grand nombre de gènes en une expérience et de sélectionner les gènes d'intérêt. Les résultats concernant ces derniers, sont ensuite confirmés par PCR semi-quantitative en temps réel (RT-qPCR) pour obtenir des résultats plus fiables.

#### 3.1.2.1. Organismes aquatiques

Les nanoparticules de carbone (C60 à 200 ppb) induisent une augmentation de l'expression de la GST et des HSP70 sur les embryons du poisson zèbre (*Danio rerio*) (Usenko et al., 2008). Ces effets ont été évalués par la technique de puces à ADN et validés par RT-qPCR.

La comparaison de la toxicité des NP d'Ag et de l'AgNO<sub>3</sub> sur les hépatocytes du poisson, *Japanese medaka*, montre que les NP d'Ag et de l'AgNO<sub>3</sub> modifient l'expression des ARNm des gènes de détoxification (MT, HSP70, GST et CYP1A1) avec une réponse au stress plus importante avec les NP d'Ag (Chae et al., 2009). Une étude sur le poisson zèbre exposé 24 heures à des NP d'Ag dépourvues d'ion Ag<sup>+</sup> montre une augmentation de l'expression des ARNm de la MT, une diminution de l'expression de la CAT et de la GPx et aucun effet sur la

SOD (Choi et al., 2010). Une induction de l'expression des ARNm de la MT a été observée dans des embryons et des huîtres adultes après 48 heures d'exposition à 0,16 µg/l de NP d'Ag (Ringwood et al., 2010).

Comme les NP d'Ag, la toxicité des NP de cuivre et des ions  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuCl}_2$ ) est étudiée en parallèle pour déterminer la part des effets des ions et des NP. Les variations d'expression des ARNm de la GST et SOD sont similaires et de même ordre avec les NP  $\text{Cu}_2\text{O}$  et le  $\text{CuCl}_2$ , alors que l'induction de la MT est plus importante dans les larves de poissons exposées aux NP de  $\text{Cu}_2\text{O}$  que les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuCl}_2$ ) (Chen et al., 2011).

Quelques études ont évalué les effets des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sur le système antioxydant des organismes aquatiques (Tab. IV). Les travaux réalisés sur le modèle *D. magna* montrent que les systèmes antioxydants des daphnies sont induits suite à l'exposition aux NP (Klaper et al., 2009; Kim et al., 2010). En effet, une exposition de 48 heures des daphnies, *D. magna*, au NP  $\text{TiO}_2$  (anatase/rutile) entraînent une augmentation de l'activité de la CAT, GPX et GST à partir de 1 mg/l. Après 21 jours, une mortalité significative est observée à 5 et 10 mg/l alors qu'aucun effet sur la reproduction n'a été observé (Kim et al., 2010). Une exposition *in vitro* de 30 min des hémocytes, de la moule *Mytilus galloprovincialis*, aux NP  $\text{TiO}_2$  suffit pour induire une augmentation de l'activité des lysozymes et de la production d'ERO (Canesi et al., 2010a). Une augmentation de la déstabilisation membranaire des lysosomes, de l'accumulation des lipofuchsines et des lipides neutres et l'augmentation de l'activité de la CAT et la GST sont observées dans la glande digestive de la moule, *M. galloprovincialis*, exposées 24h au NP  $\text{TiO}_2$  (Canesi et al., 2010b). Ces organismes filtreurs semblent répondre au stress des NP de  $\text{TiO}_2$  par l'induction du système de détoxification et antioxydant. La Truite, *Onchorhynchus mykiss*, montre une augmentation de la lipoperoxydation, du taux de glutathion et une diminution de l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase dans les branchies après 14 jours d'exposition aux NP de  $\text{TiO}_2$  (0,1 à 5 mg/l) (Federici et al., 2007). Ces modifications physiologiques du poisson semblent être expliquées par le stress oxydant généré par les NP  $\text{TiO}_2$ . Bien que des effets toxiques soient observés, aucune bioaccumulation du titane n'a été mise en évidence dans les différents organes du poisson (branchies, foie, muscles et cerveau).

**Tableau IV.** Effets des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur le système antioxydant des organismes aquatiques

Nanoparticules (NP)	Exposition	Concentration	Temps	Organismes/ Cellules	Effets	Références
NP TiO <sub>2</sub> (P-25, 22 nm)	<i>in vitro</i>	1, 5, 10 µg/ml	30 min à 4 heures	Hémocytes ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Pas d'effet sur la stabilité membranaire des lysosomes 30 et 60 min: augmentation de l'activité des lysozymes dans le milieu extracellulaire 30 min : augmentation de la production ERO extracellulaire à partir 5 µg/ml Activation rapide (5 min) de p38 MAPK => réponse inflammatoire	Canesi et al. (2010a)
NP TiO <sub>2</sub> (P-25, 22 nm)	<i>in vivo</i>	0,05- 0,2- 1 et 5 mg/l	24 heures	Moule, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	<b>Hémocytes:</b> diminution de la stabilité membranaire des lysosomes à partir de 1 mg/l augmentation des activités antioxydantes (CAT ) à partir de 1 mg/l <b>Glande digestive:</b> diminution de la stabilité membranaire des lysosomes à partir de 0,2 mg/l accumulation lipofuchsine à partir de 1 mg/l et lipides neutres à partir de 5 mg/l augmentation des activités antioxydantes à partir de 1 mg/l (CAT ) et à partir de 0,2 mg/l (GST)	Canesi et al. (2010b)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (23.2 nm)	Sédiment naturel	1 - 3 g/kg	10 jours	Ver arenicole, <i>Arenicola marina</i>	Diminution du taux d'alimentation des vers à 2 g/kg à partir de 2 jours Dommages cellulaires et à l'ADN à partir de 2 et 3 g/kg à 10 jours LOEC: 1 g/kg	Galloway et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (5 nm)	<i>in vitro</i>	0,1 à 1000 µg/ml	2, 24 heures	Cellules dermiques (GFSk-S1) de poisson ( <i>Carassius auratus</i> )	Effets génotoxiques à partir de 1 µg/ml et faible cytotoxicité dépendante de la concentration en NP TiO <sub>2</sub> Traitement UV augmente les effets cytotoxiques et génotoxiques des NP TiO <sub>2</sub> µg/ml	Reeves et al. (2008)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (24 nm)	<i>in vitro</i>	50 µg/ml	4, 24 heures	Cellules de gonades (RTG-2) de poisson ( <i>Onchorhynchus mykiss</i> )	Absence UV: faible cytotoxicité (diminution de l'intégrité membranaire des lysosomes) Irradiation UV : dommages à l'ADN et cytotoxicité	Vevers et Jha (2008)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/ rutile (P-25,21 nm)	<i>in vivo</i>	0,1- 0,5 et 1 mg/l	14 jours	Truite, <i>Onchorhynchus mykiss</i>	Pas de bioaccumulation des NP de TiO <sub>2</sub> dans les tissus Diminution de l'activité Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> - ATPase dans les branchies et intestins Augmentation de la lipoperoxydation dans les branchies, intestins et cerveau Modification des teneurs en GSH dans le foie et les branchies	Federici et al. (2007)

### 3.1.2.2. Organismes terrestres : Approche toxicologique

L'injection de NP d'argent (25 nm) à 500 mg/kg et 1000 mg/kg par voie intra péritonéale à une souris entraîne un stress oxydant qui augmente ou diminue l'expression des ARNm de la SOD, GPx et GRd, selon la région du cerveau testée (Rahman et al., 2009). La toxicité des NP d'argent est généralement étudiée en comparaison avec celle des ions  $\text{Ag}^+$  ( $\text{AgNO}_3$ ). En effet, les particules d' $\text{AgNO}_3$  induisent une augmentation de l'expression des ARNm de la MT, GPx, SOD et CAT alors que les NP d'Ag (<10 nm) induisent uniquement une augmentation de l'expression de la SOD et de la catalase des hépatocytes humain (HepG2) (Kim et al., 2009b).

Les effets des NP  $\text{TiO}_2$  ont été également étudiés sur l'expression des ARNm des gènes antioxydants et de détoxification chez l'homme. L'exposition *in vitro* de cellules pulmonaires humaines aux NP  $\text{TiO}_2$  (P-25) pendant 4 heures induit une augmentation de l'expression des ARNm des gènes antioxydants (catalase et GST) après 3 heures d'exposition (Park et al., 2008). Le niveau d'expression des gènes de la réponse inflammatoire (IL-1, IL-6, IL-8) augmente également à 4 heures puis diminue pour rejoindre le niveau basal après 24 heures. Les effets des NP  $\text{TiO}_2$  (anatase) sur des souris contaminées par voie intra gastrique pendant 60 jours, montre une diminution significative de l'expression de la SOD, CAT, GPx, GST et MT dans les cellules hépatiques de la souris (Cui et al., 2010). Les effets sont observés à 10 et 50 mg/kg et sont dose dépendant. La surproduction d'ERO par les NP semble être liée à la diminution des systèmes antioxydant et de détoxification.

### 3.1.2.3. Organismes terrestres : Approche environnementale

Seules quelques études ont évalué la toxicité des NP sur les invertébrés terrestres (ver de terre et nématode) en mesurant le niveau d'expression des gènes de détoxification (Roh et al., 2009; Unrine et al., 2010a; Unrine et al., 2010b) ou les activités enzymatiques (Jemec et al. 2008 ; Drobne et al. 2009; Hu et al. 2010) (Tab. V).

La toxicité des NP d'Ag a été étudiée par la technique de puces à ADN sur le nématode, *C. elegans*, dont le génome est entièrement séquencé (Roh et al., 2009). Ces auteurs ont montré des variations d'expression pour plusieurs gènes dont la MT, GST, CAT et SOD. Les résultats de RT-qPCR ont montré qu'une exposition de 24h aux NP d'Ag à des concentrations inférieures à 0,5 mg/l induit une augmentation de l'expression de la MT et de la SOD, mais aucun effet sur l'expression de la CAT et la GST n'a été mesuré (Roh et al., 2009).



Les NP de cuivre induisent une augmentation de l'expression de la MT du ver *E. fetida*, à partir 20 mg/kg, alors que les particules de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) induisent l'expression de la MT à partir de 10 mg/kg (Unrine et al., 2010b).

La toxicité des NP d'or a été comparée à celle des ions Au ( $\text{HAuCl}_4$ ). Aucune variation d'expression de la CAT, SOD, HSP70 et HSP60 n'a été observée chez le ver *E. fetida* exposé aux 2 particules, seul  $\text{HAuCl}_4$  a induit une augmentation de l'expression de la métallothionéine à partir de 2,5 mg/kg (Unrine et al., 2010a).

Les effets des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sur le système antioxydant ont été évalués principalement sur les cloportes et les vers. L'activité de la CAT et de la GST du cloporte, *P. scaber*, nourri 3 jours par des feuilles contaminées aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  est diminuée seulement si la suspension de NP n'a pas été soniquée (Jemec et al., 2008). Ces travaux montrent que la méthode de préparation des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  modifie la réponse enzymatique des organismes. Une exposition de 14 jours des cloportes à 1000  $\mu\text{g/g}$  de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  avec ou sans sonication augmente l'activité de la CAT sans modifier celle de la GST (Drobne et al. 2009). La catalase semble sensible à la présence de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ . En effet, son activité est augmentée chez les vers, *E. fetida*, exposés à des sols contaminés à 1 g/kg de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ . A cette même concentration, aucune modification de l'activité de la SOD n'a été observée alors que des effets génotoxiques et la bioaccumulation du titane ont été mesurés (Hu et al. 2010). Les NP de  $\text{TiO}_2$  et de  $\text{CeO}_2$  induisent une augmentation de l'expression du *cyp35a2* chez le nématode *C. elegans*, mais elles ne modifient pas l'expression de la MT, GST et SOD (Roh et al., 2010).

**Tableau V.** Effets des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur le système antioxydant des invertébrés terrestres

Nanoparticules (NP)	Milieu	Concentration	Temps	Organismes	Effets	Références
NP Ag (<100 nm)	Milieu liquide (0.032 M KCl, 0.051 M NaCl)	0,05- 0,1- 0,5 mg/l	24 heures	Nématode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	0,1 mg/l: Augmentation de l'expression de la SOD 0,5 mg/l: Augmentation de l'expression de la SOD et MT	Roh et al. (2009)
NP Cu (<100 nm)	Sol artificiel ISO	0 à 65 mg/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	NP Cu: Augmentation de l'expression de la MT à partir de 20 mg/kg CuSO <sub>4</sub> : Augmentation de l'expression de la MT à partir de 10 mg/kg	Unrine et al. (2010b)
NP Au (20, 55 nm)	Sol artificiel ISO	5, 20, 50 mg Au/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	NP Au : Pas de variations d'expression de la MT HAuCl <sub>4</sub> : Augmentation de l'expression de la MT à partir de 2,5 mg/kg	Unrine et al. (2010a)
NP ZnO (30 nm)	Milieu liquide	50 à 1000 mg/l	96 heures	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	Diminution de l'activité de la SOD à partir de 500 mg/l Pas de modifications des activités de la CAT et GPx	Li et al. (2011a)
	Milieu agar	50 à 1000 mg/kg			Diminution de l'activité de la SOD à partir de 100 mg/kg Pas de modifications des activités de la CAT et GPx	Li et al. (2011a)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (<25 nm) NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile ( <75 nm)	Nourriture (feuille)	100 - 1000 µg/g nourriture	3 et 14 jours	Cloporte, <i>Porcellio scaber</i>	3 jours: Pas d'effet sur l'activité de la CAT et GST 14 jours: Augmentation de l'activité de la CAT	Drobne et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (15 nm)	Nourriture (feuille)	0,1 à 3000 µg/g nourriture	3 jours	Cloporte, <i>Porcellio scaber</i>	Absence de sonication: Diminution activité GST, CAT à 0,5, 2000 et 3000 µg/g Sonication: Pas de modification des activités	Jemec et al. (2008)
NP TiO <sub>2</sub> rutile (10-20 nm)	Sol artificiel ISO	0,1-0,5-1-5 g/kg	7 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	A partir de 1 g/kg : Bioaccumulation du titane dans les vers et dommages à l'ADN 1 g/kg: Augmentation de l'activité de la catalase 5 g/kg : Augmentation de la lipoperoxydation et altération des mitochondries	Hu et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (7 et 20 nm)	Milieu liquide (0.032 M KCl, 0.051 M NaCl)	1 mg/l	24 heures	Nématode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	Plus petites NP (7 nm) semblent plus toxiques que les plus grandes (20 nm) TiO <sub>2</sub> (7 nm): Augmentation expression du gène cyp35a2 (métabolisation), mais aucune variation d'expression de la SOD, GST, MT	Roh et al. (2010)

## 3.2. Biomarqueur cellulaire

### 3.2.1. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est un biomarqueur cellulaire qui permet de déterminer la cytotoxicité des contaminants. Il existe une variété de tests de viabilité cellulaire dont les principaux sont le test d'exclusion au bleu trypan, fixation au rouge neutre, LDH (Lactate DeHydrogenase) et le test MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). La majorité des travaux concernant les effets des NP sur la viabilité cellulaire sont réalisés sur des cellules de mammifères. Dans ces études, la viabilité cellulaire est principalement évaluée en utilisant le test MTT (Gurr et al., 2005; Jia et al., 2005; Wagner et al., 2007; Park et al., 2008; Magrez et al., 2009), le test LDH (Kim et al., 2009a; Lin et al., 2009) ou les 2 tests en parallèle (Sayes et al., 2006; Jin et al., 2008; Simon-Deckers et al., 2008; Napierska et al., 2009; Barillet et al., 2010).

#### 3.2.1.1. *Le test MTT*

Le test MTT est un test indicateur de la prolifération et du métabolisme mitochondriale (Tonn et al., 1994). Le principe du test MTT est basé sur la réduction du MTT par les cellules métaboliquement actives en sel de formazan. L'étude de la toxicité des nanotubes de carbone (SWNT et MWNT10) par le test MTT montre une plus forte cytotoxicité des SWNT que des MWNT10 sur les macrophages après 6 heures d'exposition (Jia et al., 2005). Cependant, il s'avère que les NP de carbone ou de silice mésoporeuse peuvent provoquer des faux positifs en utilisant le test MTT (Wörle-Knirsch et al., 2006; Fisichella et al., 2009). Les nanotubes de carbone peuvent interférer avec le substrat MTT par adsorption, diminuant la quantité de MTT libre, ce qui conduit à une surestimation de la cytotoxicité des NP (Wörle-Knirsch et al., 2006). Des résultats similaires ont été observés avec des nanotubes de carbone et C<sub>60</sub> (Monteiro-Riviere et al., 2009). Les NP présentent également des propriétés oxydatives qui peuvent interagir dans les réactions d'oxydo-réduction produisant les sels de formazan colorés (Stone et al., 2009). Les nouvelles propriétés des NP (aire et charge de surface, optique, magnétique, catalytique) peuvent interférer avec les milieux réactionnels des protocoles des tests de cytotoxicité (Stone et al., 2009).

Il est recommandé d'associer plusieurs tests de cytotoxicité complémentaires pour améliorer la fiabilité des résultats (Fotakis et Timbrell, 2006) car il est reconnu que les NP interfèrent

avec les tests toxicologiques classiques (Kroll et al., 2009; Monteiro-Riviere et al., 2009; Stone et al., 2009; Fröhlich et al., 2010).

### 3.2.1.2. *Le test LDH*

Le test LDH est un test de viabilité cellulaire qui évalue l'intégrité de la membrane par la mesure de l'activité de la lactate deshydrogénase. Cette enzyme est naturellement présente dans le cytoplasme des cellules et sa libération dans le milieu de culture est indicatrice de mort cellulaire suite à l'altération de la membrane cellulaire. La grande surface spécifique des NP peut favoriser l'adsorption des protéines LDH à la surface des NP, ce qui peut conduire à une sous-estimation de la cytotoxicité des NP (Stone et al., 2009). Par exemple, la LDH purifiée présente une forte propension à se lier aux NP TiO<sub>2</sub> (anatase, 5 nm) et une forte activité pour des faibles concentrations en nanoparticules (Duan et al., 2010). En revanche, pour des concentrations plus fortes en NP TiO<sub>2</sub>, l'activité LDH est inhibée, ce qui montre que les NP TiO<sub>2</sub> peuvent altérer les fonctions et la structure de la LDH.

Afin de minimiser les biais de l'utilisation des tests de cytotoxicité avec les NP, l'étude d'au moins 2 biomarqueurs de la viabilité cellulaire est réalisée dont les 2 principaux sont l'activité mitochondriale (test MTT) et l'activité LDH (test LDH).

### 3.2.1.3. *Organismes terrestres : Approche toxicologique*

L'activité mitochondriale et la quantité de LDH libérée sont souvent étudiées pour évaluer la viabilité des cellules exposées aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (Tab. VI). Le test MTT a montré que les NP TiO<sub>2</sub> diminuent la viabilité des cellules pulmonaires humaines (BEAS-2B) de manière dose et temps dépendant (Park et al., 2008). Ces auteurs suggèrent que les NP TiO<sub>2</sub> exercent leur cytotoxicité par le mécanisme d'apoptose. Les NP TiO<sub>2</sub> (anatase) diminuent l'activité MTT et augmentent la quantité de LDH libéré dans les cellules dermiques (HDF) et des pneumocytes (A549) humains après 48 heures d'exposition à des concentrations supérieures à 1500 µg/ml (Sayes et al., 2006). Des effets cytotoxiques mesurés par le test LDH ont été observés sur les pneumocytes humains (A549) exposés à 100 µg/ml de nanotubes de carbone pendant 48 heures (Simon-Deckers et al., 2008). Ces auteurs ont montré une diminution drastique de la viabilité cellulaire (CL<sub>50</sub> = 0,5 µg/ml) avec le test MTT. Il est possible que le MTT interagisse avec les nanotubes de carbone car de faibles effets cytotoxiques ont été observés avec le test XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2Htetrazolium-5-carboxyanilide) connu pour ne pas avoir d'interaction avec les NP. En revanche, dans le cas d'une exposition aux NP de TiO<sub>2</sub>, le test MTT indique une mortalité

cellulaire légèrement supérieure à celle mesurée par le test LDH et XTT (Simon-Deckers et al., 2008). Ces résultats sont confirmés sur des cellules rénales de rat (NRK-52E) par Barillet et al. (2010). Les fibroblastes de souris exposées 48 heures aux NP TiO<sub>2</sub> ont montré une diminution de l'activité mitochondriale et une augmentation de la quantité de LDH libéré à partir de 60 et 600 µg/ml respectivement (Jin et al., 2008). Les études réalisées avec les 2 tests de cytotoxicité montrent globalement des résultats proches avec une plus forte sensibilité du test MTT par rapport au test LDH.

Une NP de TiO<sub>2</sub> enrobée d'aluminium et d'une couche amorphe de silice présente des effets cytotoxiques alors qu'aucun effet n'a été observé avec des NP non enrobées (Warheit et al., 2005). Les mêmes résultats ont été observés par Pan et al. (2009). Les résultats sont controversés car l'enrobage des NP réduirait la capacité du TiO<sub>2</sub> à produire des ERO (Carlotti et al., 2009). Les études de nanotoxicité montrent que les NP de TiO<sub>2</sub> pénètrent dans les cellules par endocytose sous forme de particules libres ou de petits agrégats. Elles sont généralement accumulées dans des lysosomes qui participent à la détoxification, ou traversent les cellules intestinales par transcytose sans altération de la cellule (Koeneman et al., 2010). Les NP de TiO<sub>2</sub> peuvent modifier l'activité métabolique des cellules et entraîner des effets cytotoxiques mesuré par le test MTT en libérant des ERO (Jin et al., 2010). Ces observations sont généralement vérifiées par la mesure de l'intégrité membranaire par le test LDH (Simon-Deckers et al., 2008; Barillet et al., 2010).

**Tableau VI.** Cytotoxicité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> sur des cellules humaines et de mammifères

Nanoparticules (NP)	Concentration	Temps	Cellules	Effets	Références
NP TiO <sub>2</sub> (P-25; 21 nm)	5 - 10 - 20 - 40 - µg/ml	3-24 - 48 -72 - 96 heures	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	Diminution de la viabilité cellulaire dose et temps dépendant 24H: Augmentation production de ERO à partir de 20 µg/ml, et diminution du niveau de glutathion réduit dose dépendante et de l'activité caspase 3 3 H: Induction des gènes du stress oxydatif à partir de 5 µg/ml	Park et al. (2008)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (10.1 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (5,2 nm) NP TiO <sub>2</sub> anatase/ rutile (3,2 nm)	0,3 µg/ml - 30 mg/ml	48 heures	Cellules humaines HDF (fibroblastes) et A549 (pneumocytes)	Anatase: Faible diminution de la viabilité cellulaire aux plus fortes concentrations Rutile: pas d'effets Les UV accentuent la diminution de la viabilité cellulaire (anatase et rutile) CL <sub>50</sub> (anatase) = 3,6 µg/ml CL <sub>50</sub> (rutile) = 550 µg/ml	Sayes et al. (2006)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (142 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (68x9, LxD) NP TiO <sub>2</sub> (P-25; 24 nm) NP TiO <sub>2</sub> (CEA; 12 nm)	0,25-100 µg/ml	1 à 72 heures	Pneumocytes humains A549	Faible cytotoxicité qui augmente avec la concentration en NP Cinétique: Cytotoxicité augmente avec le temps Présence des NP dans le cytoplasme et dans des vacuoles ressemblant à des lysosomes	Simon-Deckers et al. (2008)
Nanofilaments de TiO <sub>2</sub> (Na <sub>x</sub> TiO <sub>2+δ</sub> )	0,02-2 µg/ml	1-4 jours	Cellules de tumeurs de poumons humaines H596	A partir de 2 jours à 2 µg/ml: diminution prolifération/activité métabolique des cellules 2 jours à partir de 0,02-2 µg/ml: Effet dose réponse sur la prolifération cellulaire et mort cellulaire	Magrez et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (10,1 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (15 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile enrobée (200 nm)	0,4 et 0.8 mg/ml	2, 3, 6 et 11 jours	Fibroblastes dermiques humains	Rutile => 2 jours: Diminution de la migration des cellules dès 4 mg/ml 6 jours: Altération de la morphologie des cellules et diminution du nombre de cellules à 0,4 et 0,8 mg/ml Anatase=> 3 jours: Diminution du nombre de cellules à partir 0.3 mg/ml Rutile enrobé=> 11 jours : pas d'effets sur la prolifération cellulaire Production H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : anatase>rutile> rutile enrobé= témoin	Pan et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (<25 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (<5 µm) NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (<100 nm)	200 µg/ml	4 heures à 37°C	Cellules humaines HaCaT (keratinocyte)	Anatase: Altération de la membrane mitochondriale => augmentation de la production d'ERO Rutile: Présent dans cytoplasme => pas de production ERO Mélange: Altération de la membrane mitochondriale => augmentation de la production d'ERO et des lysosomes	Jin et al. (2010)

Nanoparticules (NP)	Concentration	Temps	Cellules	Effets	Références
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (< 100 nm)	0,005 - 4 mg/ml	24 et 48 heures	Monoblastes humains U937	Augmentation du nombre de cellules apoptotiques aux faibles et fortes concentrations après 24 et 48h Diminution de la perméabilité membranaire (nécrose) à 2 et 4 µg/ml après 24 heures et à partir de 0.005 mg/ml après 48 heures d'exposition Modifications structurales des cellules: condensation de la chromatine, fragmentation noyau, boursoufflement de la membrane	Vamanu et al. (2008)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/ rutile (40 nm)	1-1000 µg/ml	24 heures	Cellules intestinales humaines CaCo-2	10-100 µg/ml: Pas d'altération de l'intégrité épithéliale des cellules => Transcytose des NP	Koeneman et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> (21,2 nm)	200- 1000 µg/ml	30 min - 24 heures	Cellules de carcinome du colon humaines Ls-174-t	24 h sans irradiation UVA : Pas d'effets cytotoxiques entre 200 et 1000 µg/ml Irradiation UVA + 1000 µg/ml: Diminution de la viabilité cellulaire à partir de 10 min => En présence UVA, viabilité cellulaire diminue quand la concentration en TiO <sub>2</sub> augmente et quand le temps augmente	Zhang et Sun (2004)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (142 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (68x9, LxD) NP TiO <sub>2</sub> (P-25; 24 nm) NP TiO <sub>2</sub> (CEA; 12 nm)	0,25-100 µg/ml	1 à 72 heures	Cellules rénales de rats NRK-52E	48H: Cytotoxicité des NP à partir de 10 µg/ml 24H: Augmentation de la production d'ERO cellulaire à partir 50 µg/ml et génotoxicité des NP à partir de 10 µg/ml	Barillet et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> (94 nm)	3-600 µg/ml	48 heures	Fibroblastes de souris L929	Quand la concentration en TiO <sub>2</sub> augmente => augmentation de la production d'ERO, diminution de la viabilité cellulaire, du glutathion et de la SOD	Jin et al. (2008)
Particules ultra-fines de TiO <sub>2</sub> (29 nm)	125,45-15 683 µg/ml	4 à 48 heures	Macrophages alvéolaires de souris J774.2	Pas d'effets cytotoxiques Diminution de la phagocytose à 125.45 µg/ml	Renwick et al. (2001)
NP TiO <sub>2</sub> (30 nm)	0,0052 - 520 µg/cm <sup>2</sup>	24 heures	Macrophage de souris RAW264.7	Diminution de la viabilité cellulaire dose dépendante	Kim et al. (2009a)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (<100 nm) NP TiO <sub>2</sub> rutile (51 nm) NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (<50 nm)	5-150 µg/ml	24 heures	Keratinocytes de souris HEL-30	Diminution de l'activité métabolique mitochondriale à partir de 5 µg/ml Anatase: Diminution de l'intégrité membranaire à partir de 5 µg/ml Rutile: forte production de ERO à partir de 10 µg/ml => Anatase : nécrose / Rutile: Apoptose	Braydich-Stolle et al. (2008)

### 3.2.2. Apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme d'autodestruction présent chez les organismes multicellulaires. Il s'agit d'un processus physiologique qui contrôle la prolifération cellulaire. La morphologie des cellules apoptotiques est caractérisée par une condensation du cytoplasme et de la chromatine, le clivage de l'ADN en fragments de 185 paires de bases, la perte de la perméabilité membranaire des mitochondries et le bourgeonnement de la membrane qui forment des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques contiennent une partie du cytoplasme de la cellule et seront éliminés par phagocytose par les cellules immunitaires. La reconnaissance de la cellule apoptotique par les phagocytes est facilitée grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérine qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire. Au cours de l'apoptose, l'intégrité de la membrane est conservée contrairement à la nécrose où la membrane plasmique est lysée.

Le test TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ and labeling) est une des techniques cytochimiques les plus répandues pour évaluer l'apoptose. Il consiste à détecter les sites simples et double brins de l'ADN en marquant les extrémités 3'-OH libres à l'aide de nucléotides modifiés (biotine-UTP, fluorescéine-dUTP) (Moore et al., 1995; Tinto et al., 2002) à l'aide de l'enzyme terminal desoxynucléotidyl transférase (TdT). Cependant cette technique TUNEL détecte les cellules apoptotiques et nécrotiques (Frankfurt et Krishan, 2001). Il n'est pas considéré comme un marqueur fiable et universel de l'apoptose. En revanche, le test Apostain est basé sur la sensibilité à la dénaturation par la chaleur des cellules apoptotiques. Cette technique permet de détecter uniquement les cellules apoptotiques, et peut être réalisée en complément du test TUNEL pour valider ses résultats. Le test Annexine V repose sur le principe que l'annexine est une protéine connue pour se lier aux phosphatidylsérine ce qui permet d'évaluer l'apoptose. Un autre paramètre de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN qui est mise en évidence par la migration de l'ADN sur gel et l'apparition d'« échelles d'ADN » correspondant aux fragments d'ADN.

L'ensemble de ces techniques permettent d'évaluer l'apoptose qui est considérée comme un mécanisme majeur de cytotoxicité des nanomatériaux (Pan et al., 2007).



### 3.2.2.1. Organismes aquatiques

Le test TUNEL a révélé un nombre important de cellules apoptotiques dans la région antérieure et caudale des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) exposés 12 h à des concentrations en fullerène (C<sub>60</sub> et C<sub>70</sub>) de l'ordre de 100 et 200 µg/l (Usenko et al., 2007).

Les nanoparticules d'Ag induisent une augmentation du nombre de cellules hépatiques apoptotiques chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposés 24 heures à 120 mg Ag/l (Choi et al., 2010). Ces effets apoptotiques ont été mesurés par le test TUNEL et ils ont été confirmés par l'augmentation de l'expression des ARNm des gènes pro-apoptotiques p53, Bax1, Noxa et p21. Il est possible que les ions Ag<sup>+</sup> issus de la dissolution des nanoparticules d'argent soient responsables de la toxicité observée.

### 3.2.2.2. Organismes terrestres : Approche toxicologique

Les effets des nanoparticules métalliques sur l'apoptose ont été majoritairement étudiés sur les cellules humaines ou mammifères.

La toxicité des nanoparticules d'argent sur l'apoptose a été mesurée en utilisant le test Annexin V. Une faible augmentation du nombre de cellules apoptotiques (5-9%) a été mesurée sur une population de fibroblastes exposés 48 heures entre 25-100 µg/ml de nanoparticules d'argent (AshaRani et al., 2009). En revanche, ces auteurs n'ont pas observés d'« échelle d'ADN » au cours de l'étude de la fragmentation de l'ADN ce qui est caractéristique de la fin de l'apoptose.

Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont des effets cytotoxiques via le processus d'apoptose (Park et al. 2008). Ces auteurs supposent que l'augmentation de la production d'ERO déclenche l'activation des caspase 3 et la condensation de la chromatine, caractéristiques de l'apoptose. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> induisent des modifications de structure des hépatocytes de souris intoxiquées par voie alimentaire, comme la condensation de la chromatine à 10 mg/kg et la formation de corps apoptotiques à 50 mg/kg (Cui et al., 2010). Ces effets semblent être liés à une accumulation d'ERO, à une diminution de l'expression des gènes du stress oxydant (SOD, CAT, GST, GPx, MT, P53) et à une augmentation de l'expression du cytochrome P450 1A. L'exposition des fibroblastes d'Hamster syrien embryonnaires à des particules ultra-fines de TiO<sub>2</sub> (5 µg/cm<sup>2</sup>) pendant 24 et 48 h entraîne la condensation de la chromatine (Rahman et al., 2002). Pour une concentration légèrement supérieure (10 µg/cm<sup>2</sup>), ces auteurs montrent la fragmentation de l'ADN, ce qui traduit un état avancé de l'apoptose. Une augmentation significative de l'ADN fragmenté a été montrée dans des cellules humaines U937 exposées aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (0,01 à 4 mg/ml) (Vamanu et al., 2008). Ces

auteurs confirment les effets apoptotiques de ces nanoparticules par MET en observent des modifications structurales des cellules caractéristiques de l'apoptose (condensation chromatine, fragmentation du noyau, boursoufflement de la membrane). Selon la structure cristalline des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, leurs mécanismes de cytotoxicité seraient l'apoptose ou la nécrose. D'après Braydich-Stolle et al. (2008), les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> anatase semblent avoir des effets cytotoxiques de type nécrose car elles altèrent l'intégrité de la membrane des cellules alors que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> rutile déclenche l'apoptose par leur production d'ERO.

### 3.2.2.3. Organismes terrestres : Approche environnementale

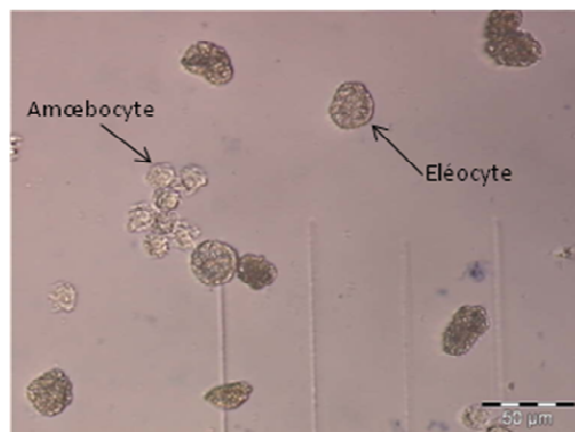
Les nanoparticules d'argent induisent une augmentation de nombre de cellules apoptotiques (31.9 cellules/mm<sup>2</sup>) dans les vers, *Lumbricus terrestris*, exposés à 100 mg/l dans un milieu liquide (eau) pendant 24 heures (Lapied et al., 2010). Ces auteurs montrent des effets beaucoup plus faibles mais significatifs dans des vers exposés à de la nourriture contaminée (6.67 cellules/mm<sup>2</sup>) ou à des sols dopés (9.07 cellules/mm<sup>2</sup>) aux NP d'Ag à une concentration de 100 mg/kg.

Les effets des sous produits d'altération de TiO<sub>2</sub> ont été évalués sur l'activité apoptotique du ver *L. terrestris*. L'exposition de ces vers en milieu liquide aux SPA (100 mg/l) pendant 7 jours entraîne une augmentation significative du nombre de cellules apoptotique dans les cellules intestinales et de la cuticule (Lapied et al., 2011). En revanche, aucun effet sur l'apoptose de vers n'a été observé avec de la nourriture contaminée aux SPA TiO<sub>2</sub> (10 et 100 mg/kg) pendant 8 semaines, ou dans des sols contaminés pendant 4 semaines (15 mg/kg) (Lapied et al., 2011). La toxicité des SPA dépend donc du milieu d'exposition et de ses propriétés physico-chimiques.

### 3.3. Biomarqueurs du système immunitaire

#### 3.3.1. Cellules du système immunitaire du ver de terre

La cavité cœlomique des vers de terre est remplie de fluide contenant des cellules du système immunitaire appelées cœlomocytes. Les cœlomocytes sont composés de 2 types cellulaires différents : les amœbocytes (hyalines et granuleuses) et les éléocytes (Fig.8). Les amœbocytes dérivent du mésothélium cœlomique (Hamed et al., 2002) alors que les éléocytes (ou chloragocytes) correspondent aux cellules circulantes chloragogènes issues du tractus digestif et des principaux vaisseaux sanguins qui en sont recouverts (Affar et al., 1998). Les amœbocytes reconnaissent et éliminent les corps étrangers par phagocytose et encapsulation (Dales et Kalaç, 1992; Cossarizza et al., 1996; Fugère et al., 1996). Les éléocytes ont des fonctions nutritives et contiennent de nombreux granules sphériques, les chloragosomes. Ils ont la capacité de stocker du matériel endogène comme le glycogène, les lipides et des pigments (Roots et Johnston, 1966) comme la riboflavine (autofluorescence des cellules) (Koziol et al., 2006). Les éléocytes interviennent dans l'encapsulation, la formation de corps bruns (Valembois et al., 1992) et leurs sécrétions ont des propriétés antibactériennes (Ville et al., 1995; Milochau et al., 1997).



**Figure 8.** Photographie des 2 types cellulaires de cœlomocytes, amœbocytes et éléocytes, du ver de terre *E. fetida* au microscope optique (x400)

Les mécanismes de défense du système immunitaire des vers de terre contre les pathogènes sont la réponse humorale avec la sécrétion de lysines, agglutinines, opsonines et fétidines, et la réponse cellulaire réalisée par les cellules de types phagocytes. L'immunodéficience d'un organisme peut le rendre plus sensible à des contaminants environnementaux (Fournier et al.,

2000), d'où la nécessité d'évaluer différents biomarqueurs du système immunitaire pour évaluer les potentiels effets des contaminants.

Au cours de nos travaux, nous avons choisi d'évaluer la viabilité cellulaire, la phagocytose et les variations d'expression des ARNm de 2 gènes (fétidine et CCF) du système immunitaire du ver de terre.

### 3.3.2. Phagocytose

La phagocytose est un mécanisme d'endocytose qui internalisent les corps étrangers de 0,1 à 10  $\mu\text{m}$ . Elle est réalisée par les macrophages chez les mammifères ou par les cœlomocytes chez les vers de terre. Les particules étrangères sont reconnues par des récepteurs à la surface de la membrane du phagocyte, puis sont internalisées par des pseudopodes formant une vacuole intracellulaire (phagosome). Celui-ci fusionne ensuite avec un lysosome pour former un phagolysosome qui contient des enzymes lytiques pour détruire la particule étrangère et l'éliminer par exocytose ou sous forme de corps résiduel.

#### 3.3.2.1. Organismes terrestres : Approche toxicologique

La majorité des études qui évaluent les effets des NP sur la phagocytose sont réalisées sur des cellules de mammifères. En effet, les particules fines et ultra-fines de dioxyde de titane et de noir de carbone induisent indirectement une diminution de la phagocytose des macrophages avec un effet plus important pour les particules ultra-fines (Renwick et al., 2001). Les nanotubes de carbone simple feuillet (SWNT) diminueraient de manière plus importante la phagocytose des macrophages que d'autres nanoparticules de carbone comme les nanotubes de carbone à double feuillets (DWNT) et les fullerènes (Jia et al., 2005). Une étude montre que les NP d'argent (50 nm, 80 nm et 120 nm) diminuent la phagocytose des macrophages à 25  $\mu\text{g/ml}$  après 24 heures d'exposition alors que des NP d'oxyde d'argent (30 nm, 40 nm) ne modifient pas la phagocytose des macrophages dans les mêmes conditions (Wagner et al., 2007). Ces observations montrent que des nanoparticules composées de carbone ou d'un même élément métallique peuvent avoir des effets différents sur la phagocytose du fait des différentes propriétés de surface qu'elles possèdent.

#### 3.3.2.2. Organismes terrestres : Approche environnementale

La phagocytose est un mécanisme de défense cellulaire de la réponse immunitaire qui a été beaucoup étudiée chez les vers de terre. En effet, la phagocytose des cœlomocytes des vers de terre est considéré comme un des biomarqueurs du système immunitaire le plus fiable,

sensible et rentable (Eyambe et al., 1991; Goven et al., 2005). Les cœlomocytes qui reconnaissent et éliminent les éléments étrangers par phagocytose sont principalement les amœbocytes hyalines (Bilej et al., 1990; Cossarizza et al., 1996). La phagocytose des cœlomocytes a déjà été étudiée en utilisant des bactéries, des cellules de levures, des érythrocytes, ou des billes fluorescentes (Bilej et al., 1990; Eyambe et al., 1991; Dales et Kalaç, 1992; Burch et al., 1999).

La phagocytose des cellules immunitaires du ver de terre est principalement étudiée au cytomètre de flux en utilisant des billes fluorescentes (Fugère et al., 1996; Brousseau et al., 1997; Brousseau et al., 1999; Sauvé et al., 2002; Hendawi et al., 2004; Sauvé et Fournier, 2005). Il existe différentes expressions de la phagocytose comme l'indice de phagocytose (Fugère et al., 1996; Brousseau et al., 1997; Brousseau et al., 1999), le pourcentage de réponse normale (Hendawi et al., 2004), le pourcentage de cellules ayant phagocytés au moins 1 billes ou au moins 3 billes (Brousseau et al., 1999; Sauvé et al., 2002; Sauvé et Fournier, 2005) ou le nombre de billes phagocytées par les cellules (Massicotte et al., 2004).

Les effets des NP sur la phagocytose des vers de terre et les invertébrés sont encore peu connus. Une étude a montré que les quantum dots de tellurure de cadmium (CdTe) diminuaient la phagocytose des hémocytes de moules à partir de 1.6 mg/l après 24 heures d'exposition (Gagné et al., 2008). La majorité des études sur les invertébrés terrestres concerne les effets *in vitro* des métaux sur l'activité phagocytaire des cœlomocytes de ver de terre (Fugère et al., 1996; Brousseau et al., 1997; Sauvé et al., 2002). Une diminution significative de la phagocytose des cœlomocytes de *L. terrestris* a été observée à partir de  $10^{-7}$  M de méthylmercure ou de chlorure de cadmium ou de chlorure de zinc après 18 heures d'exposition *in vitro* (Fugère et al., 1996). L'exposition des cœlomocytes d'*E. fetida* au chlorure de méthylmercure pendant 18 h entraînent une diminution d'environ 50% à  $10^{-6}$  M (Hendawi et al., 2004). Ces résultats sont confirmés par Sauvé et al. (2002) qui montre que le mercure apparaît comme le métal le plus toxique avec une  $CE_{50}$  (inhibition phagocytose) comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M. Le chlorure de cadmium et le chlorure de cuivre diminuent la phagocytose des cœlomocytes aux concentrations respectives de  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M sur les différentes espèces *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea turgida* et *Tubifex tubifex* (Sauvé et al., 2002). La phagocytose des cœlomocytes des vers juvéniles et adultes *E. andrei* diminue à partir de  $10^{-7}$  M de méthylmercure après 18 heures d'exposition *in vitro* (Sauvé et Fournier, 2005). Ces auteurs montrent que dans des conditions *in vivo*, l'activité phagocytaire des cœlomocytes des vers juvéniles est diminuée à partir de  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  alors que celle des vers adultes est augmentée à 1 et  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (effet hormétique) après 5 jours

d'exposition. Les vers juvéniles semblent donc plus sensibles que les vers adultes dans des conditions d'exposition *in vivo* (Sauvé et Fournier, 2005).

La diminution de l'activité phagocytaire des cœlomocytes est considérée comme un indicateur des effets toxiques des contaminants environnementaux (Bilej et al., 1990; Dales et Kalaç, 1992). Quelques études ont montré que les PCB diminuent l'activité phagocytaire des cœlomocytes de *E. fetida* et *L. terrestris* (Fitzpatrick et al., 1992; Goven et al., 1994). Une étude sur les poussières de ciments montre qu'elles n'ont pas d'effet sur la phagocytose des cœlomocytes des vers *L. terrestris* après 7 jours d'exposition à des sols artificiels contaminés par ces poussières (Massicotte et al., 2004).

### 3.3.3. Expression des ARNm des gènes du système immunitaire des vers de terre: Fétidines et CCF

Le fluide cœlomique des vers de terre n'est pas aseptique et les vers doivent continuellement résister à la croissance bactérienne pour maintenir leur bon état de santé (Dales et Kalaç, 1992). Les cœlomocytes, cellules immunitaires des vers, participent au maintien de la santé de l'organisme par leur activité cytotoxique et la sécrétion de substances antimicrobiennes (Bilej et al., 2000). La production de fétidines et CCF par les cœlomocytes participe à la réponse immunitaire humorale.

Les fétidines sont deux glycoprotéines de 40 kDa et 45 kDa sécrétées par les éléocytes (Roch et al., 1981). Les séquences des acides aminés des 2 protéines diffèrent par la présence d'un élément carbohydrate de poids moléculaire différent (Lassegues et al., 1997; Valembois et al., 1997). Chaque organisme possède la protéine de 45 kDa (non polymorphique) et au moins deux isoformes de la protéine à 40 kDa. Ces protéines ont des propriétés hémolytiques (Roch, 1979), d'agglutination (Valembois et al., 1984), de coagulation (Valembois et al., 1988), d'opsonisation (Sinkora et al., 1993) et présentent également une activité peroxydase (Lassegues et al., 1997). Les fétidines ont une activité antibactérienne sur les bactéries Gram négative et Gram-positives. L'injection de bactéries pathogènes dans le cœlome du ver augmente la synthèse des fétidines et leur activité antibactérienne (Lassegues et al., 1989). Les bactéries non pathogènes n'ont pas d'effet sur les fétidines.

Le facteur cytolytique cœlomique (CCF) est une protéine de 42 kDa localisée dans les cellules chloragènes adjacentes au tube digestif et les chloragocytes libres (éléocytes) du fluide cœlomique d'*Eisenia fetida* (Bilej et al., 1995). Le CCF est une protéine de reconnaissance des motifs antigéniques associés aux pathogènes appelés pathogen-associated molecular

pattern (PAMPs) tel que : les lipopolysaccharides (LPS) et les glucanes de bactéries (Beschlin et al., 1998). La reconnaissance des composants de la paroi cellulaire des bactéries par le CCF, déclenche la cascade prophenoloxydase qui est un important mécanisme de défense immunitaire chez les invertébrés. La fixation du CCF sur les parois microbiennes active la protéase qui clive la prophenoloxydase inactive en phenoloxydase active. La phenoloxydase catalyse alors l'hydroxylation et l'oxydation de monophénols et de diphénols en quinone pour permettre la polymérisation de la mélanine (Fig.9). Ces réactions permettent la production de mélanine connues pour ses propriétés antibactériennes et cytotoxiques (Söderhäll et Cerenius, 1998).

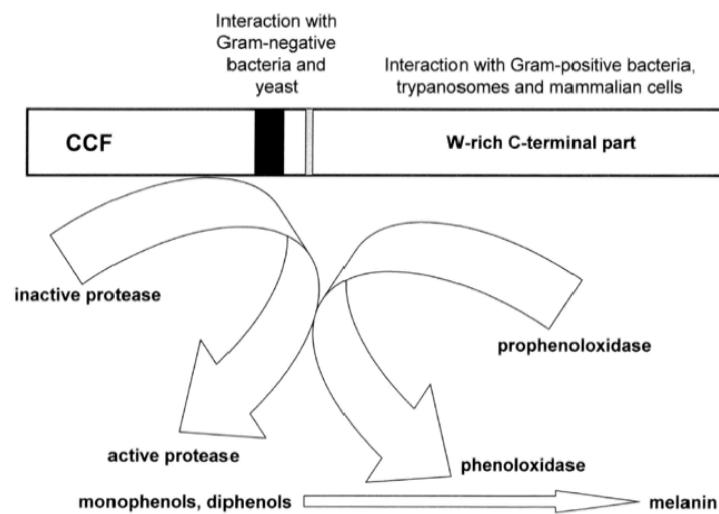


Figure 9. Rôle du CCF en tant que protéine de reconnaissance dans la réponse immunitaire du ver de terre (Bilej et al., 2010)

Le CCF d'*E. fetida* présente une grande spécificité contre les pathogènes grâce aux 2 sites de reconnaissance type lectine qu'il possède : le premier localisé au centre qui interagit avec les LPS (bactérie gram -) et 1,3 $\beta$ -D-glucanes (levures) et le second à l'extrémité C terminale riche en tryptophane, qui interagit avec N,N'-diacetylchitobiose (levures), muramyl dipeptide et acide muramique (bactérie gram +) (Bilej et al., 2001). Bien que le site central de reconnaissance des LPS et 1,3 $\beta$ -D-glucanes soit bien conservé entre les espèces, seule *E. fetida* est capable de reconnaître le N,N'-diacetylchitobiose sur le site C terminal comparé à d'autres espèces de vers de terre comme, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea icterica*, *Aporrectodea longa*, *Aporrectodea rosea*, *Dendrobaena veneta*, *Lumbricus rubellus* et *Lumbricus terrestris* (Silerová et al., 2006). Les auteurs expliquent la grande spécificité de reconnaissance d'*E. fetida* par le fait que cette espèce vit dans des milieux riches en matières

organiques contenant beaucoup plus de micro-organismes comparés aux autres espèces vivants dans des couches de sols inférieurs.

Une stimulation microbienne (bactérie gram +/- et levures) *in vivo* induit une augmentation du niveau d'expression des ARNm du CCF, mais n'a pas d'effet sur le niveau d'expression des ARNm des fétidines des cœlomocytes d'*E. fetida* dans les 24 heures suivant l'injection (Köhlerová et al., 2004). En effet, l'ajout d'*E. coli* dans un sol artificiel induit une augmentation de l'expression des ARNm du CCF, de l'activité de la SOD et de la lipoperoxydation après une exposition de 14 jours du ver *E. fetida* (Liu et al., 2009). Le CCF joue un rôle clé dans la protection des vers de terre contre les microorganismes.

Le CCF d'*E. fetida* présente beaucoup de similarités avec le facteur de nécrose tumorale (TNF), car il a des propriétés d'opsonisation (Bilej et al., 1995), il se lie au 1,3 $\beta$ -D-glucanes via des interactions de type lectines (Beschlin et al., 1998) et a des effets lytiques sur les trypanosomes, *Trypanosoma cruzi* (Olivares Fontt et al., 2002). En revanche, CCF et TNF n'ont aucune homologie dans les séquences de leurs gènes.

Une modification de l'expression de ces protéines, CCF et fétidines, par des polluants peut ainsi conduire à une altération de l'état de santé des organismes. A notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué l'effet d'un contaminant sur ces 2 protéines.

### 3.4. Traits d'histoire de vie (THV)

#### 3.4.1. Organismes aquatiques

La majorité des études sur les traits d'histoire de vie des organismes aquatiques sont réalisées sur les nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. Les 2 organismes principalement étudiés sont: les algues (Hund-Rink et Simon, 2006; Warheit et al., 2007a; Blaise et al., 2008; Velzeboer et al., 2008; Aruoja et al., 2009; Hartmann et al., 2010) et les daphnies (Warheit et al., 2007a; Heinlaan et al., 2008; Klaper et al., 2009; Wiench et al., 2009; Zhu et al., 2009; Kim et al., 2010) (Tab. VII). L'inhibition de la croissance est le principal paramètre mesuré chez les algues après 72 heures d'exposition. Les valeurs de CE<sub>50</sub> sont assez différentes et s'étendent de 5,8 à 241 mg/l (Aruoja et al., 2009; Hartmann et al., 2010). La présence d'agrégats de NP autour des cellules algales de *P. subcapitata* empêcherait l'accès de la lumière pour la photosynthèse ce qui diminuerait la croissance des algues (Aruoja et al., 2009). Les NP de TiO<sub>2</sub> sont connues pour leurs propriétés photocatalytiques, mais elles ne seraient pas les seules responsables de leur toxicité chez *P. subcapitata*. Les travaux de Hund-Rinke et Simon (2006) n'ont pas montré de



différences de toxicité entre des NP TiO<sub>2</sub> (25 nm) pré-exposées à la lumière (250 W, 30 min) ou non. Ces auteurs montrent également que les NP TiO<sub>2</sub> de petite taille (25 nm) ont un effet plus important sur la mobilité des daphnies, *Daphnia magna*, que les NP de plus grande taille (100 nm). Il a été également montré que des NP TiO<sub>2</sub> filtrées à 0,22 µm (30 nm) ont une toxicité plus forte que des NP TiO<sub>2</sub> traitées par sonication (agrégats 100-500 nm) sur *D. magna* (Lovern et Klaper, 2006). En effet, les concentrations létales des NP filtrées et soniquées sont respectivement de 5.5 mg/l et supérieure à 500 mg/l. Des résultats similaires ont été observés avec *Daphnia pulex* qui présente une mortalité supérieure à 40% et une augmentation significative de l'activité de la GST après 24 heures d'exposition à 500 mg/l de TiO<sub>2</sub> NP (Klaper et al., 2009). L'enrobage des NP TiO<sub>2</sub> semble également réduire la toxicité des NP puisque la CE<sub>50</sub> (48 h) est supérieure à 100 mg/l (Wiench et al., 2009) alors qu'elle est de l'ordre de 35 mg/l pour une NP de TiO<sub>2</sub> non enrobée (Zhu et al., 2009). La méthode de dispersion, l'enrobage, la taille et les propriétés catalytiques semblent jouer un rôle important dans la toxicité des NP. Une forte reprotoxicité des NP de TiO<sub>2</sub> (anatase) a été observée sur les descendants de *D. magna* après 21 jours (Zhu et al., 2010a). Ces auteurs montrent que les NP TiO<sub>2</sub> sont fortement bioaccumulées par les daphnies et qu'elles entraînent une diminution du taux d'ingestion et de filtration, responsable de la toxicité observée. La mobilité, le comportement alimentaire et le rythme cardiaque des daphnies, *D. magna*, peuvent être modifiés après seulement 1 heure d'exposition à des NP de carbone (260 µg/l), mais aucun effet n'a été observé avec des NP de TiO<sub>2</sub> à une concentration de 2 mg/l (Lovern et al., 2007). Une étude sur les cladocères, *C. dubia*, exposés au NP TiO<sub>2</sub> (anatase/rutile) montre qu'ils allouent préférentiellement leur énergie pour leur croissance au dépend de leur reproduction (Li et al., 2011b). Leur croissance diminue seulement à partir de 100 mg/l de NP TiO<sub>2</sub> alors que la CE<sub>50</sub> (48h) de leur reproduction est de 42 mg/l.

La toxicité des NP TiO<sub>2</sub> a été également étudiée dans les sédiments avec le ver marin, *Arenicola marina*. La contamination des sédiments aux NP TiO<sub>2</sub> (2 et 3 g/kg) inhibe rapidement le comportement alimentaire du ver, *A. marina*, (2 jours) et induit des effets cytotoxiques et génotoxiques après 10 jours d'exposition (Galloway et al., 2010). Ces auteurs préconisent une LOEC de 1 g/kg.

Les NP TiO<sub>2</sub> ont des effets létaux sur le poisson zèbre à des concentrations de l'ordre du mg/l avec une CL<sub>50</sub> (96h) de 124,5 mg/l (Xiong et al., 2011). Ces auteurs montrent que les NP TiO<sub>2</sub> modifient les activités du système antioxydant dans les branchies, foie et intestins des poissons. Les effets semblent plus importants en présence de lumière, du fait de la

photocatalyse des NP TiO<sub>2</sub>. Cette étude montre des effets à court terme sur des biomarqueurs biochimiques. Une exposition de 13 semaines à 0,1 et 1 mg/l suffit pour modifier la reproduction des poissons zèbre, *D. rerio*, avec une production totale d'œufs diminuée de 30% à 0,1 mg/l (Wang et al., 2011). Le nombre de femelles pondeuses diminuent drastiquement à partir de 9 semaines et la mortalité des embryons augmente dès 8 semaines d'exposition à 0.1 mg/l. Ces effets reprotoxiques pourraient être expliqués par le stress oxydant produit par les NP bioaccumulées dans les ovaires. Cette étude souligne l'importance d'étudier à long terme la toxicité des NP TiO<sub>2</sub>. De plus, une étude a montré la possibilité de transfert de NP TiO<sub>2</sub> via la chaîne trophique entre des daphnies, *D. magna*, et les poissons, *D. rerio* (Zhu et al., 2010b).

**Tableau VII.** Effets des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> sur les traits d'histoire de vie des organismes aquatiques

Nanoparticules (NP)	Exposition	Concentration	Temps	Organismes/ Cellules	Effets	Références
NP TiO <sub>2</sub> (25-70 nm)	<i>in vivo</i>	5 à 100 mg/l	72 heures	Algue, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE <sub>50</sub> (72h- inhibition croissance) = 5,83 mg/l NOEC (72h- inhibition croissance) = 0,98 mg/l Présence agrégats de TiO <sub>2</sub> => diminution lumière disponible => diminution photosynthèse => diminution croissance des cellules algales	Aruoja et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> P-25 NP TiO <sub>2</sub> UV100 NP TiO <sub>2</sub> LW-S <sup>1</sup>	<i>in vivo</i>	10 mg/l	72 heures	Algue, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	P-25: CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) = 71,1 mg/l UV100 : CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) = 241 mg/l LW-S : CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) = 145 mg/l	Hartmann et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> (anatase/rutile)	<i>in vivo</i>	0,01 à 100 mg/l	72 heures	Algue, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) = 21,1 mg/l	Warheit et al. (2007a)
			48 heures	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> (immobilisation) >100 mg/l	
		0,1 à 100 mg/l	96 heures	Truite ( <i>Onchorhynchus mykiss</i> )	CE <sub>50</sub> (immobilisation) >100 mg/l	
NP TiO <sub>2</sub> (majorité anatase, 25 nm) NP TiO <sub>2</sub> (anatase, 100 nm)	<i>in vivo</i>	3,15 à 50 mg/l	72 heures	Algue, <i>Desmodesmus subspicatus</i>	TiO <sub>2</sub> (25 nm) : CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) = 44 mg/l TiO <sub>2</sub> (100 nm) : CE <sub>50</sub> (inhibition croissance) > 50 mg/l Irradiation préliminaire: pas d'effets sur la toxicité des NP (25 nm)	Hund-Rinke et Simon (2006)
		1 à 3 mg/l	48 heures	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	Toxicité des NP TiO <sub>2</sub> (25 nm) > NP TiO <sub>2</sub> (100 nm) Toxicité des NP avec irradiation préliminaire semble > à la toxicité des NP non irradiées	
NP TiO <sub>2</sub> sonication (100- 500 nm) NP TiO <sub>2</sub> filtrée (30 nm)	<i>in vivo</i>	500 mg/l	48 heures	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	NP sonication: CL <sub>50</sub> >500 mg/l NP filtrées à 0,22 µm : CL <sub>50</sub> = 5,5 mg/l	Lovern et Klaper (2006)
NP TiO <sub>2</sub> (30 nm)	<i>in vivo</i>	2 mg/l	1 heure	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	Pas d'effets sur la mobilité ni le comportement alimentaire, légère diminution non significative du rythme cardiaque	Lovern et al. (2007)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (≤ 20 nm)	<i>in vivo</i>	0,5 à 500 mg/l	48 heures	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	Toxicité est dose dépendante CE <sub>50</sub> (immobilisation) : 35,3 mg/l      CL <sub>50</sub> : 143,4 mg/l	Zhu et al. (2009)

<sup>1</sup> NP TiO<sub>2</sub> P-25, (anatase/rutile/ amorphe, 30nm); NP TiO<sub>2</sub> UV100 (anatase,<10 nm); NP TiO<sub>2</sub> LW-S (anatase, 300 nm)

Nanoparticules (NP)	Exposition	Concentration	Temps	Organismes/ Cellules	Effets	Références
NP TiO <sub>2</sub> anatase (21 nm)	<i>in vivo</i>	0,1 à 100 mg/l	72 heures 21 jours	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	CL <sub>50</sub> (72h) = 1,62 mg/l CE <sub>50</sub> (72h- immobilisation) = 2,02 mg/l CL <sub>50</sub> (21J, descendants) = 2,62 mg/l CE <sub>50</sub> (21J, reproduction) = 2,62 mg/l Forte bioaccumulation des NP TiO <sub>2</sub> Diminution du taux de filtration et d'ingestion	Zhu et al. (2010a)
NP TiO <sub>2</sub> (25-70 nm)	<i>in vivo</i>	0 à 20 g/l	48 heures	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	20 g/l : 60% de mortalité	Heinlaan et al. (2008)
			72 heures	Crevette primitive, <i>Thamnocephalus platyurus</i>	Pas d'effets toxiques pour des concentrations < à 20 g/l	
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (≤ 40 nm)	<i>in vivo</i>	1, 2, 5 et 10 mg/l	48 heures et 21 jours	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	48 heures: Augmentation des activités enzymatiques antioxydantes (CAT; GPX et GST) 21 jours: Mortalité > à 50 % à 5 et 10 mg/l mais aucun effet sur reproduction	Kim et al. (2010)
NP TiO <sub>2</sub> enrobées <sup>2</sup> (T-lite™ SF-S)	<i>in vivo</i>	0,01 à 100 mg/l	48 heures et 21 jours	Daphnie, <i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> (48h- immobilisation) > à 100 mg/l 21 jours: NOEC (mortalité)= 30 mg/l, LOEC (mortalité)= 100 mg/l NOEC (reproduction)= 3 mg/l, LOEC (reproduction)= 10 mg/l	Wiench et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (< 25 nm)	<i>in vivo</i>	0,5 à 500 mg/l	24 heures	Daphnie, <i>Daphnia pulex</i>	Mortalité > à 40% à 500 mg/l Augmentation des activités des enzymatiques antioxydantes (CAT à partir 7.5 mg/l et GST à 500 mg/l)	Klaper et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (P-25, 34 nm)	<i>in vivo</i>	5 à 100 mg/l	48 heures	Cladocère, <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Diminution de la croissance à 100 mg/l CE <sub>50</sub> (reproduction) = 42 mg/l	Li et al. (2011b)
NP TiO <sub>2</sub> anatase	<i>in vivo</i>	0,1 et 1mg/l	13 semaines	Poisson zèbre, <i>Danio rerio</i>	Diminution du nombre de femelles pondeuses, de la production d'œufs et de la survie des embryons Bioaccumulation de nTiO <sub>2</sub> dans les ovaires	Wang et al. (2011)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (30 nm)	<i>in vivo</i>	50 mg/l	96 heures	Poisson zèbre	CL <sub>50</sub> (96h) = 124,5 mg/l	Xiong et al. (2011)
NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (23,2 nm)	Sédiment naturel	1 - 3 g/kg	10 jours	Ver arenicole, <i>Arenicola marina</i>	Diminution du taux d'alimentation des vers à 2 g/kg à partir de 2 jours Dommages cellulaires et à l'ADN à partir de 2 et 3 g/kg à 10 jours LOEC: 1 g/kg	Galloway et al. (2010)

<sup>2</sup> T-lite™ SF-S: NP TiO<sub>2</sub> (rutile; 50 nm x10 nm, LxD) enrobée d'une couche d'hydroxyde d'aluminium et d'une couche silice hydraté et de diméthicone/ copolymère méthicone

### 3.4.2. Organismes terrestres : Approche environnementale

L'impact des nanoparticules organiques ou métalliques sur certains traits d'histoire de vie des invertébrés terrestres a déjà fait l'objet de quelques travaux (Tab.VIII). Le cloporte *Porcellio scaber*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et quelques espèces de vers sont les 3 seuls taxa d'invertébrés terrestres étudiés.

La toxicité des NP de carbone a été étudiée sur *Eisenia veneta* et *L. rubellus*. Une exposition d'*E. veneta* à de la nourriture contaminée aux DWNT ou au C60 pendant 28 jours altère leur reproduction avec une production de cocons diminuée de 60% et 78% à 495 mg DWNT/kg et 1000 mg C60/kg, respectivement (Scott-Fordsmand et al., 2008). En revanche, aucun effet sur l'éclosion, la biomasse et la survie n'a été observé pour des concentrations inférieures à 500 mg/kg. La survie et la croissance du ver *L. rubellus*, ne sont pas affectées après une exposition de 28 jours à des sols contaminés à 15.4 et 154 mg de NP C60/kg (van der Ploeg et al., 2011). Seuls les vers exposés à 154 mg de NP C60/kg ont une production de cocons diminuée. Une forte mortalité et une diminution du taux de croissance des juvéniles sont mesurés à 154 mg C60/kg et à 15,4 mg C60/kg, respectivement. La production de cocons est considérée comme un paramètre sensible des contaminations aux NP de carbone (C60) (Scott-Fordsmand et al., 2008; van der Ploeg et al., 2011).

La toxicité des ions  $Ag^+$  ( $AgNO_3$ ) est généralement évaluée en parallèle de la celle des NP Ag. Aucun effet sur la survie et la croissance du ver *E. fetida* exposé 28 jours à 2 types de sols (ART et YST) contaminés à des concentrations comprises entre 10 et 1000 mg de NP d'Ag (10 nm et 30-50 nm) /kg ou à 10 et 100 mg d' $AgNO_3$ /kg, respectivement (Shoultz-Wilson et al., 2011), n'a été observé. En revanche, dans les sols de marne sableuse (YST) contaminés à 10 mg  $AgNO_3$ /kg, une diminution de la croissance des vers adultes, du taux d'éclosion et du nombre de juvéniles est observée. Dans les sols artificiels (ART) contaminés, une diminution significative de la production de cocons est constatée chez les vers exposés à 100 mg  $AgNO_3$ /kg et à 1000 mg NP d'Ag (10 nm et 30-50 nm)/kg avec une diminution plus marquée chez les vers exposés à l' $AgNO_3$ . Aucun effet n'est observé sur le taux d'éclosion des cocons. Cette étude montre que la biodisponibilité et les propriétés toxiques des particules diffèrent selon le type de sol (Shoultz-Wilson et al., 2011). La survie et la croissance du nématode, *C. elegans*, ne sont pas modifiées par les NP d'Ag et les ions  $Ag^+$  à des concentrations inférieures à 0,5 mg/l après 24 heures d'exposition (Roh et al., 2009). En revanche, la

reproduction des nématodes est diminuée à partir de 0,05 mg/l et 0,1 mg/l pour les NP d'Ag et les ions  $\text{Ag}^+$ , respectivement.

Les NP d'or (Au) peuvent affecter la reproduction des vers, *E. fetida*, en diminuant significativement le nombre de juvéniles produits dans des sols artificiel contaminés à 25 mg  $\text{HAuCl}_4/\text{kg}$ , à 20 mg/kg et 50 mg/kg pour les NP Au de 55 nm et 20 nm, respectivement, après 56 jours d'exposition (Unrine et al., 2010a).

Les NP ZnO induisent des effets létaux dose dépendants sur le ver de terre *E. fetida* exposé pendant 96h dans du milieu agar contaminé aux NP ZnO avec une  $\text{CL}_{50}$  comprise entre 232 et 374 mg/kg (Li et al., 2011a). Ces auteurs montrent qu'en milieu agar la toxicité augmente avec la concentration en NP alors que sur les tests papier filtre (milieu liquide), la toxicité diminue avec la concentration en nanoparticules de ZnO. Ils supposent également que les acides humiques seraient responsables de la dispersion et de la dissolution des NP de ZnO en ions  $\text{Zn}^{2+}$  ce qui augmenterait les effets toxiques observées en milieu liquide. Après 21 jours d'exposition à des sols contaminés aux NP ZnO ou aux ions  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ), bien que les vers *E. veneta* soient vivants, leur production de cocons est beaucoup plus faible chez les vers exposés aux ions  $\text{Zn}^{2+}$  que ceux exposés aux NP de ZnO à partir de 750 mg/kg (Hooper et al., 2011). Cette étude montre que les ions  $\text{Zn}^{2+}$  ont des effets plus prononcés sur la production de cocons que les NP de ZnO aux mêmes concentrations et pour des teneurs en Zn quasi similaires dans les tissus.

Cette différence de toxicité entre ions et NP est retrouvée avec le cuivre. Le  $\text{CuSO}_4$  induit plus fortement le système de détoxification que les NP CuO sur le ver *E. fetida* (Unrine et al., 2010b). Ces auteurs montrent également que les NP CuO n'ont pas d'effet sur la survie, croissance et reproduction du ver à des concentrations inférieures à 65 mg/kg.

Les études sur cloportes, *Porcellio scaber*, montrent que la contamination de leur nourriture (feuilles) aux NP  $\text{TiO}_2$  (15 nm) n'a pas d'effet sur leur survie, biomasse, et comportement alimentaire après 3 jours d'exposition à des concentrations inférieures à 3000  $\mu\text{g/g}$  (Jemec et al., 2008). Les NP de  $\text{TiO}_2$  peuvent également avoir des effets létaux et altérer la reproduction du nématode, *Caenorhabditis elegans*. En effet, une exposition de 24 heures à 80 mg/l de NP  $\text{TiO}_2$  (50 nm) suffit pour induire une mortalité de l'ordre de 50% (Wang et al., 2009). En plus des effets létaux, les NP de  $\text{TiO}_2$  diminuent fortement la croissance et la reproduction de *C. elegans* dès 47,9 mg/l (5 jours). Cette étude montre également que les NP  $\text{TiO}_2$  (50 nm) ont une toxicité plus forte que les particules de  $\text{TiO}_2$  de plus grande taille (285 nm) avec une  $\text{CL}_{50}$

(24h) évaluée à 136 mg/l et des effets reprotoxiques qui apparaissent à partir de 96 mg/l. Ces observations sont confirmées par Roh et al. (2010) qui montrent que les petites NP TiO<sub>2</sub> (7 nm) semblent plus toxiques sur *C. elegans* que les plus grandes (20 nm). Ces auteurs constatent une diminution de la survie (environ 20-30% par rapport au témoin), de la croissance (env. 9% par rapport au témoin), de la production d'œufs par ver (env. 21% par rapport au témoin). Ces modifications physiologiques semblent être liées à l'augmentation de l'expression du gène *cyp35a2* impliqué dans la détoxification après seulement 24 heures d'exposition à 1 mg/l de NP TiO<sub>2</sub> (7 nm).

**Tableau VIII.** Effets des nanomatériaux sur les traits d'histoire de vie des invertébrés terrestres

Nanoparticules (NP)	Milieu	Concentration	Temps	Organismes	Effets	Références
Nanotube de carbone (DWNT, DxL 10-30 nm x 5-15 µm)	Nourriture (crottin)	50 à 495 mg/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia veneta</i>	Pas d'effet sur la survie et la croissance Diminution de la production de cocons à 495 mg/kg CE <sub>50</sub> (reproduction) = 176 mg/kg	Scott-Fordsmand et al. (2008)
Nanotube de carbone (C60, 11 nm)		1000 mg/kg			Pas d'effet sur la survie et la croissance Diminution de la production de cocons	
C60	Sol	15,4 - 154 mg/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Lumbricus rubellus</i>	15.4 mg/kg: Diminution de la croissance des juvéniles 154 mg/kg: Diminution de la production de cocons et mortalité des juvéniles (env. 40%)	van der Ploeg et al. (2011)
NP Ag (10 nm, 30-50 nm)	Sol artificiel ISO (ART)	100, 1000 mg Ag/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	800 mg/kg (NP Ag 10 nm) 773 mg/kg (NP Ag 30-50 nm) =>Diminution de la production de cocons	Shoultz-Wilson et al. (2011)
	Sol naturel (YSL)	10 mg Ag/kg			NP Ag: Pas d'effet sur la survie et reproduction AgNO <sub>3</sub> : Diminution de la croissance, du taux d'éclosion et du nombre de juvéniles	
NP Ag (<100 nm)	Milieu liquide (0.032 M KCl, 0.051 M NaCl)	0,05- 0,1- 0,5 mg/l	72 heures	Nématode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	Pas d'effet sur la survie et la croissance Diminution de la reproduction à partir de 0,1 mg/l	Roh et al. (2009)
NP Au (55, 20 nm)	Sol artificiel ISO	65 mg/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	Pas d'effet sur la survie, reproduction et la croissance	Unrine et al. (2010a)
NP ZnO (<200nm)	Sol sable/glaise	100 à 6400 mg Zn/kg	28 jours	Collemboule, <i>Folsomia candida</i>	Pas d'effet sur la survie CE <sub>50</sub> (28 jours, reproduction)=1964 mg/kg	Kool et al. (2011)
NP ZnO (30 nm)	Milieu liquide	50 à 1000 mg/l	96 heures	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	A partir 500 mg/l: Mortalité plus forte en présence d'acide humique dans le milieu	Li et al. (2011a)
	Milieu agar	50 à 1000 mg/kg			CL <sub>50</sub> = 232 mg/kg (suspension NP préparée dans eau) CL <sub>50</sub> =374 mg/kg (suspension NP préparée dans eau reconstituée)	



Nanoparticules (NP)	Milieu	Concentration	Temps	Organismes	Effets	Références
NP ZnO (<100nm)	Nourriture (crottin)	250 et 750 mg/kg	21 jours	Ver de terre, <i>Eisenia veneta</i>	Pas d'effet sur la survie, biomasse 750 mg/kg: Faible diminution de la production de cocons	Hooper et al. (2011)
	Liquide (eau)	6 à 96 mg/l	24 heures		CL <sub>50</sub> nominale= 54,42 mg/l CL <sub>50</sub> mesurée= 1,75 mg/l	
NP Cu	Sol artificiel ISO	65 mg/kg	28 jours	Ver de terre, <i>Eisenia fetida</i>	Pas d'effet sur la survie, croissance et reproduction	Unrine et al. (2010b)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (15 nm)	Nourriture (feuille)	0,1 à 3000 µg/g nourriture	3 jours	Cloporte, <i>Porcellio scaber</i>	Pas d'effet sur la survie, biomasse, le taux d'alimentation et l'efficacité d'assimilation	Jemec et al. (2008)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (<25 nm) NP TiO <sub>2</sub> anatase/rutile (<75 nm)	Nourriture (feuille)	10 - 100 - 1000 µg/g nourriture	3 et 14 jours	Cloporte, <i>Porcellio scaber</i>	3 jours: Pas d'effet sur la mortalité, la biomasse et le comportement alimentaire 14 jours: Augmentation de l'efficacité d'assimilation de la nourriture, du taux d'alimentation	Drobne et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (50 nm)	Milieu liquide (eau ultrapure)	24 à 239,6 mg/l	5 jours	Nématode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	CL <sub>50</sub> (24h): 80 mg/l 5 jours à 47,9 ; 95,9 et 167,8 mg/l: Diminution de la croissance, production d'œufs et du nombre de descendants/ver	Wang et al. (2009)
NP TiO <sub>2</sub> anatase (7 et 20 nm)	Milieu liquide (0,032 M KCl, 0,051 M NaCl)	1 mg/l	24 heures	Nématode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	NP TiO <sub>2</sub> (7 nm): Diminution de la survie, de la croissance et de la survie	Roh et al. (2010)
NP CeO <sub>2</sub> (15 et 45 nm)					NP CeO <sub>2</sub> (15 nm): Diminution de la survie	

## 4. Bilan

Ce premier chapitre montre que le développement et la commercialisation des nanomatériaux dans des produits manufacturés sont en pleine croissance. L'utilisation de ces nanomatériaux entraîne leur relargage dans l'environnement sous forme de nanoparticules et/ou de sous produits d'altération. Parmi ces nanomatériaux, les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  font partie des nanoparticules les plus utilisées du fait de leurs propriétés photocatalytiques et d'absorption des UV. Cependant, le comportement et la toxicité de ces nanomatériaux dans l'environnement sont encore peu connus.

- Le comportement des nanoparticules est gouverné par les forces stériques, électrostatiques et de van der Waals des particules. Ces forces peuvent être modifiées par différentes propriétés physico-chimiques tels que : la force ionique, le pH, la matière organique dissoute.
- Bien que les résultats soient parfois contradictoires selon les protocoles, les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sont connues pour augmenter la production d'ERO, et susceptibles d'engendrer des effets toxiques.
- La toxicité des nanoparticules est majoritairement étudiée en test *in vitro* sur des cellules humaines et mammifères (souris). Les effets des nanomatériaux sur l'environnement sont principalement réalisés sur des organismes aquatiques. Seules quelques études évaluent les effets de ces nanomatériaux sur les invertébrés terrestres.

Il existe donc à l'heure actuelle un réel manque de données en termes d'évaluation de l'écotoxicité potentielle des nanoparticules et de leur sous produits d'altérations. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette thèse qui porte sur l'écotoxicité des nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  sur les invertébrés terrestres (ex : ver de terre) par l'utilisation de biomarqueurs à différentes échelles biologiques.

# *Démarche Scientifique*

Les nanoparticules de dioxyde de titane sont utilisées dans un grand nombre de produits manufacturés, du fait de leurs propriétés photo catalytiques et d'absorption des ultra-violets. La production et l'utilisation de ces nanomatériaux induisent le déversement de ces nanoparticules et de leurs sous-produits d'altération dans l'environnement (Wiesner et al., 2006). Quelques études ont déjà estimé par modélisation les quantités de TiO<sub>2</sub> nanométriques dans différents compartiments comme l'eau, le sol et les effluents de boues de stations d'épurations (Mueller et Nowack, 2008; Gottschalk et al., 2009; Johnson et al., 2011). La concentration prédite dans l'environnement pour les nano TiO<sub>2</sub> a été estimée à 0.7-16 µg/l et 0.4 - 4.8 µg/kg dans l'eau et le sol, respectivement (Mueller et Nowack, 2008). Les nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> déversés dans l'environnement peuvent avoir des conséquences sur l'état de santé des organismes des écosystèmes aquatiques et terrestres. Néanmoins, l'écotoxicité de ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> en milieu terrestre est encore très peu étudiée (Jemec et al., 2008; Drobne et al., 2009; Hu et al., 2010; Lapied et al., 2011).

Dans le cadre de cette thèse, l'écotoxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et des sous produits d'altération de TiO<sub>2</sub> a été déterminée en évaluant leur biodisponibilité et en utilisant une batterie de biomarqueurs à différentes échelles biologiques.

Une première partie de ces travaux aborde les effets des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> par une approche *in vitro*. La stabilité colloïdale et la taille des nanoparticules dans le milieu d'expérimentation ont été étudiées en collaboration avec le LEM. La localisation intracellulaire des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans les cœlomocytes a été réalisée par une technique de microscopie électronique. Les réponses moléculaires et cellulaires aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont été mesurées sur le système immunitaire et antioxydant des cœlomocytes du ver, *E. fetida*.

La seconde partie consiste à étudier les effets biologiques des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> en milieu liquide sur le ver de terre. La toxicité potentielle de ces particules en milieu artificiel a été évaluée en utilisant une batterie de biomarqueurs allant de l'échelle moléculaire à l'individu. Cette étude présente également des résultats d'apoptose réalisée en collaboration avec le laboratoire Bioforsk de Norvège. Le comportement des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> a été suivi dans le milieu d'exposition en collaboration avec le CEREGE ainsi que pour la localisation du titane par micro-spectroscopie de fluorescence X.

La dernière partie concerne l'impact écotoxicologique des deux particules de TiO<sub>2</sub> étudiées dans des conditions environnementales plus réalistes, en exposant les vers à des sols artificiels contaminés aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ou aux sous-produits d'altérations de TiO<sub>2</sub>. La reproduction et les variations d'expression de gènes de détoxification, du système immunitaire et antioxydant ont été étudiées pour évaluer la toxicité potentielle des particules. La biodisponibilité a été évaluée en mesurant les teneurs en métaux dans les organismes exposés et dans les sols contaminés ou non, en attendant une caractérisation plus fine de la mobilité des particules dans les sols.

# *Matériels & Méthodes*

# 1. Caractérisation des nanoparticules et sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub>

## 1.1. Présentation des nanomatériaux

### 1.1.1. Sous produits d'altération (SPA) de dioxyde de titane

Le nanomatériau étudié est un nanocomposé à base de TiO<sub>2</sub> rutile (T-lite™ SF, BASF, Germany) utilisé dans la formulation des crèmes solaires (Fig.10). Il est composé d'un cœur de nano-cristallites de TiO<sub>2</sub> (14-16 nm), enrobés d'une couche minérale d'Al(OH)<sub>3</sub> dont le rôle est d'inhiber la photoactivation du TiO<sub>2</sub> sous exposition aux UV, et d'une couche de polydiméthylsiloxane (diméthicone), qui est un agent lipophile destiné à favoriser la dispersion du nanocomposé dans la phase huile de la crème (Fig.10,11).

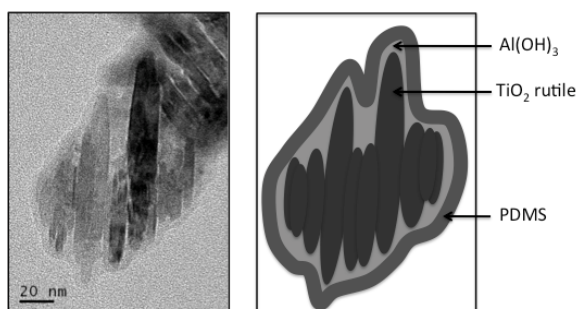


Figure 10. Photographie au MET et schéma du nanocomposé de TiO<sub>2</sub> non altéré (Labille et al., 2010)

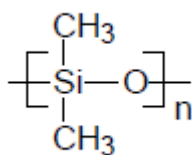


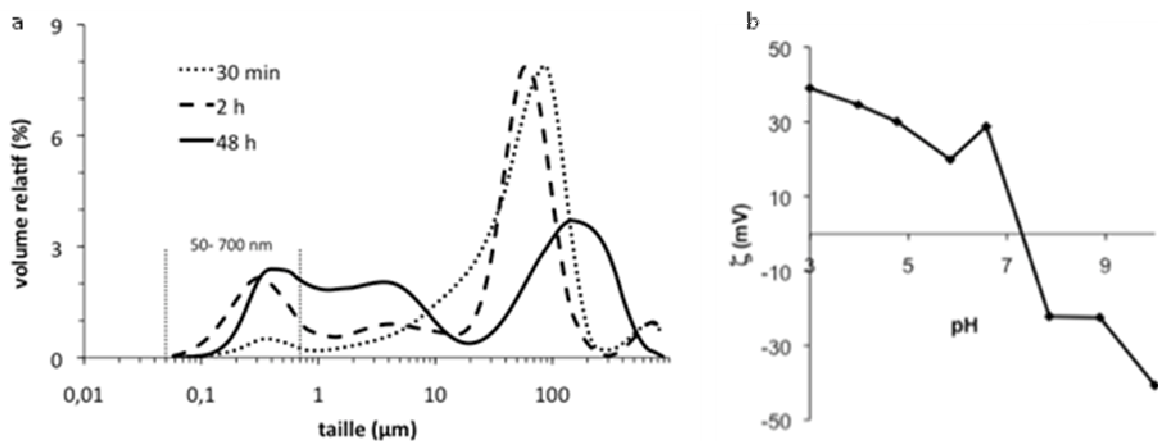
Figure 11. Formule du diméthicone, nom commercial du polydiméthylsiloxane (PDMS)

Le processus de vieillissement du nanocomposé a été simulé en laboratoire au CEREGE, en reproduisant des conditions physicochimiques représentatives de l'environnement de destination.

Pour réaliser l'altération, 100 mg de poudre commerciale ont été introduits dans 250 ml d'eau ultrapure contenus dans un bécher d'1 litre. L'altération a été simulée par agitation magnétique à 690 rpm pendant 48 heures. Cette forte agitation est nécessaire en raison de la forte hydrophobie du PDMS, afin de garantir un contact maximum entre les particules et

l'eau. Une lampe reproduisant le spectre solaire a été utilisée (400W Philips® 114 Master HPI-T Plus) pendant l'agitation.

Une décantation de 48 heures est réalisée pour permettre la séparation de la suspension en trois phases : une pellicule hydrophobe en surface, une phase grossière instable en suspension et une phase plus fine stable en suspension. Cette dernière phase correspond à la suspension de sous produits d'altération de dioxyde de titane (SPA  $\text{TiO}_2$ ) utilisée pour les tests d'écotoxicité. Le processus d'altération élimine la couche de PDMS des nanocomposés et produit une suspension stable de sous produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  (Auffan et al., 2010). La distribution en taille des SPA  $\text{TiO}_2$  mesurée par diffraction laser s'étale d'environ de 50 à 700 nm (Fig.12a) et le potentiel zêta de ces particules est autour de 7,5, caractéristique d'une surface d'hydroxyde d'aluminium (Fig.12b).



**Figure 12.** Distribution de taille du nanocomposé dispersé dans l'eau au cours du temps mesurée par diffraction laser (a) et potentiel zêta des SPA en fonction du pH (Labille et al., 2010)

### 1.1.2. Nanoparticules de dioxyde de titane (NP $\text{TiO}_2$ , P-25)

Les nanoparticules étudiées sont des nanoparticules de dioxyde de titane Aeroxide P-25 fournies par Evonik Degussa GmbH (Frankfurt, Germany). Il s'agit d'un mélange anatase : rutile (80 :20) avec une taille des particules primaires de 25 nm et une surface spécifique de  $50 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$ . La suspension de nanoparticules est préparée en pesant 100 mg de  $\text{TiO}_2$  dans 10 ml d'eau ultrapure. Après 30 min de sonication par sonde à  $4^\circ\text{C}$ , la suspension est stable (10 g/l) (Fig.13A) et conservée à l'obscurité. La suspension est principalement composée de petits agrégats de nanoparticules dont le diamètre hydrodynamique est compris entre 30 et 220 nm avec une taille moyenne de 78 nm (Fig.13B). La taille des particules primaires de



nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  en suspension dans l'eau ultra pure s'étend entre 20 et 80 nm avec une taille moyenne de 23,8 nm (Fig.13C).

Avant chaque utilisation, la suspension mère est sonicuée pendant 10 min dans un bain à ultra-son.

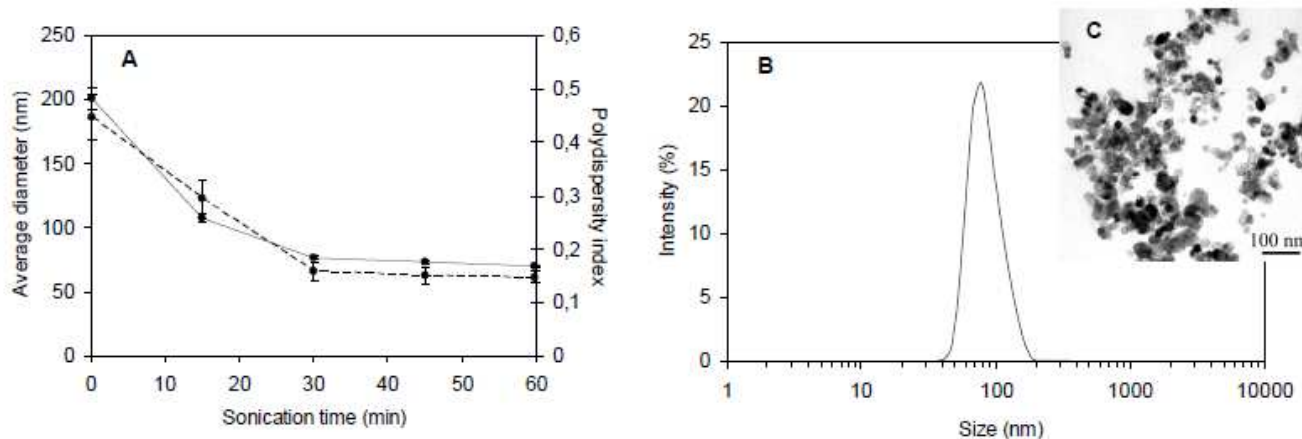


Figure 13. Caractérisation physique de la suspension mère de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (P-25; Degussa) en suspension dans de l'eau ultrapure. Diamètre hydrodynamique et indice de polydispersité des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  après différents temps de sonication, distribution de taille (B) et image par MET (C) des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  après 30 min de sonication (Pagnout et al.)

## 1.2. Techniques de caractérisations physico-chimiques

Les caractérisations des SPA  $\text{TiO}_2$  et des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  ont été réalisées dans le cadre de collaborations avec le CEREGE à Aix-en-Provence et le LEM à Vandœuvre-Lès-Nancy.

### 1.2.1. Granulométrie par diffraction laser

La granulométrie par diffraction laser (Mastersize S, banc Malvern) a été utilisée pour déterminer la taille des SPA  $\text{TiO}_2$ . Cette technique de mesures granulométriques en solution détermine le diamètre hydrodynamique des nanoparticules ou de leurs agrégats. Le principe consiste à éclairer les particules en suspension par un faisceau laser (He-Ne, 4 mW ;  $\lambda=663$  nm). La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de déterminer la taille des particules ou des agrégats. La matrice de détecteurs acquiert les intensités de lumière diffusée à une fréquence de 500 Hz (une mesure toutes les 2 ms). Les effets transitoires tels que la dissolution et l'agglomération peuvent également être surveillés.

La gamme de mesure de taille s'étend de 50 nm – 3 mm. La mesure est basée sur la théorie de la diffraction de Fraunhofer.

### 1.2.2. Turbidimètre

La turbidité a été également mesurée pour déterminer la stabilité colloïdale de la suspension en SPA TiO<sub>2</sub> en fonction de sa concentration. Elle est indicatrice de la concentration en SPA en suspension. En effet, plus la turbidité est élevée, plus la concentration en SPA en suspension est alors élevée. La turbidité du surnageant après 24 heures de décantation à l'obscurité est mesurée à l'aide d'un turbidimètre (Hach 2100 AN Turbidimeter).

### 1.2.3. Microscopie électronique à transmission (MET)

- Principe

La taille et la forme des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont été caractérisées en utilisant un microscope électronique à transmission (Philips CM 20, 200kV). Cette technique permet également de localiser les nanoparticules dans le milieu biologique. En effet, la résolution du MET est de l'ordre de 0.1 nm ce qui permet de visualiser les particules de taille nanométrique. Le principe du MET repose sur un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons qui est focalisé par un système de condenseur sur la préparation. Le faisceau traverse l'échantillon et les électrons sont plus ou moins absorbés. L'impact des électrons sur l'écran crée l'image par fluorescence. Pour que le faisceau d'électron puisse traverser l'échantillon biologique, une préparation est nécessaire pour que l'échantillon soit suffisamment fin (50-80 nm). Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> en suspension ont été observées directement au MET sans préparation spécifique.

- Préparation des échantillons biologiques

Les cellules de vers de terre, cœlomocytes, sont fixées au glutaraldéhyde 2.5% puis post-fixées au tetroxyde d'osmium (1%). Après un rinçage au tampon phosphate, les cellules sont incluses dans de l'agarose (Agar 2%). Les échantillons sont ensuite deshydratés par des bains successifs d'alcool (50°, 70°, 95°, 100° et oxyde de propylène). Les cellules sont ensuite imprégnées dans 3 bains différents du mélange oxyde de propylène et résine (EPON 812, Araldite 506, DDSA, Dibutyl phtalate, DMP 30) avec des proportions croissantes en résine. Les échantillons sont ensuite inclus dans de la résine pure à température ambiante pendant 6h. La polymérisation est réalisée en plaçant les blocs de résine à 38°C pendant 2 heures puis à

60°C pendant 2 jours. Une fois le bloc de résine consolidé, des coupes ultra-fines (70-90 nm) sont réalisées à l'aide d'un ultra microtome.

#### 1.2.4. Micro spectroscopie à fluorescence X ( $\mu$ -XRF)

La localisation du titane dans les vers a été réalisée en utilisant un microscope analytique aux rayons X (XGT<sup>7000</sup> commercialisé par Horiba-Jobin Yvon). Ce matériel nous a été mis à disposition dans le cadre de la collaboration avec le CEREGE sous l'encadrement de Perrine Chaurand, Jérôme Labille et Jérôme Rose.

- Principe

La source d'excitation du  $\mu$ -XRF est un rayonnement X « primaire » produit par un tube à rayons X équipé d'une anode en Rhodium (Rh). Lorsque l'échantillon est bombardé par des rayons X, il réémet de l'énergie sous la forme de photons : c'est le phénomène de fluorescence X. La composition élémentaire de l'échantillon peut être déduite en analysant le spectre de fluorescence X (nombre vs. énergie des photons émis) qu'il a émis. En effet, l'énergie des photons émis est caractéristique d'une transition électronique d'un atome donné (par ex. la transition électronique du niveau  $L_{(2,3)}$  vers le niveau K pour un atome de Ti s'accompagne de l'émission d'un photon d'énergie 4510 eV (raie d'émission  $K\alpha$  du Ti)).

Le microscope XGT<sup>7000</sup> est composé d'une optique performante qui permet d'obtenir un faisceau de rayons X focalisé sur un point de l'échantillon (focalisation du faisceau RX incident à 10 ou 100  $\mu$ m au choix) et très intense ( $10^8 - 10^9$  photons/s).

La résolution en énergie de son détecteur EDS (diode en Si), refroidi à l'azote liquide, est de 145eV pour la raie  $K\alpha$  du Mn. La limite de détection est de quelques pourcents massiques pour les éléments les plus légers (Na-Si) et elle peut atteindre 50-100 mg/kg pour les éléments de numéro atomique moyen (Ca-As). La limite de détection est également fonction de la nature chimique de la matrice sondée, La limite de détection du Ti a été mesurée dans deux matrices biologiques différentes (projet ANR Aging Nano & Troph). Elle est de 50 mg/kg dans une matrice composée d'algues et de 90 mg/kg dans une matrice composée de daphnies. On peut donc s'attendre à des limites de détection du Ti dans les vers du même ordre de grandeur (matrice proche au niveau chimique).

L'objectif de l'analyse est d'identifier la distribution spatiale du Ti dans les vers. Des cartes élémentaires sont donc enregistrées.

### 1.2.5. Analyse chimique en solution : ICP-AES

- Principe

Cette technique a été utilisée pour doser le titane et l'aluminium dans les tissus des vers exposés aux SPA et dans les sols contaminés. Après minéralisation, les échantillons ont été analysés en utilisant une torche à plasma ou ICP AES (ICP atomic emission spectrometry). La torche à plasma est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser plusieurs éléments simultanément. La technique consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon. Les atomes de l'échantillon à analyser sont transformés en ions par une flamme extrêmement chaude : 7300 K. L'échantillon pénètre généralement au centre du plasma, parallèlement au flux de gaz plasmagène. Les atomes sont ensuite injectés dans l'analyseur, puis détectés. La lumière émise par le plasma est analysée par un ou plusieurs monochromateurs, par un réseau polychromateur, ou encore une combinaison des deux. Les éléments ionisés émettent un rayonnement caractéristique dont on mesure l'intensité. Celle-ci est comparée à l'intensité émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue (gamme étalon). L'énergie émise par les photons lorsque les atomes excités (ionisés) retournent à leur état fondamental est caractéristique de chaque élément.

- Préparation des échantillons

Pour doser le titane et l'aluminium dans les tissus biologiques par ICP-AES, les vers sont minéralisés au Laboratoire Sols et Environnement<sup>3</sup> (LSE) à Nancy. Les vers sont séchés dans des tubes en verre pendant 24h dans une étuve à 40°C puis pesés. Un ajout d'acide nitrique 69% (2 ml) est réalisé sous hotte. Les tubes sont agités régulièrement pour dissoudre les tissus. Après 2 heures de réaction à température ambiante, les tubes sont placés dans une étuve à 80°C pendant 24 heures. Les tubes sont refroidis pendant 2 heures à température ambiante, puis le peroxyde d'hydrogène 30% (2 ml) est ajouté au minéralisat sous hotte. Après 2 heures de réaction, chaque minéralisat est filtré sur du papier filtre sans cendre. Les minéralisats sont ajustés à 10 ml avec de l'eau déminéralisée, puis envoyés à l'INRA d'Arras pour doser le titane et l'aluminium par ICP-AES.

---

<sup>3</sup> Réalisé en collaboration avec Catherine Sirguy

Les sols contaminés aux nanomatériaux et témoins sont séchés à température ambiante, tamisés à 2 mm puis envoyés à l'INRA d'Arras pour leurs mise en solution par fusion alcaline (NF ISO 14 862-2) et les dosages du titane et de l'aluminium (NF ISO 22036).

## 2. Modèle biologique

### 2.1. Milieu d'élevage

Les vers de terre utilisés dans les tests d'écotoxicité sont issus de l'élevage du laboratoire LIEBE. Leur milieu d'élevage est composé de tourbe et de crottin de cheval frais non contaminé (50/50, poids/poids) humidifié par de l'eau déminéralisée. Le pH du milieu est compris entre 5 et 7 et la teneur en eau est contrôlée chaque semaine. Les vers de terre sont nourris par du crottin de cheval séché et tamisé, exempt de toutes traces de pollution. La densité des vers dans les bacs d'élevage est contrôlée en isolant les cocons produits chaque mois. L'élevage est donc constitué de lots d'organismes de même tranche d'âge.

Avant chaque exposition, les vers de terre ont été dépurés pendant 48 heures. La dépuration consiste à vider le tube digestif des vers en les plaçant dans une boîte de pétri en plastique contenant un papier filtre humide. Le papier filtre est rincé 3 fois par jour pour éviter l'ingestion des fèces. Les vers ont été ensuite pesés et sélectionnés pour un poids compris entre 300 et 600 mg.

### 2.2. Protocoles d'extrusion des coelomocytes

#### 2.2.1. Technique par agent mucolytique

Cette technique nécessite que les vers de terre, *Eisenia fetida*, soient dépurés.

L'extrusion des coelomocytes des vers est réalisée par immersion des vers dans du milieu d'extrusion (LBSS 300 mosmol, 0.02% EDTA, 1% GGE). Une centrifugation de 10 minutes à 150 g est réalisée. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture (MEM 85%, SVF 10%, Hepès 1%, L glutamine 2 mM, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml, tétracycline 60 µg/ml, amphotéricine B 30 µg/ml). Un comptage cellulaire est réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez et la concentration cellulaire est ajustée à  $10^6$  cellules/ml par ajout de milieu de culture.

#### 2.2.2. Technique par choc électrique

Les vers de terre sont rincés avec du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS : pH 7,4) et sont délicatement massés au niveau de leur extrémité terminale pour éviter toute contamination fécale des coelomocytes. Les vers sont immergés dans 3 ml de tampon PBS. L'extrusion des

cœlomocytes est faite par 3 chocs électriques de 5 secondes à l'aide d'une pile électrique de 9 V. Une centrifugation de 10 minutes à 150 g est réalisée. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture. Un comptage cellulaire a été réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez et la concentration cellulaire est ajustée à  $10^6$  cellules/ml par ajout de milieu de culture.

### 3. Biomarqueurs et écotoxicité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>

L'écotoxicité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> a été étudiée en utilisant une batterie de biomarqueurs à différents niveaux de l'organisation biologique. Les biomarqueurs à l'échelle moléculaire et cellulaire sont connus pour leur sensibilité alors que ceux à des échelles plus élevées (ex : population, communauté...) sont reconnus pour avoir une meilleure pertinence écologique.

Dans le cadre de cette étude, les potentiels effets précoces des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> ont été évalués par l'expression des ARNm des gènes de détoxification et du système immunitaire, la viabilité cellulaire et la phagocytose. La survie et les effets sur la reproduction des vers ont été mesurés à l'échelle de l'individu.

#### 3.1. Echelle moléculaire : expression des ARNm des gènes de détoxification et du système immunitaire

##### 3.1.1. Principe de la RT-qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à chaque cycle et non à la fin de la PCR. Les étapes de la PCR en temps réelle sont identiques à celle de la PCR classique avec une dénaturation de la structure double brin de l'ADN, une hybridation des amorces et l'élongation. Chaque cycle est répété 40 fois et la qPCR se termine par une phase d'élongation finale. Un fluorophore (SybrGreen<sup>TM</sup>) se fixe sur l'ADN double brin, la fluorescence du SybrGreen fixé est très supérieure (environ 400 fois) à celle des molécules libres. Un seuil de fluorescence est établi par le programme du thermocycleur de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet au signal de dépasser ce seuil le nombre de cycles de PCR appelé "Ct" (Cycle Threshold) est obtenu. Le Ct correspond au début de la phase exponentielle du signal. Cette

valeur est utilisée pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative et pour déterminer l'efficacité E de la PCR.

### 3.1.2. Purification des ARN

Les tissus digestifs et les coelomocytes des vers ont été conservés dans une solution de GATC (4M) qui permet la conservation des ARN à -80°C.

La purification des ARN a été réalisée selon 2 techniques différentes : la purification sur colonne en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) et la procédure d'extraction phénol-chloroforme-guanidium thiocyanate.

La technique d'extraction des ARN utilise le chloroforme-phenol-guanidium thiocyanate, elle consiste à broyer les tissus ou les cellules dans 400 µl de Trizol (mélange v/v de phénol et de GATC). Après 5 min à température ambiante, 100 µl de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) sont ajoutés, puis la solution est homogénéisée par inversions. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 g, la phase aqueuse contenant les ARN est prélevée et 200 µl d'isopropanol sont ajoutés. Le mélange est placé au minimum 5 minutes dans la glace. Une centrifugation de 10 min à 13 000 g permet d'éliminer le surnageant. Le culot d'ARN est lavé avec 400 µl d'éthanol à 70-75%. Une centrifugation à 13 000 g pendant 5 min est effectuée pour éliminer l'éthanol. Le culot est ensuite séché pendant 15 min à 50°C puis dissout dans 50 µl d'eau ultrapure.

La qualité des ARN (absence de dégradation) est vérifiée par électrophorèse des ARN sur un gel d'agarose à 1.5%.

### 3.1.3. Retro-transcription

La transcription-inverse est effectuée sur 1 µg d'ARN totaux. Le kit Revert Aid MuLV RT (Fermentas Life Sciences) et le kit Maxime RT Premix Oligo dT (INtRON Biotechnology) ont été utilisés. Le kit Revert Aid MuLV RT nécessite une pré-incubation de 5 min à 70°C des ARN avec l'amorce oligodT, pour éliminer les structures secondaires des ARN et favoriser la fixation de l'amorce oligodT.

Une PCR est ensuite réalisée avec des amorces ubiquitine pour vérifier que la RT a bien fonctionné.



## 3.1.4. Choix des amorces

Les séquences codantes des gènes constitutifs (actine, ubiquitine), du système immunitaire (Fétidine et CCF) et des systèmes de détoxification (MT, SOD, CAT, GST) sont disponibles dans la banque de données GenBank. Les amorces de ces gènes ont été obtenues à partir de leur séquence codante en utilisant le logiciel Primer3 (Tab.I) Les amorces doivent mesurer entre 15 et 30 pb et leurs Tm ne doivent pas être différents de plus de 2°C l'un de l'autre. Les amorces sont synthétisées par Invitrogen (Carlsbad, USA).

**Tableau IX.** Séquences des amorces utilisées en qPCR

Gènes constitutifs	Actine	F100	CTTCCAGCAGATGTGGATC
		R100	GAGCATGTGTGTGGTGTCTCT
	Ubiquitine	F100	CACCCTTCACCTTGTGTT
		R100	GGAATTCCTTCCTTGTC
Système immunitaire	Fétidine	F200	CGGCTTCGCATAGTATTGGT
		R200	CAC CAA CGT CAG CAT TCA GT
	CCF	F100	TTTGGTGGTCTTGTGTCTGC
		R100	GCTTTCCATCTCGAACGAAG
Système de détoxification	Métallothionéine	F200	CTGCAAAAAGCTTTGCTGTG
		R100	TATTTCAATGCCTCGGCTCT
	SOD	F50	TGGATTTACGTGCATGAGT
		R200	GCCAAGATCGTCCACCAGCT
	Catalase	F200	TATGAATGGATACAGCAGTCACAC
		R50	GCAAACGTCATCACTTGGATGT
	GST	F100	GAAAAGCCGCGTACATTAAGA
		R250	TGTGAGGGGAGAGGATGTTC

### 3.1.5. Conditions d'amplifications en qPCR

La composition du mélange réactionnel est la suivante :

- 5 µl d'ADNc dilué au 1/40,
- 10 µl de Gotaq<sup>®</sup> qPCR Gotaq Master Mix (Promega)
- 5 µl d'amorces de concentrations finales comprises entre 400 nM et 700 nM

#### Etapas de la qPCR

- Dénaturation préliminaire: séparation des brins d'ADN : 94°C – 10 min
- 40 cycles :
  - dénaturation : 94°C -20 secondes
  - hybridation des amorces : 58°C- 20 sec
  - élongation: synthèse du brin complémentaire : 72°C- 20 sec
- Elongation finale : 72°C- 5 min

Une courbe de fusion des produits PCR est ensuite réalisée entre 40 et 95°C pour vérifier l'absence d'artefacts.

L'expression des gènes testés a été comparée à l'expression d'un gène constitutif, l'ubiquitine ou l'actine, selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et Schmittgen, 2001).

## 3.2. Echelle cellulaire

### 3.2.1. Evaluation de la viabilité cellulaire

#### 3.2.1.1. *Test LDH*

Le test est basé sur l'oxydation de NADH/H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup> par la LDH qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate (Fig.14). Le transfert d'ions H/H<sup>+</sup> induit la réduction du sel de tetrazolium INT (jaune) en sel de formazan (rouge). La quantité de sel formazan relargué par les cellules mortes ou moribondes (membrane altérée) est mesurée par spectrophotométrie à 492 nm.

Le kit cytotoxicity Detection <sup>PLUS</sup> (LDH: lactate déshydrogénase) (Roche applied science) a été utilisé pour évaluer l'intégrité membranaire des cellules.

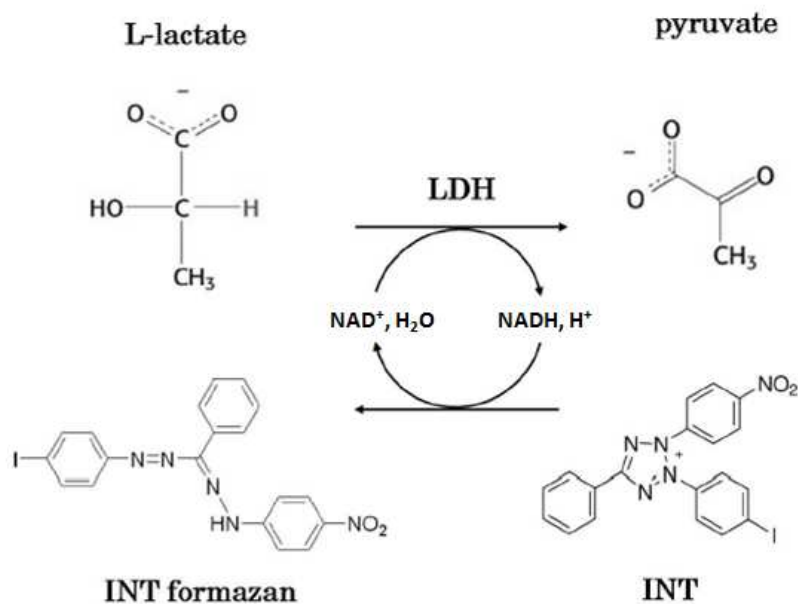


Figure 14. Principe du test LDH

### 3.2.1.2. Test MTT

Ce test permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires. Ce test est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide), les sels de tétrazolium du substrat (jaune) sont transformés en cristaux insolubles de formazan (bleu) grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase (Fig.15). La quantité de sel formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

Le test du MTT est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriales assimilables à une mesure de la vitalité cellulaire.

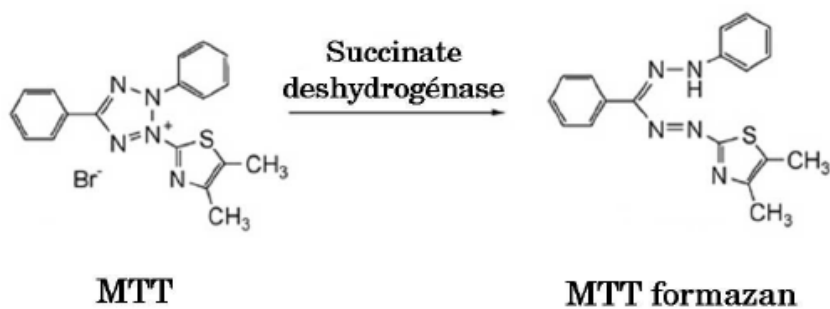


Figure 15. Réduction du MTT en sel de formazan

La mesure de viabilité cellulaire par le test MTT est réalisée en microplaque 96 puits. Une solution de MTT à 10 mg/ml est ajoutée à la suspension cellulaire (v/v). Après 24 heures d'incubation à 16°C, les cellules sont lysées par un tampon de lyse (50/50, DMSO /solution de lyse (0.1 N HCl dans isopropanol/10% Triton X100) ou 50/50, SDS 20%/Diméthylformamide) pour permettre la solubilisation du MTT. L'absorbance est lue à 570 nm au spectrophotomètre après flux/reflux du tampon de lyse pour une meilleure homogénéisation.

Un dosage des protéines est réalisé en parallèle du test de viabilité en utilisant le kit quantitation protein BC Assay (Interchim). Celui-ci est recommandé pour vérifier la densité cellulaire (Maleri et al., 2008a).

### 3.2.2. Phagocytose

La phagocytose est un paramètre immunologique considéré comme un biomarqueur sensible pour le suivi des métaux et d'autres contaminants de l'environnement. La phagocytose a été évaluée par la technique classique de comptage au microscope et par cytomètre de flux qui est une méthode plus fiable et répandue.

- Technique par comptage au microscope

Les billes de latex fluorescentes de 2 µm de diamètre ont été ajoutées aux cœlomocytes ( $10^6$  cellules/ml) selon le ratio 1 :100 (cœlomocytes : billes). Les suspensions cellulaires sont incubées à 16°C pendant 4 heures sous agitation lente. Après une centrifugation à 150 g pendant 10 min sur un gradient ASB 3% pour éliminer les billes non phagocytées, le culot est repris dans 500 µl de LBSS. Un dépôt de 25 µl de la suspension cellulaire sur une lame recouverte de poly-L-Lysine est réalisé. La lame est incubée pendant 45 minutes en chambre humide. La fixation est assurée par un trempage dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Les lames sont lavées deux fois par trempage dans du tampon PBS. Un ajout de 10 µl d'antifading est effectué pour réaliser le montage entre lame et lamelle. La fluorescence des billes est observée au microscope à fluorescence à l'objectif x40 (magnitude x400 ; Fig.16). Un comptage de 100 cellules est effectué en duplicat pour déterminer le pourcentage de cellules ayant phagocyté des billes dans chaque condition expérimentale.

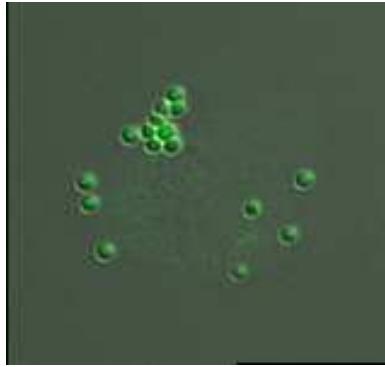


Figure 16. Observation de cœlomocytes phagocytant des billes fluorescentes au microscope confocal (magnitude x400)

- Technique par cytométrie de flux

L'ajout des billes de latex fluorescentes de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre est réalisé dans les mêmes proportions que pour la technique par lecture microscopique (ratio 1 :100, cœlomocytes : billes). Les suspensions cellulaires ont été ensuite incubées à 16°C pendant 18 heures sous agitation lente. Après une centrifugation à 150 g pendant 10 min sur un gradient ASB 3% pour éliminer les billes non phagocytées, le culot a été repris dans 500  $\mu\text{l}$  de PFA 4% dissous dans du milieu LBSS 300 mosmol. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C.

La fluorescence des billes phagocytées a été mesurée au cytomètre de flux (FACScan, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA) avec un laser argon qui émet à 488 nm. La fluorescence émise est mesurée à 520 nm (FL1). Un comptage de 10 000 événements est effectué pour évaluer l'activité phagocytaire dans chaque condition expérimentale. La phagocytose a été déterminée en mesurant le pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes (Fig.17).

Un témoin négatif a été réalisé en parallèle de chaque exposition en exposant les cœlomocytes à l'azide de sodium (1%).

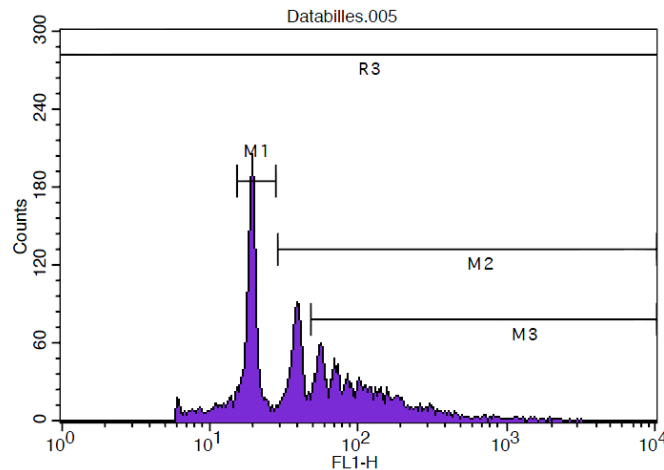


Figure 17. Profil de distribution des cœlomocytes témoins ayant phagocytés 1 bille (M1), au moins 2 billes (M2) et au moins 3 billes (M3) au cytomètre de flux

### 3.3. Echelle de l'individu

#### 3.3.1. Survie

A la fin de chaque exposition, la survie des vers de terre a été évaluée. Les vers de terre sont considérés vivants s'ils réagissent à une piqûre d'épingle appliquée au niveau de la partie antérieure lorsqu'ils sont immobiles.

#### 3.3.2. Reproduction

Les effets des sols contaminés aux nanomatériaux ont été mesurés sur la reproduction des vers de terre après 28 jours (cocons) et 56 jours (juvéniles) d'exposition, suivant le protocole normalisé au niveau international ISO 11268-2 (1998).

Après 48 heures de déuration, dix vers de terre adultes (masse corporelle compris entre 300 et 600 mg) par réplicat (5) sont pesés puis placés dans un cristalliseur en verre, contenant 500 g de substrat humidifié contaminé ou non. Le contenu en eau est réajusté chaque semaine. Pour éviter la fuite des vers de terre du milieu d'exposition, les cristalliseurs sont recouverts d'un film transparent, percé de dix trous fins ( $\varnothing$  1 mm) pour permettre une aération. Chaque semaine, l'excédent de nourriture est enlevé et 5 g de crottin de cheval séché, tamisé et exempt de toute trace de pollution est ajouté par récipient d'essai. Après 28 jours d'exposition, le pourcentage de survie des vers de terre adulte est déterminé ainsi que leur biomasse. Les cocons produits durant cette période d'exposition sont également comptés. Les

cocons sont ensuite remis dans le milieu d'essai pour une durée de 28 jours. Chaque semaine, l'excédent de nourriture est enlevé et 2 g de crottin sont ajoutés par récipient d'essai. A la fin de l'expérimentation (56 jours), les cocons éclos et non éclos ainsi que les vers juvéniles sont comptabilisés. Le pourcentage d'éclosion des cocons ainsi que le nombre de juvéniles produits est déterminé.

Les différents critères de validité du test reproduction à respecter sont:

- un pourcentage de mortalité des vers adultes du milieu témoin inférieur à 10%,
- une perte moyenne de biomasse des vers adultes du milieu témoin inférieure à 20%,
- une production de juvéniles par réplicat après 56 jours d'exposition au milieu témoin supérieure à 30,
- un coefficient de variation de la production de juvéniles après 56 jours d'exposition au milieu témoin inférieur à 30% (entre les réplicats)
- une concentration en bénomyl (produit toxique de référence) comprise entre 5 et 20 mg/kg de sol sec dans le milieu ISO, responsable d'une inhibition significative de la production de juvéniles après 56 jours d'exposition (ISO 11268-2, 1998) – LOEC mesurée = 5 mg bénomyl/kg de sol sec.

## 4. Protocoles d'exposition *in vitro* et *in vivo* aux nanomatériaux

### 4.1. Exposition des cœlomocytes aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> : *in vitro*

L'exposition directe des cellules aux NP TiO<sub>2</sub> a été réalisée pour favoriser les contacts entre les particules et les cellules cibles (cœlomocytes). Après 10 min de sonication par bain, la suspension mère de NP TiO<sub>2</sub> est diluée 10 fois dans de l'eau ultrapure. Cette suspension diluée (1 g/l) est ensuite diluée 10 fois dans du milieu de culture. Une suspension à 100 mg/l dans du milieu de culture est ainsi obtenue. Elle est utilisée pour exposer les cœlomocytes des vers de terre aux concentrations en NP TiO<sub>2</sub> choisies : 0, 1, 5, 10 et 25 mg/l.

Les expositions sont réalisées dans des plaques 24 puits dans un volume final de 1 ml. Les cœlomocytes (10<sup>6</sup> cellules/ml) sont exposés pendant 4, 12 et 24 heures aux NP TiO<sub>2</sub> à 16°C à l'obscurité. A la fin de l'exposition, un ajout de 50 ng de lipopolysaccharide (LPS) est réalisé pour stimuler la réponse immunitaire. Après 5 heures d'exposition aux LPS, les tests de

viabilité cellulaire et la phagocytose sont effectués. Les cellules utilisées pour l'expression des ARNm des gènes de détoxification et du système immunitaire sont conservées dans 500  $\mu$ l de Trizol à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La purification des ARN est effectuée dans les 2 jours suivant l'exposition. Quatre réplicats sont réalisés pour chaque condition.

## 4.2. Exposition *in vivo* des vers de terre aux nanomatériaux de $\text{TiO}_2$

### 4.2.1. Milieu liquide

Cette expérience en milieu liquide a pour but d'évaluer les potentiels effets écotoxiques des SPA  $\text{TiO}_2$  dans des conditions où les contacts entre les vers de terre et les particules sont favorisés et où les nanomatériaux sont plus facilement caractérisables. Après agitation, la suspension mère de SPA (100 mg/l) a été diluée dans un mélange eau ultra-pure / eau d'Evian<sup>®</sup> (Tab.X) (50/50, v/v) pour obtenir les concentrations choisies en SPA  $\text{TiO}_2$  : 0, 0,1, 1 et 10 mg/l. Le pH des suspensions testées est  $7,66 \pm 0,17$ .

**Tableau X.** Composition de l'eau minérale, Evian<sup>®</sup>

Minéraux	Concentrations (mg/l)
Ca	80
Mg	26
Na	6,5
K	1
$\text{SiO}_2$	15
$\text{HCO}_3^-$	360
$\text{SO}_4^{2-}$	12,6
$\text{Cl}^-$	6,8
$\text{NO}_3^-$	3,7

Après 48 heures de dépuratation, les vers sont pesés puis déposés par 6 dans des boîtes de pétri en verre (unité expérimentale) contenant la suspension de SPA  $\text{TiO}_2$  aux concentrations testées ou le mélange d'eau (témoin). Les vers sont exposés à un volume de suspension (65 ml) suffisant pour les recouvrir. Les expositions sont réalisées dans une chambre climatisée à  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité pour une durée de 24 heures. Cinq réplicats sont réalisés pour chaque concentration (Fig.18).





Figure 18. Photographie du protocole d'exposition en milieu liquide

#### 4.2.2. Sol contaminé

##### 4.2.2.1. Préparation des sols

Cette expérience en sol contaminé a pour but d'exposer les vers aux 2 nanomatériaux étudiés (SPA  $\text{TiO}_2$  ou NP  $\text{TiO}_2$ ) dans des conditions environnementales plus réalistes qu'en milieu liquide. Le sol artificiel est choisi comme substrat du fait de la simplicité de sa composition. En effet, il est composé (en pourcentage de matière sèche) de tourbe tamisée (10%), d'argile kaolinique (20%) et de sable de Fontainebleau (70%). Le pH est ajusté à  $6 \pm 0.5$  avec du carbonate de calcium. Le pH des sols testés est mesuré au début, à 2, 28 et 56 jours suivant le protocole normalisé au niveau international ISO 10390 (1994). Dans un cristallisateur en pyrex<sup>TM</sup>, 200 ml d'eau déminéralisée (témoin) ou de la suspension de nanomatériaux considéré (NP  $\text{TiO}_2$  ou SPA de  $\text{TiO}_2$ ) ont été mélangés à 500 g de sol artificiel.

Les suspensions de nanomatériaux sont préparées de la manière suivante :

- Nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  : après 10 minutes de sonication par bain à ultra-son, la suspension mère de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (10 g/l) est diluée dans de l'eau ultrapure pour contaminer les sols artificiels aux 3 concentrations suivantes en NP  $\text{TiO}_2$  : 2, 20 et 200 mg/kg.
- Sous produits d'altération de  $\text{TiO}_2$  : la suspension mère de SPA  $\text{TiO}_2$  (100 mg/l) est également diluée dans de l'eau ultrapure après agitation pour contaminer les sols artificiels aux 2 concentrations suivantes en SPA  $\text{TiO}_2$  : 2 et 20 mg/kg.

Le substrat est humidifié avec de l'eau déminéralisée (témoin) ou la suspension de nanomatériaux (NP  $\text{TiO}_2$  ou SPA  $\text{TiO}_2$ ) entre 40 et 60% de sa capacité de rétention en eau totale, déterminée conformément au protocole normalisé au niveau international ISO 11274 (1998). Un film transparent recouvert d'un morceau de ruban adhésif percé referme le cristallisateur. Les récipients sont placés dans une chambre climatisée à une température

moyenne de  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité pendant 2 semaines pour permettre les interactions et liaisons entre les constituants du sol et les ions métalliques de la suspension. Pour cela, le sol est régulièrement mélangé et pesé pour maintenir la teneur en eau. Huit réplicats sont effectués pour chaque concentration testée.

#### 4.2.2.2. Effets à court terme

Après 2 semaines de stabilisation, les vers sont dépurés pendant 48 heures puis pesés. Pour chaque cristallisoirs, 10 vers sont directement placés dans chaque cristallisoir (3 réplicats par concentration). L'exposition dure 2 jours à l'obscurité dans une chambre climatisée à  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , sans apport de nourriture. A la fin de l'exposition, les cœlomocytes de 3 vers pour chaque réplicat sont collectés par choc électrique et conservés dans du GATC (4M) à  $-80^\circ\text{C}$  pour étudier l'expression des ARNm des gènes du système immunitaire et des systèmes de détoxification.

#### 4.2.2.3. Effets chroniques

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets à long terme d'une exposition aux nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$ . Après 2 semaines de stabilisation, les vers sont dépurés pendant 48 heures, pesés, puis placés par 10 dans chaque cristallisoir (5 réplicats par concentration). L'exposition est réalisée à l'obscurité dans une chambre climatisée à  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  (Fig.19). Chaque semaine, la position des cristallisoirs est modifiée de manière aléatoire. La procédure du test reproduction des vers de terre a été suivie (cf 3.3.2). Après 28 jours d'exposition, la survie, la biomasse et la production de cocons par les vers sont mesurées. Les cœlomocytes des vers (3 vers par cristallisoir pour chaque condition) sont récupérés par choc électrique et conservés dans du GATC (4M) à  $-80^\circ\text{C}$  pour étudier l'expression des ARNm des gènes du système immunitaire et de détoxification.



Figure 19. Photographie du protocole d'exposition en milieu solide

# *Résultats*

# 1. Etude *in vitro* des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur les cœlomocytes de vers de terre

## Avant propos

Le développement, la production et l'utilisation des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> dans un grand nombre de produits manufacturés engendrent leur déversement dans l'environnement. Afin de prédire une toxicité potentielle, la majorité des travaux évaluent les effets biologiques des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur des cellules humaines et de mammifères par des tests *in vitro*. Cependant, il existe un réel manque de données concernant les invertébrés terrestres. Il a été choisi dans un premier temps d'évaluer la toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur les cellules immunitaires, appelés cœlomocytes, du ver de terre *Eisenia fetida*, en utilisant un test *in vitro*.

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer la stabilité et la dispersion des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans le milieu de culture, et la réponse des biomarqueurs cellulaires et moléculaires des cœlomocytes.

Cellular and molecular responses of *E. fetida* coelomocytes  
exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles<sup>4</sup>

Emilie Bigorgne<sup>a</sup>, Laurent Foucaud<sup>a</sup>, Céline Caillet<sup>b</sup>, Laure Giambérini<sup>a</sup>, Johanne Nahmani<sup>a</sup>,  
Fabien Thomas<sup>b</sup>, François Rodius<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Interactions Ecotoxicologique Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE)

CNRS UMR7146

Université Paul Verlaine Metz

Rue du général Delestraint

57070 METZ

France

<sup>b</sup> Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) CNRS UMR7569

Nancy-Université / INPL

15, Avenue du Charmois BP 40

54501 Vandœuvre Cedex

France

\* **corresponding author:** emilie.bigorgne@univ-metz.fr

Emilie Bigorgne

Université Metz Paul Verlaine, LIEBE, CNRS,

FRANCE

Phone : +33 (0)3 87 37 84 21

Fax : +33 (0)3 87 37 84 23

e-mail : emilie.bigorgne@univ-metz.fr

---

<sup>4</sup> Article soumis à Journal of Nanoparticle Research

## Abstract

An *in vitro* approach using cœlomocytes of *Eisenia fetida* was investigated in order to evaluate toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Cœlomocytes were exposed to well-dispersed suspension of small aggregates of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (1 to 25 µg/ml) during 4, 12 and 24h. Intracellular localization suggested that the main route of uptake was endocytosis. Cellular responses showed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles were not cytotoxic and had no effect on phagocytosis at any of the four concentrations for each time tested. Concerning molecular responses, an increase of fetidin and metallothionein mRNA expression was observed starting from 4 hours of exposure. In contrast, expression of cœlomic cytolytic factor mRNA decreased for 10 and 25 µg/ml after 4 hours. Superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase expression were not modified suggesting that oxidative stress was not induced by TiO<sub>2</sub> in our experimental conditions. This *in vitro* approach showed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles were taken up by cœlomocytes and they could modify the molecular response of immune and detoxification system.

### Keywords:

TiO<sub>2</sub> Nanoparticles - cœlomocytes - immune system - detoxification system - TEM

**Abbreviations:** BCA: Bicinchoninic Acid; BSA: Bovine Serum Albumin; CAT: Catalase; CCF: Cœlomic Cytolytic Factor; FBS: Fetal Bovine Serum; GST: Glutathione S-transferase; LDH: Lactate dehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharides; LBSS: Lumbricus Balanced Salt Solution; MEM: Minimum Essentiel Medium; MT: Metallothioneins; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NP: Nanoparticle; PFA: Paraformaldehyde; ROS: Reactive Oxygen Species; SOD: Superoxide Dismutase; TEM: Transmission Electron Microscopy; TNF: Tumor Necrosis Factor; XRD: X-ray diffraction.

## 1. Introduction

Development of nanotechnologies implies the increase of production of nanoparticles (NP) and nanocomposites. Engineered nanoparticles are used in cosmetic, medical, agricultural, industrial and manufacturing sectors for their novel physical and chemical properties. As a consequence, nanoparticles are necessarily released in the environment (Klaine et al., 2008). Potential exposure of humans and animals to nanoparticles has become the subject of a growing number of toxicity studies. However, the colloidal behaviour of nanoparticles in a biological medium is complex and depends on parameters such as ionic strength, cation valence, pH or presence of other colloids (Oberdörster et al., 2007; French et al., 2009). Therefore, the knowledge of the physico-chemical behaviour of nanoparticles in the medium of biological experimentation is a key point to avoid misinterpretations of toxicological investigations (Foucaud et al., 2007; Murdock et al., 2008). These observations underline the need to include physico-chemical characterization in any toxicity experimentation concerning NP.

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles are among the most manufactured and used in consumer products such as paints, coatings or cosmetics. Several studies have clearly established that these nanoparticles exert toxic effects on mammal cells, leading to apoptosis induction, cytotoxicity and genotoxicity (Rahman et al., 2002; Wang et al., 2007; Braydich-Stolle et al., 2008; Barillet et al., 2010). Studies on bacteria (Jang et al., 2001; Adams et al., 2006), on aquatic organisms (Federici et al., 2007; Reeves et al., 2008; Canesi et al., 2010) and also on terrestrial organisms (Jemec et al., 2008; Hu et al., 2010; Lapied et al., 2010) have shown similar toxic effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. In terrestrial ecosystems, earthworms are considered as bioindicators of soil quality and are therefore widely used for ecotoxicological studies. In this context, the earthworm immune system has been well studied and used to evaluate the potential risk of environmental pollutants (Goven et al., 2005). The circulating immune cells of earthworms, also called coelomocytes, include two types of cells, amœbocytes and eleocytes. They are involved in various mechanisms of immune defence such as cytotoxicity, phagocytosis, inflammation, encapsulation, and secretions of antimicrobial proteins (Cooper et al., 2002). For this reason, cell viability of coelomocytes is a recommended earthworm immune marker as it provides a general overview of the earthworm's immune capacity (Eyambe et al., 1991). Another well-studied immune marker is phagocytosis (Sauvé et al., 2002; Massicotte et al., 2004; Sauvé and Fournier, 2005) also

considered as a sensitive biomarker of immunotoxicity (Ville et al., 1997; Fournier et al., 2000). The Cœlomic Cytolytic Factor (CCF) protein is functionally similar to TNF (Beschinn et al., 2002) and is involved in the prophenoloxidase (pro-PO)–activating defence system of *Eisenia fetida* (Beschinn et al., 1998). Fetidins, also secreted by cœlomocytes (Lassegues et al., 1997; Milochau et al., 1997), are proteins exhibiting hemolytic and antimicrobial properties. The expression of CCF and fetidin mRNA is still poorly documented (Köhlerova et al., 2004; Prochazkova et al., 2006; Liu et al., 2009) nevertheless the quantification of mRNA expression can be a sensitive and complementary tool for immune toxicity evaluation of pollutants. TiO<sub>2</sub> NP are known to induce pro-inflammatory reaction whose mechanisms would imply the induction of an oxidative stress associated with the surface reactivity of the particles (Monteiller et al., 2007). To protect organisms from ROS, antioxydant systems include superoxide dismutase and catalase. GST and metallothionein are involved in the detoxification pathways and also in antioxidant defences. Therefore, an oxidative stress could induce an increase of these mRNA levels. Modification of SOD, CAT and MT mRNA expression has been studied on the whole body or on cœlomocytes of the earthworm *E. fetida* exposed to metals (Asensio et al., 2007; Brulle et al., 2007; Brulle et al., 2008). In contrast, the level of GST expression was not evaluated as its mRNA is still not identified in *E. fetida*. In this study, a partial GST coding sequence of *Eisenia fetida* was obtained and mRNA GST expression was quantified.

Ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> NP was studied directly on cœlomocytes of earthworm *E. fetida*, since *in vitro* assays are considered as predictive screenings for assessing particle toxicity.

In this study, our purpose was (i) to determine the colloidal state of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the medium of exposure, (ii) to assess nanoparticle intracellular accumulation in the cœlomocytes and finally (iii) to test their potential effects on cœlomocyte viability, phagocytosis and mRNA expression of immune and detoxification genes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. TiO<sub>2</sub> Nanoparticle suspension

Titanium dioxide nanoparticles (Evonik Aeroxide, P-25) are composed of 80% anatase and 20 % rutile. The crystalline structure of TiO<sub>2</sub> nanoparticles was measured using the X-ray diffraction (XRD) on a Bruker D8 Advance operating on the Co-K<sub>α1</sub> ray at 35 keV and 45



mA. The stable stock suspension prepared in sterile ultrapure water (10 g/l) was probe-sonicated (Sonics Vibra-cell 750W, Sonics & Materials, frequency 20 kHz, 3 mm micro tip, amplitude 40%) for 30 min at 4°C in the dark. The stock suspension was mainly composed of small aggregates and its stability was checked by Pagnout et al. (submitted). Before use, the stored suspension was sonicated again using a sonicator bath (Fisher Scientific FB 15048) for 10 min before being diluted in culture medium (MEM 85%, FBS 10%, 420 mM HEPES 1%, L glutamine 2 mM, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, tetracyclin 60 µg/ml, amphotericin B 30 µg/ml) to reach a concentration of 100 µg/ml. Final dilutions were made in culture medium to the following concentrations: 1, 5, 10 and 25 µg/ml.

Nanoparticle aggregation was investigated in suspensions of TiO<sub>2</sub> NP at 25 µg/ml in a cell culture medium. Primary size and morphology of nanoparticles were determined by transmission electron microscopy (TEM), using a Philips CM20 (200 kV) microscope. A drop of stock suspension was deposited on a TEM grid, allowed to dry and directly observed. Sizes were measured on 50 nanoparticles randomly chosen. The size distribution of TiO<sub>2</sub> NP dispersions was measured in 4 different media: ultrapure water, MEM 85%, MEM 85 % + HEPES 1%, and MEM 85% + HEPES 1% + FBS 10%. These data were determined by dynamic light scattering (DLS) using the Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments) after 1, 16 and 23 hours of contact in TiO<sub>2</sub> NP with the considered medium. The intensity weighted size distributions were first obtained by fitting a multiple exponential to correlation function of the scattered intensity, using Non-Negative Least Squares (NNLS) algorithm. They were further converted to volume weighted distributions with Mie theory using the sample refractive index, then to number weighted distributions considering the TiO<sub>2</sub> NP as spherical particles of volume equal to  $\frac{4}{3}\pi (d/2)^3$  with d the hydrodynamic diameter. Here, results were presented in number weighted size distributions, as the contribution of few large particles to the total light scattered will minimise the one of the numerous NP, as the Rayleigh approximation tells us (Intensity  $\propto d^6$ ).

Turbidity measurements were used to determine limit conditions for colloidal stability of TiO<sub>2</sub> NP dispersion as a function of the composition of suspension medium. The turbidity of TiO<sub>2</sub> NP suspension (25 µg/ml) was measured in the four media mentioned above. The measurements were performed on these suspension supernatants, after 1, 16 and 23.5 h to allow settling of particles, using a Hach Lange 2100AN turbidimeter.

## 2.2. Cell culture and treatments

Earthworms, *Eisenia fetida*, healthy clitellate ( $358 \pm 82$  mg) were selected from the breeding stocks of our laboratory. Twenty four worms were washed with deionised water and maintained in groups of six for 48h at 20°C in plastic Petri dishes containing Whatman No. 1 filter paper, to clear their guts of soil. The filter paper was changed three times per day to prevent coprophagy. Following depuration, each worm was rinsed with LBSS adjusted to 300 mosmol/l (NaCl 71.5 mM; KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM; pH 7.3) and introduced in a 15 ml tube containing 3 ml of coelomocyte extrusion medium (1% GGE, 0.02% EDTA into LBSS 300 mosmol/l). After extrusion, worms were removed and coelomocytes were centrifuged at 150 g for 10 min. Supernatants were removed and 300 µl of culture medium was added. For every measured parameter, cells were pooled and adjusted to 10<sup>6</sup> cells/ml. Then they were exposed to freshly prepared dispersions of TiO<sub>2</sub> nanoparticles at various concentrations: 0 as control, 1, 5, 10 and 25 µg/ml. Experimental units were microplates of 24 wells, except for the MTT assay where microtiterplates of 96 wells were used. All exposures were performed in the dark at 16°C for 4, 12 and 24 hours with four replicates for each tested conditions. After cell exposure to TiO<sub>2</sub> NP, lipopolysaccharides (500 ng/ml) were added to each cell suspension for 5 h in order to stimulate the immune response.

## 2.3. Cell preparation for transmission electron microscopy

Cells were exposed during 4, 12 and 24 h to TiO<sub>2</sub> NP (25 µg/ml). They were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 60 min, rinsed in phosphate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide. Cells were dehydrated through graded alcohols and embedded in Epon-Araldite. Ultra-thin sections (60-80 nm) were cut with a diamond knife on an ultramicrotome (UltratomeV, Leica). They were placed on carbon films and stained with uranyl acetate and lead citrate. Examinations were carried out on a Philips CM20 (200 kV) Transmission Electron Microscope equipped with an energy dispersive spectrometry (EDS) analyzer for the determination of the elements composing particles inside cells.

## 2.4. Cell viability

### 2.4.1. LDH assay

The cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH: lactate dehydrogenase) (Roche applied science) used is an enzymatic test. This test is based on the oxidation of NADH/H<sup>+</sup> to NAD<sup>+</sup> by the

LDH-catalysed conversion of pyruvate to lactate. After exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles, assay medium was added to cells for 30 min at room temperature in the dark. Then, a solution of stop reaction was added and microplate was read at 492 nm. Cytotoxicity was evaluated using the following equation (A: Absorbance):

$$\text{cytotoxicity (\%)} = \frac{A_{490\text{nm}}(\text{sample}) - A_{490\text{nm}}(\text{LC})}{A_{490\text{nm}}(\text{HC}) - A_{490\text{nm}}(\text{LC})} \cdot 100$$

With: LC – Low Control: spontaneous LDH liberation of non treated cells

HC – High Control: maximum LDH liberation of cells treated by lysis buffer

#### 2.4.2. MTT assay

The MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay is an indicator of mitochondrial activity applied according to Carmichael et al. (1987), with some modifications. Cells were exposed to TiO<sub>2</sub> NP in a microtiterplate (96 wells) with 8 replicates per condition. Two blanks containing only LBSS were used as controls. After exposure to TiO<sub>2</sub> NP, the supernatant of cells was removed in order to remove free nanoparticles which could interfere with the measure. A MTT suspension at 5 mg/l (100 µl) was added in each well for 24 hours in the dark at 16°C. Then, buffer lysis (SDS 20%: Dimethylformamide; v:v) was used to solubilise blue formazan. The absorption was read photometrically at 570 nm. Tests were considered valid only if the right LBSS blank did not differ more than 20% from the left blank (Maleri et al., 2008). The response of the MTT assay depended on the cell concentration. Results were standardized by protein contents measured using the BC Assay Protein Quantitation kit (Interchim).

#### 2.5. Phagocytosis activity

After 24 hours of exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles, latex beads (2 µm, Sigma L0905) were added with a ratio of 1:100 (cells: beads) to the cœlomocyte suspensions for 18 hours at 16 °C in the dark under gentle shaking. Cell suspensions were deposited on a BSA gradient and a centrifugation of 10 min at 150 g was performed to exclude free beads. The supernatant was removed and the cell pellets were resuspended in 500 µl of PFA (4%). The percentage of cells containing fluorescent beads and the number of beads per cell were measured using a flow

cytometer (FacsCalibur<sup>®</sup>, Becton-Dickinson) in FL1. The software used to evaluate the phagocytic index (PI) was CellQuest<sup>®</sup> (Becton-Dickinson). This index was measured on 10000 events per sample and it corresponds to the relative number of cœlomocytes having at least 3 beads engulfed (Brousseau et al., 1999).

## 2.6. mRNA expression of immune and detoxification genes

### 2.6.1. RNA extraction and reverse-transcription

Total RNAs were extracted using the Tri Reagent<sup>®</sup> (MRC, Cincinnati, USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA integrity was estimated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE (Tris 40 mM, Acetic acid 1 mM, EDTA 40 mM) buffer followed by a visualization under UV light. The quantification of total RNA was evaluated by measurement of absorption at 260 and 280 nm. Reverse-transcription was performed on 1 µg of total RNA using the Revert Aid MuLV RT Kit (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). The reaction was conducted at 42°C for 30 min and 90°C for 5 min in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP (2'-deoxyribonucleotide 5'-triphosphate) mix, 2.5 µM of OligodT primer, 10 U/µl of Revert Aid MuLV RT and 1 U/µl of Ribolock RNase Inhibitor.

### 2.6.2. GST cDNA amplification using degenerate primers

cDNA corresponding to the digestive tract was used to identify GST coding sequences. Degenerated primers GST.Fd and GST.Rd were chosen in GST conserved coding sequences from different species (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* and *Mus musculus*). The primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA); their sequences are given in table I. The conditions of amplification tested were the following: 200 µM of each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 or 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM of each degenerated primer and 1 unit of *Taq* DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). We tested different cycling parameters: a 5-min denaturation at 94°C, 40 cycles of heat denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 45, 50 or 55°C for 1 min, polymerisation at 72°C for 30 s, and a 5-min final extension at 72°C.

### 2.6.3. Cloning and sequencing

Amplimers were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system kit (Promega, Madison, USA) and cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, USA) according to

the manufacturer's instructions. After the transformation and selection steps, several transformants were screened by PCR using GST.Fd and GST.Rd primers to confirm the presence of an insert. For each cloning, insert-containing plasmids from three colonies were sequenced on both strands by Eurofins MWG Sequencing Department (Ebersberg, Germany).

#### 2.6.4. Sequence Analysis

Amplimer sequences were translated using the six possible ORFs. Nucleotide and deduced amino acid sequences were compared to all databases available on the National Center for Biotechnology Information site (NCBI at [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programs (Altschul et al., 1997).

#### 2.6.5. Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) was used to evaluate the expression level of immune (fetidin and CCF) and detoxification (MT, SOD, GST, CAT) genes on reverse transcribed total RNAs extracted from *E. fetida* coelomocytes. Real-time PCR reactions were performed using a SYBR Green dye (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a MiniOpticon system according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, USA). Specific primers Fet.F200, Fet.R200, CCF.F100, CCF.R100, MT.F200, MT.R100, SOD.F50, SOD.R200, CAT.F100, CAT.R50, GST.F100, and GST.R250 were used to amplify fetidin, CCF, MT, SOD, CAT and pi-GST cDNA (Tab.I). Ubiquitin cDNA was coamplified as control using Ubiq.F100 and Ubiq.R100 primers. Primer sequences synthesized by Invitrogen (Carlsbad, USA), are given in Table I. For each PCR, 10 µl of qPCR Gotaq Master Mix was added to 5 µl of diluted cDNA and to 5 µl of PCR primers at 500 nM. The PCR consisted in 10-min initial denaturation at 94°C followed by 40 cycles of amplification and quantification : denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 58°C for 20 s, polymerization at 72°C for 20 sec, and a 5-min final extension at 72°C. A melting curve of PCR products (50–95°C) was also performed to check the absence of artefacts. Negative controls using non reverse-transcribed RNA were performed to confirm the absence of contamination.

PCR efficiencies (E) were calculated on a cDNA pool diluted between 1:20 to 1:320. Efficiency values were 0.95, 1.06, 1.01, 0.98, 0.94, 0.95, 1.06, for ubiquitin, fetidin, CCF, MT, SOD, CAT and GST cDNA, respectively. Expression levels of the target gene (Tg) were compared to the expression of ubiquitin, a constitutively expressed gene, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method (Livak and Schmittgen 2001). For each condition, results were obtained from four independent RT-qPCR for four different samples.

**Table I.** Sequences of primers used for PCR and RT-qPCR amplifications

Primers	Sequences (5'-3')
GST.Fd	ASMMTSATCTAYMMWAACTATGAN
GST.Rd	YTAYTGTTTDCRRTTKCCRITN
GST.F100	GAAAAGCCGCGTACATTAAGA
GST.R250	TGTGAGGGGAGAGGATGTTC
MT.F200	CTGCAAAAAGCTTTGCTGTG
MT.R100	TATTTCAATGCCTCGGCTCT
SOD.F50	TGGATTTACGTGCATGAGT
SOD.R200	GCCAAGATCGTCCACCAGCT
CAT.F200	TATGAATGGATACAGCAGTCACAC
CAT.R50	GCAAACGTCATCACTTGGATGT
Fet.F200	CGGCTTCGCATAGTATTGGT
Fet.R200	CAC CAA CGT CAG CAT TCA GT
CCF.F100	TTTGGTGGTCTTGTGTCTGC
CCF.R100	GCTTTCCATCTCGAACGAAG
Ubiq.F100	CACCCTTCACCTTGTGTT
Ubiq.R100	GGAATTCCTTCCTTGTCC

R : A or G ; Y : C or T ; S : G or C ; W : A or T ; K : G or T ; M : A or C ; D : A, G or T ; N : A.,C, G or T

## 2.7. Statistical analysis

The normality and the homogeneity of data variance were checked using Shapiro-Wilk test and Bartlett test, respectively. Cell viability, phagocytic index and mRNA expression were analysed by ANOVA followed by a post hoc HSD Tukey test. Statistical analysis was conducted using R software (R Development Core Team, 2006). Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

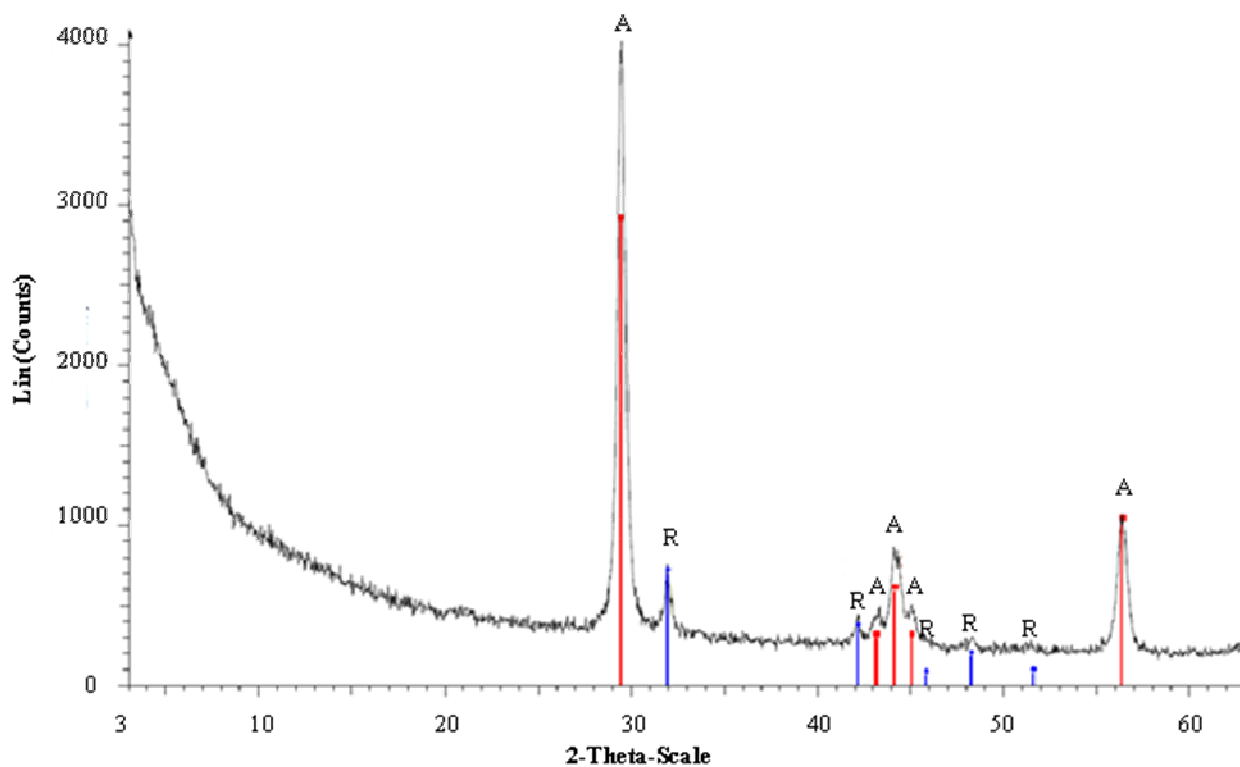
### 3. Results

#### 3.1. Aggregation state of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in culture medium

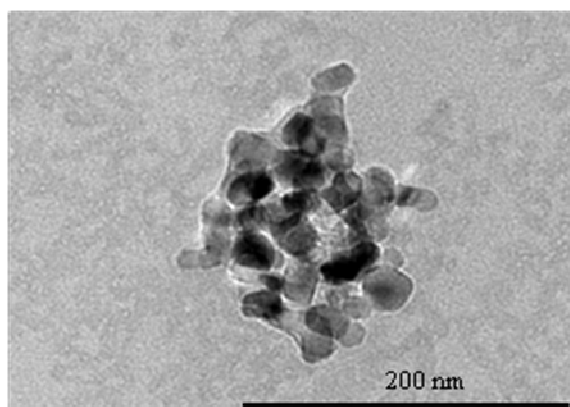
Chemical identity, purity and crystallinity were confirmed by XRD, which revealed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles are formed mainly in the anatase structure (red peaks marked A), with traces of rutile (blue peaks marked R) (Fig.1). The primary size and shape of TiO<sub>2</sub> nanoparticles was analyzed from TEM images (Fig.2). Primary particle sizes ranged from 18 to 124 nm (mean:  $41 \pm 27$  nm) which is close to the average size of 25 nm announced by the manufacturer, and their shape was spherical. The size distribution of TiO<sub>2</sub> NP was measured in the four media as a function of time (Fig.3). In ultrapure water, the hydrodynamic diameter of TiO<sub>2</sub> NP suspension showed an unimodal distribution around 100 nm after 1 and 16 h (Fig.3a, b) and 150 nm after 23 h (Fig.3c). It is clear that TiO<sub>2</sub> nanoparticles dispersed in ultrapure water (pH 6.15) form small agglomerates that cannot be readily broken by probe-sonication, as already observed by several authors on this material (e.g. Mandzy et al., 2005). It can be postulated that those agglomerates result from sintering of the primary particles during manufacturing.

MEM (85%) added to the suspension (pH 5.07) induced strong aggregation of TiO<sub>2</sub> NP, and the distribution mode was shifted around 1000 nm after 1h (Fig.3a), and 700 nm after 16 and 23 h (Fig.3b, c). The same pattern was observed when HEPES (1%) was added to MEM (85%) in the suspension (pH 5.21). The decrease of the size with time in these two media reflects the sedimentation of the largest aggregates and the consecutive clarification of the supernatant. On the other hand, addition of FBS (10%) to MEM (85%) and HEPES (1%) (pH 7.04) resulted in complete re-dispersion of the TiO<sub>2</sub> NP, with a size distribution around 130 nm whatever the contact time (Fig.3a, b, c). Therefore it can be concluded that TiO<sub>2</sub> NP suspensions in culture medium are stable and optimally dispersed, i.e. a dispersion of sintered nanoparticles.

This is confirmed by the turbidity measured in the same conditions. The turbidity of TiO<sub>2</sub> NP suspension in ultrapure water decreased very slowly with time, while in MEM (85%) the particles were sedimented after 16 hours, with a turbidity of 26 NTU left in the supernatant (Fig.4). Similar behaviour was observed in MEM (85%) + HEPES (1%), where the turbidity decreased to 38.8 NTU and 28.4 NTU after 16 and 23.5 hours respectively (Fig.4). However, the turbidity of the TiO<sub>2</sub> NP suspension in MEM (85%) + HEPES (1%) + FBS (10%) was slightly higher than in ultrapure water, and remained stable between 192 and 194 NTU (Fig.4).



**Figure 1.** X-ray diffractogram (XRD) of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with red peaks corresponding to anatase (A) and blue peaks corresponding to rutile (R)



**Figure 2.** TEM observation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the cell culture medium at 25 µg/ml



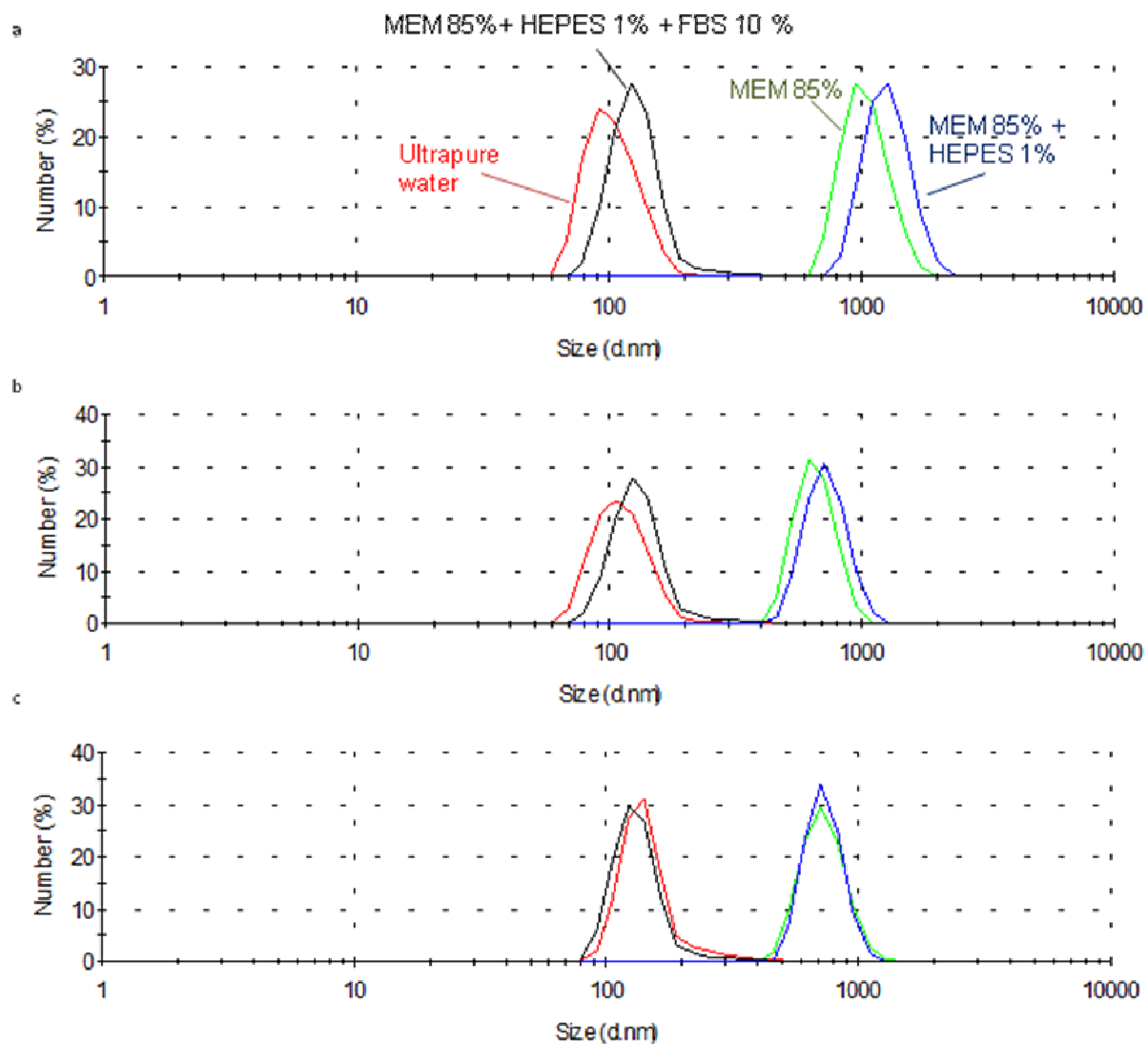
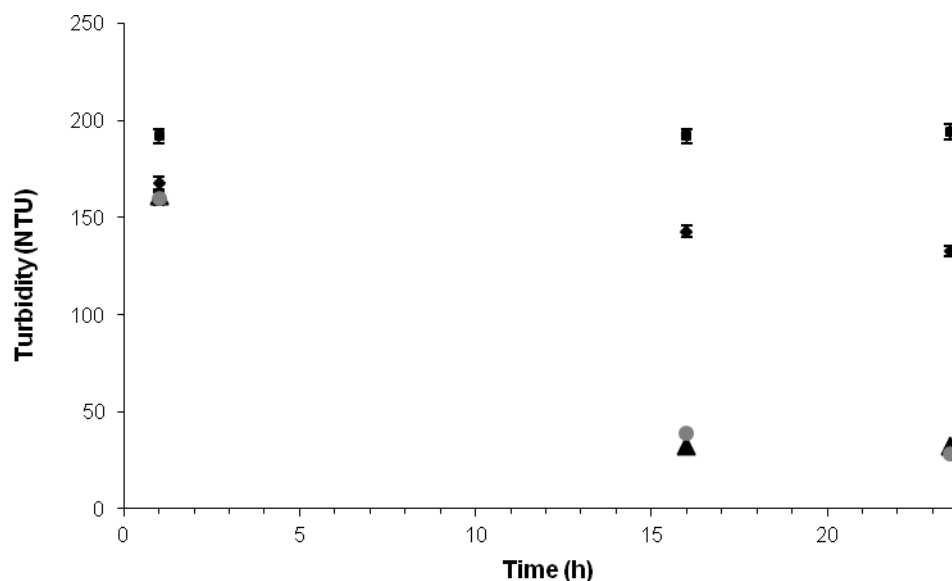


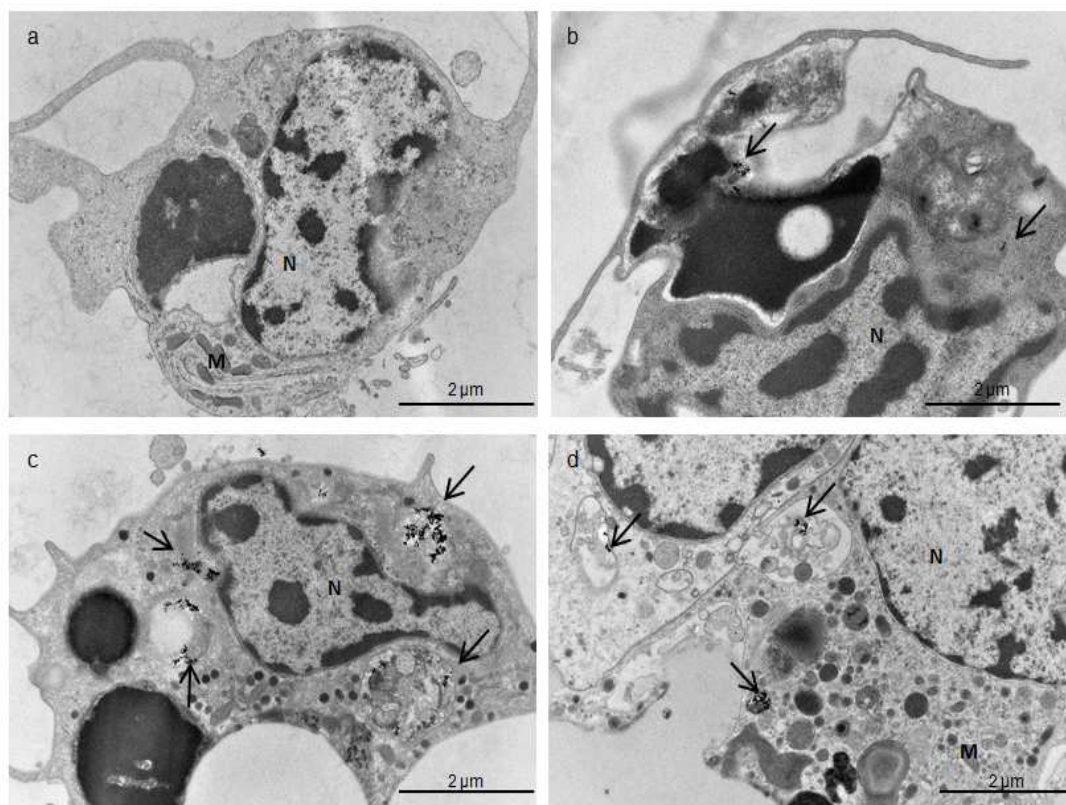
Figure 3. Size distribution of TiO<sub>2</sub> NP suspension (25 μg/ml) in ultrapure water (red line), in MEM 85% (green line), in MEM 85% and HEPES 1% (blue line) and in MEM 85%, HEPES 1% and FBS 10% (black line) at 1 h (a), 16 h (b) and 23h (c) measured on supernatants by DLS



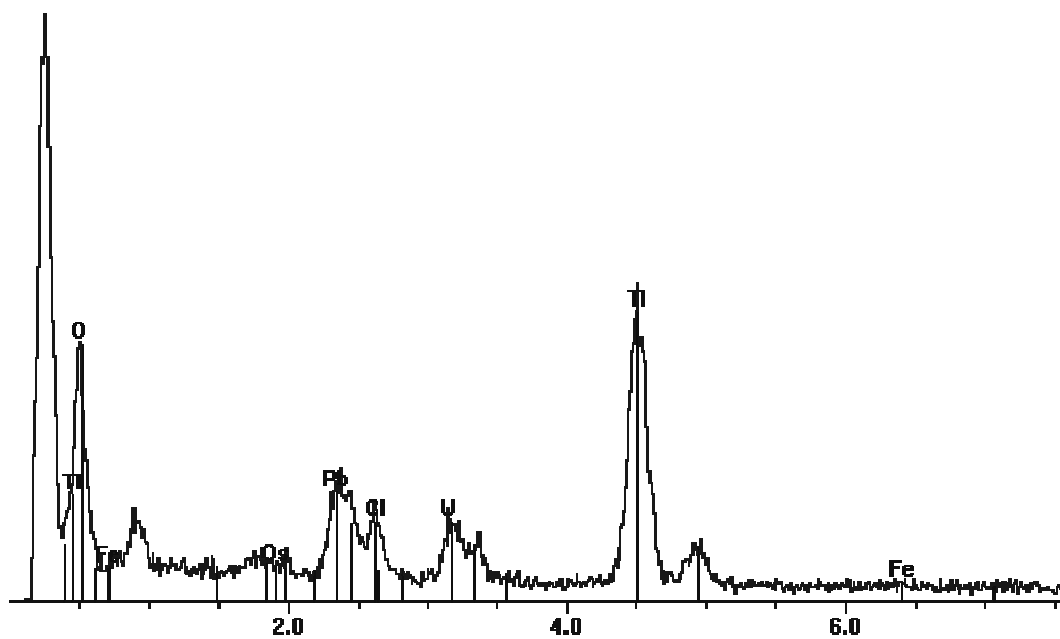
**Figure 4.** Turbidity (mean +/- SD) of TiO<sub>2</sub> NP suspension (25 µg/ml) in 4 media tested after 1, 16 and 23.5 hours of settling: ♦ ultrapure water; ▲ MEM 85%; ● MEM 85% and HEPES 1%; ■ MEM 85%, HEPES 1% and FBS 10%. Measures were performed on supernatants.

### 3.2. Intracellular localization

Intracellular penetration of nanoparticles was observed by TEM. Figure 5 represents the results obtained with control coelomocytes (Fig. 5a) and coelomocytes exposed to TiO<sub>2</sub>-NP during 4, 12 and 24 h (Fig. 5b, c, d). The EDS spectrum shows that particles taken up by cells are TiO<sub>2</sub> nanoparticles (Fig.6). Aggregates of TiO<sub>2</sub> nanoparticles were observed in the cytoplasm and in small granulations within the cells after only 4h of exposure (Fig.5b). After 12 and 24 hours, intracellular penetration of TiO<sub>2</sub> NP aggregates occurred in large vesicles, the phagosomes, and in small and large granulations corresponding to lysosomes (Fig.5c, d). Aggregates inside the cells are mainly of slightly larger size than those measured in the cell culture medium (100 - 400 nm).



**Figure 5.** TEM observation of control cells (a) and cells exposed to  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. Cœlomocytes were exposed during 4h (b), 12h (c) and 24h (d) to  $25 \mu\text{g/ml}$  of  $\text{TiO}_2$  NP. Nanoparticle localizations are indicated by arrows. M: mitochondria, N: cell nucleus



**Figure 6.** Typical EDS spectrum of X-ray fluorescence from  $\text{TiO}_2$  NP uptake by cœlomocytes. The peaks are labeled by their associate element (e.g. Pb)

### 3.3. Cell Viability and Phagocytic activity of cœlomocytes in presence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles

Metabolic activity of cœlomocytes measured with MTT assay (Tab.2) showed no significant variation of cell viability at any of the four concentrations tested compared to control after 4 hours (ANOVA, p= 0.92), 12 (ANOVA, p= 0.09) and 24 hours (ANOVA, p= 0.27) of exposure to TiO<sub>2</sub> NP. For LDH assay, cells exposed to 10 and 25 µg/ml showed a significant increase of LDH release following 4 hours (ANOVA, p= 0.001) and 24 hours (ANOVA, p= 0.002; Tab.2). No variation of LDH release was observed after 12 hours of exposure at any of the four concentrations tested (ANOVA, p= 0.20; Tab. 2). As the percentage of cytotoxicity of LDH assay never exceeds 5%, it can be concluded that there was no effect of TiO<sub>2</sub> on cell integrity of cœlomocytes.

After 24 hours of exposure to TiO<sub>2</sub> NP, no significant variation of phagocytic activity was noticed for the four concentrations tested compared to control (ANOVA, p=0.46; Tab. II). The mean values of phagocytic index for control and exposed cells were ranged between 65% and 71%. The phagocytic index was relatively stable, regardless of the TiO<sub>2</sub> concentration (Tab.II).

**Table II.** Cell viability and phagocytic activity of cœlomocytes of earthworms. *Eisenia fetida*. exposed to TiO<sub>2</sub> NP (0, 1, 5, 10 and 25 µg/ml) *in vitro* to three times of exposure (4, 12 and 24 hours) for cytotoxicity assay and 24h for phagocytosis. Results of cell viability (MTT and LDH assay) are expressed as the % of control cells. Different letters showed significant differences (ANOVA; p<0.05)

		TiO <sub>2</sub> concentrations (µg/ml)				
		0	1	5	10	25
MTT assay	4h	100.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	110.4 ± 12.2 <sup>a</sup>	110.3 ± 11.7 <sup>a</sup>	104.1 ± 17.0 <sup>a</sup>	90.9 ± 3.6 <sup>a</sup>
	12h	100.0 ± 18.3 <sup>a</sup>	109.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	115.9 ± 8.8 <sup>a</sup>	106.7 ± 11.1 <sup>a</sup>	90.3 ± 16.5 <sup>a</sup>
	24h	100.0 ± 17.4 <sup>a</sup>	83.6 ± 10.3 <sup>a</sup>	112.4 ± 21.3 <sup>a</sup>	97.9 ± 13.2 <sup>a</sup>	88.9 ± 27.4 <sup>a</sup>
LDH assay	4h	3.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.02 ± 0.04 <sup>ab</sup>	3.04 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.04 <sup>b</sup>
	12h	2.96 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.98 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.99 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.99 ± 0.03 <sup>a</sup>
	24h	2.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.50 ± 0.03 <sup>ab</sup>	2.50 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.51 ± 0.02 <sup>b</sup>
Phagocytic activity (%)	24h	70.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	69.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	68.9 ± 4.9 <sup>a</sup>	65.0 ± 4.9 <sup>a</sup>	66.6 ± 8.4 <sup>a</sup>

### 3.4. GST cDNA identification using degenerate primers

*E. fetida* cDNAs were amplified using primers GST.Fd and GST.Rd. All amplification conditions tested, except the use of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> with a 45°C annealing step, allowed us to obtain amplimers closed to the expected size (309 bp, data not shown). Comparison of *E. fetida* amplimer sequence to those available in GenBank indicated the identification of a GST coding sequence (data not shown), the highest scores being obtained with pi-class GST. This sequence had been deposited in Genbank database (accession number: ACX35463; Fig.7).

```

gcccggaaaagccgcgtacattaagaatcttcccaccccattgycagtaacttgagaaagtctcttgcgaaaataaaggaggccggattctctcgt
t
A G K R A Y I K N L P T Q L A V L E K V L C E N K G G A G F F V
1
ggcgacaagatcagttttggtgactacaccatctttgatctgctggcacaacttgaacatcctctccccctcacaccctggatggggttccggaagct
9
G D K I S F V D Y T I F D L L D N L N I L S P H T L D G L P K L
33
aagycattccatccacgtattgcatcacgtgaaaaaattgccaagcaccggagctaccggatgcctttaagaaaactgccaatc
65
K A F H S R I A S R E K I R K H R A T D A F K K L P I
91

```

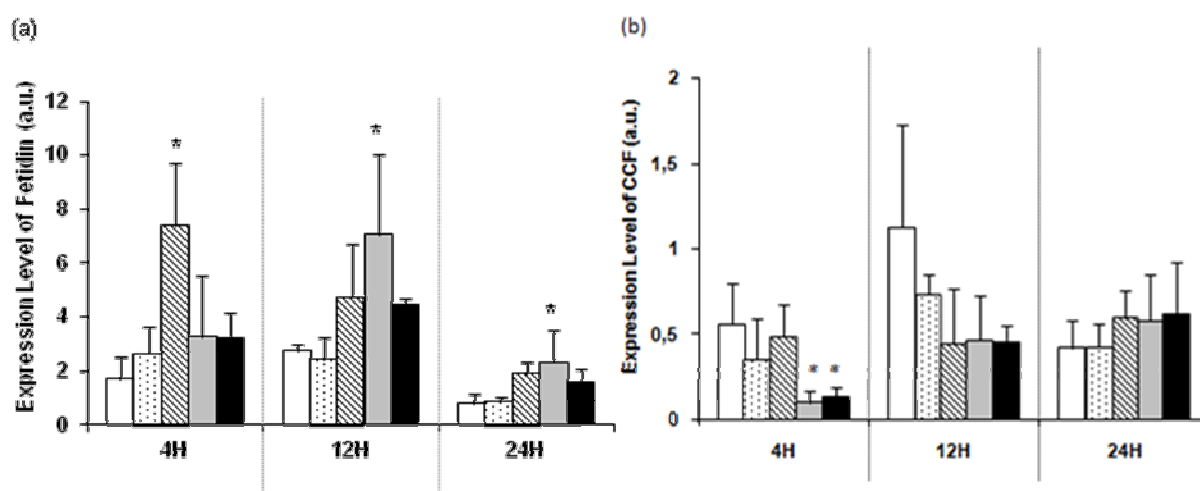
Figure 7. Partial protein and coding sequences of *E. fetida* pi-GST

### 3.5. mRNA expression of immune and detoxification genes

Gene expression was measured after exposure to NP followed by a LPS treatment (500 ng/ml) for 5 hours. This additional incubation was performed to stimulate the innate immune response of cœlomocytes. Expression levels of fetidin and CCF were significantly modified in cœlomocytes exposed to TiO<sub>2</sub>. Concerning fetidin (Fig.8a), a significant increase of mRNA expression was observed at 5 µg/ml after 4 hours of exposure with a level 4.3 fold higher compared to control (ANOVA, p=0.002). Following 12 hours (ANOVA, p=0.02) and 24 hours (ANOVA, p=0.04) of exposure to 10 µg/ml, mRNA level of fetidin were 2.6 and 2.9 fold higher than corresponding control (Fig. 8a). In contrast, a significant decrease of mRNA expression of CCF was noticed at 10 and 25 µg/ml of TiO<sub>2</sub> NP after 4 hours of exposure (ANOVA, p=0.04; Fig.8b). mRNA levels of CCF were respectively, 5.5 and 4.3 fold lower than control for the shortest time of exposure (4h). A similar pattern was observed for 12 hours of exposure but differences were not significant (ANOVA, p=0.08; Fig.8b). After 24 hours of exposure to TiO<sub>2</sub> NP, mRNA level of CCF was relatively stable and no significant variations of expression was observed (ANOVA, p=0.65; Fig.8b).

Concerning detoxification genes, the expression of MT, GST, CAT and SOD was studied on mRNA of cœlomocytes exposed to TiO<sub>2</sub> NP (Fig.9). A significant increase of MT expression was noticed in cœlomocytes exposed 4 hours to 5 µg/ml of TiO<sub>2</sub> NP (ANOVA, p=0.004;

Fig.9a). After 12 hours of exposure to 10 and 25  $\mu\text{g/ml}$  of  $\text{TiO}_2$  NP, the level of MT expression was significantly induced compared to corresponding control (ANOVA,  $p=0.006$ ; Fig.9a). No significant variations of expression was observed for a longer time of exposure (24 hours) (ANOVA,  $p=0.45$ ; Fig.9a). For GST and CAT, the level of mRNA expression was not modified after 4, 12 and 24 hours of exposure to the different concentrations of  $\text{TiO}_2$  NP (Fig.9 b, c). On the other hand, although mRNA expression of SOD tend to increase at the higher concentrations for 4 and 12 hours of exposure, there were no significant variations of expression at any of the three times tested (Fig.9d).



**Figure 8.** Expression levels of Fetidin (a) and CCF (b) mRNA (arbitrary unit) in cœlomocytes of *E. fetida* after 4, 12 and 24 hours of exposure to different concentrations of  $\text{TiO}_2$  NP: 0 as control (white), 1 (points), 5 (hatchings), 10 (grey) and 25  $\mu\text{g/ml}$  (black), followed by a LPS treatment of 500 ng/ml for 5 hours. Asterisk shows significant difference in comparison with the corresponding control (post-hoc Tukey test after ANOVA,  $p<0.05$ )

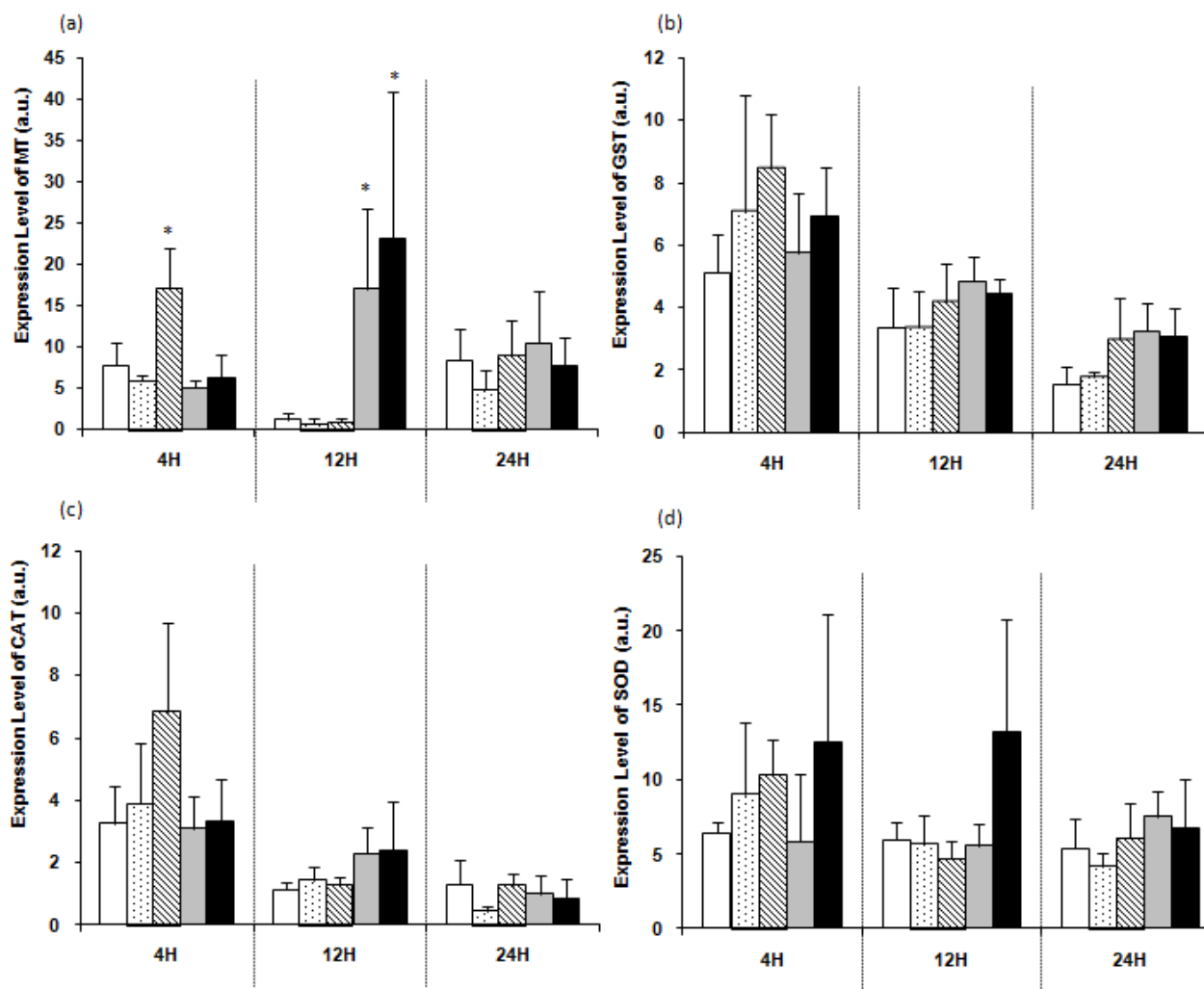


Figure 9. Expression levels of MT (a), GST (b), CAT (c) and SOD (d) mRNA (arbitrary unit) in cœlomocytes of *E. fetida* after 4, 12 and 24 hours of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> NP: 0 as control (white), 1 (points), 5 (hatchings), 10 (grey) and 25 µg/ml (black), followed by a LPS treatment of 500 ng/ml for 5 hours. Asterisk shows significant difference in comparison with the corresponding control (post-hoc Tukey test after ANOVA, p < 0.05)

## 4. Discussion

*In vitro* exposures of *Eisenia fetida* cœlomocytes to TiO<sub>2</sub> nanoparticles were performed to assess their behaviour and potential toxicity, using different biomarkers at molecular and cellular levels. *In vitro* exposures are simplified conditions in which the different parameters may modify the physicochemical characteristics of NP.

In a first approach, it has been determined that the primary particles of TiO<sub>2</sub> ( $41 \pm 27$  nm) form aggregates measuring around 135 nm in biological medium. Cell culture medium is complex and principally composed of salts, amino acids, HEPES, and FBS. Characterization analyses showed that MEM, concentrated in sodium chloride (6.8 g/l), induces an aggregation of NP up to 1200 nm in size, and strong settling after 16h. It is well known that salts, especially NaCl, induce aggregation of colloidal particles and a subsequent increase of the TiO<sub>2</sub> measured hydrodynamic size (Jiang et al. 2009). Due to screening of the surface charges by accumulation of ions with an opposite charge, the Van der Waals attractive force between particles becomes dominant over the electrostatic repulsive force, resulting in an unstable, highly agglomerated dispersion. In our study, the addition of HEPES to MEM, generally used as buffer, did not modify the size and the aggregation state of TiO<sub>2</sub> NP. In contrast, FBS added in the cell culture medium (MEM and HEPES) drastically reduced the size of agglomerates of TiO<sub>2</sub> NP, as generally observed (Murdock et al., 2008; Allouni et al., 2009). It is worth to noting that although the size of nanoparticle aggregates in cell media is documented, the exact properties of the particle surface in agglomerated state remains unknown (Wagner et al., 2007). It can be assumed that adsorption of proteins from the medium on the surface of NP results in high electrostatic repulsion because proteins are polyelectrolytes, or more likely because of steric dispersion. However, FBS present in cell culture medium produces an optimally dispersed and stable suspension of TiO<sub>2</sub> NP.

Because of their essential role in the immunity defence mechanisms of earthworms, cœlomocytes are supposed to react when exposed to TiO<sub>2</sub> NP. Besides, they are easy to collect, which allows the study of numerous experimental conditions. As previously mentioned, cœlomocytes are composed of two main populations of cells, the amœbocyte (hyaline and granular) and the eleocytes also called chloragocytes (Cooper and Stein, 1981). Amœbocytes are involved in immune reactions corresponding to phagocytosis and the encapsulation process, while eleocytes are more involved in the storage of endogenous



substances such as lipids, glycogen or bactericidal proteins (Cooper and Roch, 2003). TEM observations reveal that cœlomocytes showing accumulation of TiO<sub>2</sub> were mainly amœbocytes. Whatever the duration of exposure, intracellular accumulation of TiO<sub>2</sub> NP aggregates in cœlomocytes was observed. After 4 hours, TiO<sub>2</sub> NP seems to be present in lysosomes or free inside the cytoplasm. Large and small aggregates were included in granulations corresponding to lysosomes, or entrapped in large vesicles corresponding to phagosomes after 12 and 24 hours of exposure. Endocytosis processes seem to be implied in the penetration process of NP into cells. The first is a phagocytic mechanism concerning TiO<sub>2</sub> particles of 0.1 to 10 µm in size. This process is activated after interaction of ingested particles with specific receptors. It can be hypothesised that NP use receptors devoted to the uptake of large proteins (Simon-Deckers et al., 2008). The second way of uptake of these particles is receptor-mediated endocytosis whose three principal types are: clathrin-mediated endocytosis (< 200 nm), caveolae-mediated endocytosis (200 nm - 1 µm) and macropinocytosis (> 1 µm). Endocytosis leads to the formation of lysosomes containing NP. According to Rejman et al. (2004), the size of particles can determine the pathway of entry. Due to their size, aggregates of TiO<sub>2</sub> NP (100 - 400 nm) certainly enter into the cells via clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis or macropinocytosis as membrane ruffling was observed in some cases. Most of the studies suggest the same uptake route for TiO<sub>2</sub> NP in mammalian cells (Singh et al., 2007; Simon-Deckers et al., 2008; Barillet et al., 2010; Hussain et al., 2009; Thurn et al., 2011). Nanoparticles free in cytoplasm were small (cluster of 3- 4 NP) and were only present at the shortest time of exposure. Multiple uptake mechanisms could co-exist and result in the entrapment of free nanoparticles in large cytoplasmic vesicles (Barillet et al., 2010). On our TEM observations, TiO<sub>2</sub> NP were never observed in mitochondria, nucleus or Golgi apparatus. Nevertheless we can not conclude that NP do not enter these structures, since TEM is a qualitative tool which allows only to observe a limited number of cells.

As NP could interfere with toxicological assay, it is recommended to evaluate cytotoxicity of NP with at least two different assays (Monteiro-Riviere et al., 2009; Stone et al., 2009). In our study, the two assays performed, MTT and LDH, showed that TiO<sub>2</sub> NP did not affect cell viability of cœlomocytes. Even if TiO<sub>2</sub> NP are efficiently internalized in cells, no damage on cell membrane or disruption of mitochondrial function was observed. The lack of effect on membrane integrity could be explained by the nanometric size of TiO<sub>2</sub> particles, whereas

larger particles (micrometric) induce more heavy morphological changes than nano-sized particles (Park et al., 2007). Studies of the effect of NP on invertebrate cell viability are still poorly documented in contrast to mammal cells. A significant increase of LDH release was observed in mouse fibroblasts exposed 48h to 600  $\mu\text{g/ml}$  of  $\text{TiO}_2$  NP (Jin et al., 2008). This study showed a drastic decrease of cell viability starting from 6  $\mu\text{g/ml}$  after 48 h of exposure with MTT assay. These results confirmed that MTT assay is more sensitive compared to the LDH leakage (Fotakis and Timbrell, 2006). Simon-Deckers et al. (2008) have measured a cell death rate of 24% for  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) with MTT assay after 48 h of human cells (A549 pneumocytes) exposed to 100  $\mu\text{g/ml}$  of NP. Their study also showed that cell death increased with duration of exposure with a cytotoxicity reaching 50% when cells were exposed to 50  $\mu\text{g/ml}$  of  $\text{TiO}_2$ -P25 during 72h. In our study, as time of exposure was shorter ( $\leq 24$  hours), concentrations tested were lower and  $\text{TiO}_2$  NP was not detected in mitochondria by TEM, therefore no cytotoxicity was observed.

The phagocytosis assay was designed to investigate the efficiency of cœlomocytes in assimilating 2  $\mu\text{m}$  latex particles after being exposed to different concentrations of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles for 24 h.  $\text{TiO}_2$  aggregates observed by TEM in large vesicles suggest that particles were internalized by phagocytosis as any other foreign material. This primary phenomenon did not overload the phagocytic capacity of cœlomocytes because no modifications were measured compared to control cells. To our knowledge, few studies have evaluated the toxicity of  $\text{TiO}_2$  NP on phagocytosis. A decrease of macrophage phagocytic ability after only 8h of exposure to 0.78  $\mu\text{g/mm}^2$  of  $\text{TiO}_2$  ultrafine particles (29 nm) or fine particles (250 nm) has been reported in mouse (Renwick et al., 2001). These results are in contradiction with our results showing no impairment of cœlomocyte phagocytic activity. Nevertheless, our previous study showed decrease of cœlomocyte phagocytic activity from earthworm exposed to different particles called  $\text{TiO}_2$  byproducts (Bigorgne et al., 2011). Although these byproducts are composed of a core of  $\text{TiO}_2$  NP, they are coated with a layer of aluminum. It could be suggested that the absence of effect is due to physico-chemical properties of  $\text{TiO}_2$  NP of our study, which are different from  $\text{TiO}_2$  byproducts.

Although phagocytosis was not affected by  $\text{TiO}_2$  NP, modifications of immune gene mRNA expression were noticed. CCF mRNA level expression was reduced at 10 and 25  $\mu\text{g/ml}$  after 4 hours. No variations of CCF expression were observed after 12 and 24 hours. CCF is a protein pattern recognition located in chloragocytes (Bilej et al., 1998), implied in the

prophenoloxidase-activating system (pro-PO) which is an important invertebrate defence mechanism of humoral immunity (Bilej et al., 2000). As CCF binds specifically the O-antigen of LPS (Beschlin et al., 1998), coelomocytes were exposed to LPS after TiO<sub>2</sub> NP to stimulate immune reactions. After recognizing the bacteria cell wall component, CCF can trigger the activation of the pro-PO cascade. Melanin, the final product of pro-PO system, has antibacterial, cytolytic, opsonizing, and hemolytic properties (Cerenius and Söderhäll, 2004). Interactions between TiO<sub>2</sub> NP and bacteria could modify recognition of LPS, as mRNA expression of CCF is reduced after 4 hours of exposure to the two higher concentrations of TiO<sub>2</sub> NP tested. Even if this impairment is not maintained with the exposure time, it could decrease the melanization process. So, the Pro-PO cascade seems to be affected by TiO<sub>2</sub> NP after 4 hours, without effect on longer time. Fetidins are cytolytic proteins, secreted by chloragocytes and implied in several immune reactions (Bilej et al., 2000; Cooper and Roch, 2003). Peroxidase activity is responsible for the bactericidal properties of fetidins (Lassegues et al., 1997). In our study, after 4, 12 and 24h of exposure to TiO<sub>2</sub> NP, mRNA expression of fetidin was induced at 5, 10 and 10 µg/ml, respectively. The induced production of fetidins by TiO<sub>2</sub> NP reveals an activation of the immune response related to the secretion of bactericidal proteins. These results highlight the fact that immune response was affected at the molecular level by TiO<sub>2</sub> NP inducing an inappropriate response to LPS stimulation.

The response of immune genes to TiO<sub>2</sub> NP and the detection of these particles in lysosomes suggest an activation of the detoxification system. Coelomocytes exposure was performed in the dark, so SOD, CAT and GST gene expression was not impaired by the photocatalytic effect of TiO<sub>2</sub> NP. Only metallothionein mRNA were induced at 5 µg/ml at 4 hours, 10 and 25 µg/ml after 12 hours of exposure. Metallothioneins are metal-inducible proteins implied in metal homeostasis, sequestration and detoxification, and they have been found in coelomocytes (Dallinger et al., 1997; Brulle et al., 2006). TiO<sub>2</sub> NP effects on detoxification genes have been previously studied. An induction of MT and SOD transcript expression was observed in gut tissues of earthworm, *E. fetida*, exposed 24 h to 10 mg/l of TiO<sub>2</sub> byproducts (Bigorgne et al., 2011). In contrast, the exposure of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, to 1 mg/l of TiO<sub>2</sub> NP (7 - 20 nm) did not modify MT, SOD and GST mRNA expression after 24 hours (Roh et al., 2010). Results obtained with pulmonary cells exposed to TiO<sub>2</sub> NP show an increase of CAT, GST, heme oxygenase-1 expression after only 3 hours (Park et al., 2008). These authors observed that the induction of the oxidative stress-related gene, heme

oxygnase-1, decreased between 3 and 24 h to reach the control level. Cui et al. (2010) observed a decrease of MT, GST, SOD and CAT mRNA in mice exposed 60 days to TiO<sub>2</sub> NP (10 and 50 mg/kg). These results suggest that metallothioneins and other detoxification genes could have a hormetic response to TiO<sub>2</sub> NP stress, with an induction followed by a decrease when the antioxidant system is overwhelmed. In our study, expression of SOD, CAT and GST mRNA tend to increase with exposure to TiO<sub>2</sub> NP in the dark, without any significant variation. Oxidative stress generated by TiO<sub>2</sub> NP was certainly not sufficient to strongly induce the antioxidant system of the cœlomocytes, even if TiO<sub>2</sub> NP can produce ROS and oxidative damages without photoactivation (Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006; Reeves et al., 2008).

#### **4. Conclusion**

This study gives new insight into physico-chemical, cellular and molecular aspects of exposure of *Eisenia fetida* cœlomocytes to TiO<sub>2</sub> NP. The FBS contained in the culture medium induces optimal dispersion of the NP, so the cœlomocytes are exposed to individual particles or small aggregates. The observations show that TiO<sub>2</sub>-NP are certainly internalized by cœlomocytes by endocytosis without significant modifications of the cell structure. No cell toxicity of TiO<sub>2</sub> NP was observed but the mRNA expression of immune proteins and MT is modified. This *in vitro* study reveals that immune genes involved in defence mechanism appear to be very sensitive to TiO<sub>2</sub> NP exposure. Although TiO<sub>2</sub> NP were absorbed by cœlomocytes, oxidative stress of these particles was not proven since antioxidant system was not induced.

#### **Acknowledgments**

We would like to thank Elizabeth Petit and Nelly Brulé for their technical assistance and Jaafar Ghanbaja (SCMEM) for the TEM analyses. Many thanks to Sharon Kruger for the final read of the English version. Emilie Bigorgne has a fellowship from ADEME and Region Lorraine. This study was supported by FR-EST (Fédération de Recherche Eau-Sol-Terre).

## References

- Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Res* 40(19):3527-3532. doi: 10.1016/j.watres.2006.08.004
- Allouni ZE, Cimpan MR, Høl PJ, Skodvin T, Gjerdet NR (2009) Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. *Colloids Surf B* 68(1):83-87. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.014
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Asensio V, Kille P, Morgan AJ, Soto M, Marigomez I (2007) Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *Eur Journal Soil Biol* 43(S1):S233-S238. doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.022
- Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Mayne-L'Hermite M, Reynaud C, Cassio D, Gouget B, Carriere M (2010) Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an *in vitro* study. *J Nanopart Res* 12(1):61-73. doi: 10.1007/s11051-009-9694-y
- Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H, Brys L, Gomez J, De Baetselier P, Timmermans M (1998) Identification and Cloning of a Glucan- and Lipopolysaccharidebinding Protein from *Eisenia foetida* Earthworm Involved in the Activation of Prophenoloxidase Cascade. *J Biol Chem* 273(38):24948-24954. doi: 10.1074/jbc.273.38.24948
- Beschin A, De Baetselier P, Bilej M (2002) CCF, an invertebrate analogue of TNF, is not related to the other lytic components from *Eisenia foetida* earthworm. *Bioessays* 24(10):974-974. doi: 10.1002/bies.10148
- Bigorgne E, Foucaud L, Lapied E, Labille J, Botta C, Sirguy C, Falla J, Rose J, Joner EJ, Rodius F, Nahmani J (2011) Ecotoxicological assessment of TiO<sub>2</sub> byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Pollut* 159(10):2698-2705. doi: 10.1016/j.envpol.2011.05.024

- Bilej M, De Baetselier P, Beschin A (2000) Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol* 45(10):283-300. doi: 10.1007/BF02817549
- Bilej M, Rossmann P, Sinkora M, Hanuová R, Beschin A, Raes G, De Baetselier P (1998) Cellular expression of the cytolytic factor in earthworms *Eisenia foetida*. *Immunol Lett* 60(1):23-29. doi: 10.1016/S0165-2478(97)00127-2
- Braydich-Stolle LK, Schaeublin NM, Murdock RC, Jiang J, Biswas P, Schlager JJ, Hussain SM (2008) Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub> nanotoxicity. *J Nanopart Res* 11(6):1361-1374. doi: 10.1007/s11051-008-9523-8
- Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Fournier M (1999) *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Brulle F, Cocquerelle C, Wamalah AN, Morgan AJ, Kille P, Leprêtre A, Vandebulcke F (2008) cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 71(1):47-55. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.032
- Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, Vieau D, Lemièrre S, Leprêtre A, Vandebulcke F (2006) Cloning and Real-time PCR Testing of 14 Potential Biomarkers in *Eisenia fetida* Following cadmium Exposure. *Environ Sci Technol* 40(8):2844-2850. doi: 10.1021/es052299x
- Brulle F, Mitta G, Leroux R, Lemièrre S, Leprêtre A, Vandebulcke F (2007) The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 144(4):334-341. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.10.007
- Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G (2010) *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat Toxicol* 96(2):151-158. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.10.017
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942.
- Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198(1):116-126. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x

Cooper EL (2002) The earthworm: a new model with biomedical applications In: A New Model for Analysing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications, pp. 3-26.

Cooper EL, Roch P (2003) Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* 47(5-6):676-688. doi: 10.1078/0031-4056-00245

Cooper EL, Stein EA (1981) Oligochaete, in: N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley (Eds.). *Invertebrate Blood Cells*, Academic Press London, pp. 75-140.

Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, Hong M, Zhou M, Wang L, Wang H, Hong F (2010) Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater* 183(1-3):874-880. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.07.109

Dallinger R (1996) Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp Biochem Phys C* 113(2):125-133. doi: 10.1016/0742-8413(95)02078-0

Eyambe GE, Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables BJ, Cooper EL (1991) A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab Anim* 25(1):61-67. doi: 10.1258/002367791780808095

Federici G, Shaw BJ, Handy RD (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 84(4):415-430. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009

Fotakis G, Timbrell JA (2006) *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160(2) 171-177. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001

Foucaud L, Wilson MR, Brown DM, Stone V (2007) Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett* 174(1-3):1-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.08.001

Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P (2000) Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am Zoo* 40:412-420. doi: 10.1093/icb/40.3.412

French RA, Jacobson AR, Kim B, Isley SL, Penn LR, Baveye PC (2009) Influence of Ionic Strength, pH, and Cation valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Env Sci Technol* 43(5):1354-1359. doi: 10.1021/es802628n

Goven AJ, Venables BJ, Fitzpatrick LC (2005) Earthworms as Ecosentinels for Chemical-Induced Immunotoxicity. *Investigative Immunotoxicology*: Edited by Tryphonas H. Fournier M. Blakley B.R., Smits J.E.G. and Brousseau P. 7, pp 106-119.

Gurr J-R, Wang ASS, Chen C-H, Jan K-Y (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.007

Hu CW, Li M, Cui YB, Li DS, Chen J, Yang LY (2010) Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem* 42(4):586-591. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.12.007

Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LCJ, Martens JA, Billon-Galland MA Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon J-C, Marano F (2009) Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 260(1-3):142-149. doi: 10.1016/j.tox.2009.04.001

Jang HD, Kim S-K, Kim S-J (2001) Effect of Particle Size and Phase Composition of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Photocatalytic Properties. *J Nanopart Res* 3(2-3):141-147. doi: 10.1023/A:1017948330363

Jemec A, Drobne D, Remskar M, Sepcic K, Tisler T (2008) Effects of ingested Nano-sized Titanium Dioxide on Terrestrial isopods (*Porcellio scaber*) *Environ Toxicol Chem* 27(9):1904-1914. DOI: 10.1897/08-036.1

Jiang J, Oberdörster G, Biswas P (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 11: 77-89. doi: 10.1007/s11051-008-9446-4

Jin C-Y, Zhu B-S, Wang X-F, Lu Q-H (2008) Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chem Res Toxicol* 21:1871-1877. doi: 10.1021/tx800179f



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

Köhlerová P, Beschin A, Silerová M, De Baetselier P, Bilej M (2004) Effect of experimental microbial challenge on the expression of defense molecules in *Eisenia fetida* earthworm. *Dev Comp Immunol* 28(7-8):701-711. doi: 10.1016/j.dci.2004.01.001

Lapied E, Moudilou E, Exbrayat J-M, Oughton DH, Joner EJ (2010) Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine* 5(6):975-984. doi:10.2217/nnm.10.58

Lassegues M, Milochau A, Doignon F, DuPasquier L, Valembois P (1997) Sequence and expression of an *Eisenia-fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *Eur J Biochem* 246(3):756-762. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00756.x

Liu X, Sun Z, Chong W, Sun Z, He C (2009) Growth and stress responses of the earthworm *Eisenia fetida* to *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial soil. *Microb Pathog* 46(5):266-272. doi: 10.1016/j.micpath.2009.02.001

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25(4):402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Maleri RA, Fourie F, Reinecke AJ, Reinecke SA (2008) Photometric application of the MTT- and NRR-assays as biomarkers for the evaluation of cytotoxicity *ex vivo* in *Eisenia andrei*. *Soil Biol Biochem* 40(5):1040-1048. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.11.024

Mandzy N, Grulke E, Druffel T (2005) Breakage of TiO<sub>2</sub> agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technol* 160(2):121-126. doi: 10.1016/j.powtec.2005.08.020

Massicotte R, Robidoux PY, Sauvé S, Flipo D, Mathiot A, Fournier M, Trottier B (2004) Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicol Environ Saf* 59(1):10-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.05.003

Milochau A, Lassègues M, Valembois P (1997) Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida*

*andrei*. Biochim Biophys Acta - Protein Struct M 1337(1):123-132. doi: 10.1016/S0167-4838(96)00160-4

Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells *in vitro*: the role of surface area. Occup Environ Med 64(9):609-615. doi: 10.1136/oem.2005.024802

Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW (2009) Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. Toxicol Appl Pharmacol 234(2):222-235. doi: 10.1016/j.taap.2008.09.030

Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM (2008) Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *In Vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. Toxicol Sci 101(2):239-253. doi: 10.1093/toxsci/kfm240

Oberdörster G, Stone V, Donaldson K (2007) Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. Nanotoxicology 1: 2-25. doi: 10.1080/17435390701314761

Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicol Lett 180(3):222-229. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.06.869

Pagnout C., Jomini S., Dadhwal M., Caillet C., Thomas F., Bauda P. Role of Electrostatic Interactions in the Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles toward Bacteria. Submitted to Environmental Science & Technology

Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn E-K, Lim Y, Lee K-H (2007) Cellular Toxicity of Various Inhalable Metal Nanoparticles on Human Alveolar Epithelial Cells. Inhalation Toxicol 19(S1):59-65. doi: 10.1080/08958370701493282

Procházková P, Silerová M, Felsberg J, Josková R, Beschin A, De Baetselier P, Bilej M (2006) Relationship between hemolytic molecules in *Eisenia fetida* earthworms. Dev Comp Immunol 30(4): 381-392. doi: 10.1016/j.dci.2005.06.014

R, Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss D, Schiffmann D (2002) Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* 110(8):797-800. doi: [org/10.1289/ehp.02110797](https://doi.org/10.1289/ehp.02110797)

Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF, Jha AN (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res- Fund Mol M* 640(1-2):113-122. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010)

Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 377(1):159-169. doi: [10.1042/BJ20031253](https://doi.org/10.1042/BJ20031253)

Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001) Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 172(2):119-127. doi: [10.1006/taap.2001.9128](https://doi.org/10.1006/taap.2001.9128)

Roh J-Y, Park Y-K, Park K, Choi J (2010) Ecotoxicological investigation of CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environ Toxicol Pharmacol* 29(2):167-172. doi: [10.1016/j.etap.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003)

Sauvé S, Fournier M (2005) Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf* 60(1):67-72. doi: [10.1016/j.ecoenv.2003.12.022](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.022)

Sauvé S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M (2002) Phagocytic Response of Terrestrial and Aquatic Invertebrates Following *in Vitro* Exposure to Trace Elements. *Ecotoxicol Environ Saf* 52(1): 21-29. doi: [10.1006/eesa.2001.2125](https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2125)

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL (2006) Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicol Sci* 92(1):174-185. doi: [10.1093/toxsci/kfj197](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj197)

Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M (2008) *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253(1-3):137-146. doi: 10.1016/j.tox.2008.09.007

Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJA, Schins RPF (2007) Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(2):141-151. doi: 10.1016/j.taap.2007.05.001

Stone V, Johnston H, Schins RPF (2009) Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol* 39(7):613-626. doi:10.1080/10408440903120975

Thurn KT, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown EMB, Doty C, Kremer J, Woloschak G (2011) Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7(2):123-130. doi: 10.1016/j.nano.2010.09.004

Ville P, Roch P, Cooper EL, Narbonne J-F (1997) Immuno-modulator effects of PCBs, carbaryl and 2,4 D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol* 32(2):291-297. doi: 10.1016/S0145-305X(97)88569-2

Wagner AJ, Bleckmann CA, Murdock RC, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM (2007) Cellular Interaction of Different Forms of Aluminum Nanoparticles in Rat Alveolar Macrophages. *J Phys Chem B* 111(25): 7353-7359. doi: 10.1021/jp068938n

Wang JJ, Sanderson BJS, Wang H (2007) Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res-Gen Tox En* 628(2): 99-106. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.12.003

## Bilan

Le sérum de veau fœtal présent dans le milieu de culture a permis d'exposer les cœlomocytes à une suspension de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> stable et dispersée pendant 24 heures. Bien que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> soient internalisées par endocytose par les cœlomocytes, elles n'ont pas altéré la structure et la viabilité des cellules.

Une modification de la réponse du système immunitaire a été mesurée avec l'induction des fétidines et la diminution de l'expression du CCF. La métallothionéine apparaît comme un biomarqueur sensible à la présence de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> puisque son expression est rapidement induite aux plus fortes concentrations. En revanche, les nanoparticules ne semblent pas avoir produit d'ERO puisque les systèmes antioxydants n'ont pas été modifiés.

Cette étude montre que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sont capables d'être internalisées et de modifier les réponses du système immunitaire et de détoxification dans le cadre d'un test *in vitro*. Ces travaux au niveau cellulaire sont à compléter par des études sur des organismes entiers afin d'évaluer non seulement l'écotoxicité des nanoparticules elles-mêmes, mais aussi celle de nanomatériaux (résidus ou les sous produits d'altération) susceptibles d'être plus fréquemment introduits dans l'environnement et en contact avec les organismes du sol.

## 2. Evaluation de la toxicité des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> en milieu liquide sur le ver terre, *Eisenia fetida*

### Avant propos

Les premiers résultats obtenus sur les cœlomocytes de vers de terre, montrent que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sont capables de modifier la réponse du système immunitaire et de détoxification (Bigorgne et al., submitted to Journal of Nanoparticle Research). Cependant, très peu d'études concernant la toxicité des sous produits d'altération, appelés également « byproducts », ont été réalisées. Dans le cadre de nos travaux, le nanocomposé étudié est à base de TiO<sub>2</sub> rutilé (T-lite<sup>TM</sup> SF, BASF, Germany) et utilisé dans la formulation des crèmes solaires. Une altération artificielle de ce nanocomposé a été réalisée pour mimer la dégradation des nanomatériaux dans l'environnement. Les sous produits d'altérations obtenus sont alors composés d'un noyau de dioxyde de titane enrobé d'une couche de d'aluminium. Une exposition courte (24h) en milieu liquide a été réalisée dans des conditions artificielles afin de contrôler le comportement des SPA de TiO<sub>2</sub> et de favoriser la biodisponibilité ainsi que les contacts entre les particules et le ver, *Eisenia fetida*.

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer le comportement des sous produits d'altération (SPA) de dioxyde de titane et leur potentielle toxicité en utilisant une batterie de biomarqueurs à différentes échelles biologiques.



## Ecotoxicological assessment of TiO<sub>2</sub> byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*

Emilie Bigorgne<sup>a,\*</sup>, Laurent Foucaud<sup>a</sup>, Emmanuel Lapied<sup>b</sup>, Jérôme Labille<sup>c,d</sup>, Céline Botta<sup>c,d</sup>, Catherine Sirguy<sup>e</sup>, Jaïro Falla<sup>a</sup>, Jérôme Rose<sup>c,d</sup>, Erik J. Joner<sup>e</sup>, François Rodius<sup>a</sup>, Johanne Nahmani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Interactions Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes, Université Paul Verlaine – Metz, CNRS UMR 7146, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

<sup>b</sup> Bioforsk, Soil and Environment, Fredrik A. Dahls vei 20, N-1432 Aas, Norway

<sup>c</sup> CEREGE UMR 6635 CNRS/Aix-Marseille Université, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France

<sup>d</sup> International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology iCEINT, Europole de l'Arbois, 13545 Aix en Provence, France

<sup>e</sup> Nancy Université, INPL/INRA, UMR 1120, Laboratoire Sols et Environnement, BP 172-2, Avenue de la forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 January 2011

Received in revised form

6 May 2011

Accepted 21 May 2011

#### Keywords:

Nanocomposite

TiO<sub>2</sub> byproducts

Earthworm

Biomarker

### ABSTRACT

The increasing production of nanomaterials will in turn increase the release of nanosized byproducts to the environment. The aim of this study was to evaluate the behaviour, uptake and ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> byproducts in the earthworm *Eisenia fetida*. Worms were exposed to suspensions containing 0.1, 1 and 10 mg/L of byproducts for 24 h. Size of TiO<sub>2</sub> byproducts showed aggregation of particles up to 700 μm with laser diffraction. Only worms exposed at 10 mg/L showed bioaccumulation of titanium (ICP-AES), increasing expression of metallothionein and superoxide dismutase mRNA (Real-time PCR) and induction of apoptotic activity (Apostain and TUNEL). TiO<sub>2</sub> byproducts did not induce cytotoxicity on cœlomocytes, but a significant decrease of phagocytosis was observed starting from 0.1 mg/L. In conclusion, bioaccumulation of byproducts and their production of reactive oxygen species could be responsible for the alteration of the antioxidant system in worms.

Crown Copyright © 2011 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Engineered nanomaterials are produced in large amounts and employed in an ever increasing range of applications due to their novel physico-chemical properties (Masciangioli and Zhang, 2003). Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles are one of the most commonly used in commercial products such as UV filter in cosmetics, self cleaning glasses, food packaging, paint or wastewater treatments (Bae and Tak, 2005; Aitken et al., 2006). According to the classification of Hansen et al. (2007), TiO<sub>2</sub> nanocomposites incorporated in sunscreens or paints enter into a particular category of high environmental mobility where free nanoparticles are suspended in a liquid. The production, use and wastes of nanomaterials lead to the release of pristine nanomaterials, as well as their aged and transformed byproducts into

the environment. For TiO<sub>2</sub> nanocomposites in sunscreens, an important route is washing off during swimming and through showering where the nanomaterials end up in wastewaters and sewage sludge (Botta et al., 2011; Johnson et al., 2011). Recently, quantities of TiO<sub>2</sub> engineered nanoparticles released into the environment have been modelling (Mueller and Nowack, 2008; Gottschalk et al., 2009). TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles used in sunscreens consist of a TiO<sub>2</sub> core coated with magnesium, silica, alumina or zirconium to eliminate UV reactivity (Wakefield et al., 2004; Pan et al., 2009). The nanocomposite tested in this study is also used in sunscreens and it consists of a TiO<sub>2</sub> core with a shell of Al(OH)<sub>3</sub> to inhibit photocatalytic properties, and a coating of an organic polymers like polydimethyl siloxane (PDMS). Most of the organic coating is rapidly lost from the mineral core/shell component during weathering and other alteration processes, whereas the Al(OH)<sub>3</sub> shell is more resistant (Auffan et al., 2010; Labille et al., 2010). With such a remaining Al(OH)<sub>3</sub> coating, no superoxide ions are produced from the photoactive/phototoxic TiO<sub>2</sub> core. These byproducts are thus a pertinent material to study with respect to environmental fate, ecotoxicological effects of TiO<sub>2</sub>-based nanomaterials in sunscreens (Auffan et al., 2010; Labille et al., 2010). Ecotoxicity of pristine TiO<sub>2</sub> nanoparticles has been studied, especially on aquatic organisms (Federici et al., 2007; Blaise et al., 2008; Aruoja et al., 2009; Canesi et al., 2010), though their effects in terrestrial ecosystem have received less attention (Hu et al., 2010).

**Abbreviation:** BSA, bovine serum albumin; FBS, fetal bovine serum; GGE, guaiaacol glyceryl ether; ICP-AES, inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry; LBSS, lumbricus balanced salt solution; MEM, minimum essential medium; MT, metallothionein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate buffered saline; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TUNEL, terminal transferase dUTP nick end labelling.

\* Corresponding author.

E-mail address: [emilie.bigorgne@univ-metz.fr](mailto:emilie.bigorgne@univ-metz.fr) (E. Bigorgne).

Earthworms play a key role for soil functioning, and are therefore used extensively in terrestrial ecotoxicity studies. Thus, the toxicity of metals (Reinecke et al., 2001; Spurgeon et al., 2004; Nahmani et al., 2007; Bigorgne et al., 2010), pesticides (Xiao et al., 2006; Garcia et al., 2008), polycyclic aromatic hydrocarbons (Eom et al., 2007; Qiao et al., 2007) and other environmental pollutants to earthworms are well known, but a similar examination of the effects of nanomaterials on earthworm are only starting to appear (Oughton et al., 2008; Scott-Fordsmand et al., 2008; Hu et al., 2010; Unrine et al., 2010a,b; van der Ploeg et al., 2011).

TiO<sub>2</sub> nanoparticles may induce oxidative stress due to their photocatalytic properties (Almquist and Biswas, 2002). Antioxidant systems, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferases and metallothioneins (MT) protect organisms from reactive oxygen species (ROS) and their mRNA expression level may be used as a biomarker for toxicity (Spurgeon et al., 2004; Asensio et al., 2007; Brulle et al., 2007, 2008). At a cellular level, other immunological biomarkers are well developed on earthworms, such as cœlomocytes phagocytosis (Ville et al., 1995; Fournier et al., 2000) and cell viability (Eyambe et al., 1991). Apoptosis, or programmed cell death, which at low rates is a normal phenomenon in multicellular organisms and that plays a key role in their immune response (Pulido and Parrish, 2003) may be also assessed quantitatively and used as a sensitive ecotoxicological endpoint, even for sublethal effects of engineered nanoparticles (Lapied et al., 2010).

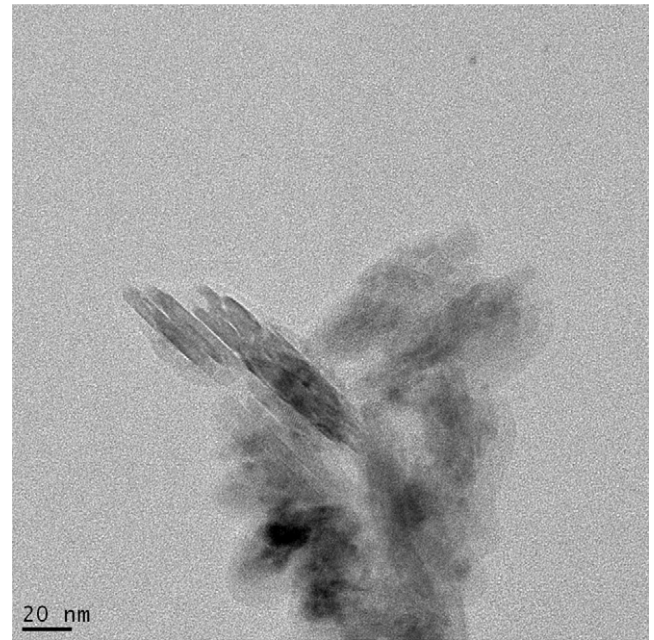
In this paper, which constitutes a preliminary step of ecotoxicological risk assessment, we aim to evaluate the potential effects of TiO<sub>2</sub> byproducts for earthworms, enhancing their bioavailability and contact with *Eisenia fetida*. That's why this first experiment was done using a liquid medium to simulate the worst case of exposure. Next step will be to compare these effects to those obtained during more ecologically relevant exposure in soil medium, and will permit to assess the role of abiotic factors on byproducts availability and toxicity.

Thus, the aims of the present paper were to evaluate the behaviour of TiO<sub>2</sub> byproducts and their potential acute toxicity after only 24 h of exposure. This was assessed by measuring: 1) any changes in the size of TiO<sub>2</sub> byproducts during exposure in a liquid medium; 2) the potential bioaccumulation of aluminium and titanium in earthworm tissues; 3) a battery of earthworm biomarkers, including mRNA expression of detoxification genes, frequency of apoptosis in different cell type, and immunotoxicity using cell viability and phagocytic activity of cœlomocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Nanocomposite alteration and suspension characterization

We used a commercially available nanocomposite (T-lite™ SF, BASF, Germany) which is commonly used in cosmetic creams as UV blockers. T-lite™ SF is composed of a TiO<sub>2</sub> core (14–16 nm) coated with a layer of aluminium hydroxide [Al(OH)<sub>3</sub>] and a second layer of polydimethyl siloxane (PDMS). According to the manufacturer, the TiO<sub>2</sub> crystallites used in T-lite™ SF are nano-rutile rods of 50 nm length per 10 nm width. In order to simulate the alteration that this nanocomposite is bound to undergo in contact with environmental matrices, an accelerated ageing process was performed (Labille et al., 2010). This alteration process consists in mixing 100 mg of nanocomposite (T-lite) in 250 mL of ultrapure water. The mixture was submitted to magnetic stirring at 690 rpm under a white light (400 W Philips® 114 Master HPI-T Plus) during 48 h. After alteration, this mixture was settled for 48 h and the supernatant of stable TiO<sub>2</sub> altered nanocomposites, called byproducts, was used for the tests. This alteration process removed most of the PDMS layer (Auffan et al., 2010) and produced stable suspensions of TiO<sub>2</sub> byproducts. The observation of these byproducts with TEM reveals that sticks of nano-TiO<sub>2</sub> are embedded in an amorphous layer of Al(OH)<sub>3</sub> (Fig. 1). The quantity of TiO<sub>2</sub> byproducts was measured by filtering an aliquot of suspension (20 mL) through a 25 nm membrane filter and drying filter at 105 °C for 24 h. The concentration measured was 100 mg/L TiO<sub>2</sub> byproducts. ICP-AES measurement showed that byproducts suspension (100 mg/L)



**Fig. 1.** TEM image of TiO<sub>2</sub> byproducts recovered just after the 48 h alteration process of nanocomposite (T-lite™ SF, BASF, Germany).

contains  $3.5 \pm 0.3$  mg Al/L and  $53.6 \pm 5.6$  mg Ti/L. The size distribution of TiO<sub>2</sub> byproducts ranged from 100 to 700 nm (Labille et al., 2010).

After shaking TiO<sub>2</sub> byproducts, this suspension was diluted 10, 100 and 1000 times referred to as 10, 1 and 0.1 mg/L using a 1:1 (v/v) mixture of mineral water and ultrapure water (later referred to as "the medium"). A low concentration of mineral salts was provided in order to avoid that worms suffered from osmotic stress. The mineral water contained (nominal value in mg/L): Ca: 80; Mg: 26; Na: 6.5; K: 1; Si: 15; CO<sub>3</sub>: 360; SO<sub>4</sub>: 12.6; Cl: 6.8; NO<sub>3</sub>: 3.7. The pH of the medium measured before exposure was  $7.66 \pm 0.17$ . All experiments included a control treatment containing only the medium. Laser diffraction (Malvern Mastersizer S, Malvern Instruments, UK; range: 50 nm to 900 μm) was used to measure the size distribution of TiO<sub>2</sub> byproducts in the medium after 20 s, 10 min, 2 h and 10 h exposure to worms.

Turbidity measurements were used to determine limit conditions for colloidal stability of TiO<sub>2</sub> byproducts dispersion as a function of its concentration. The suspension (100 mg/L) was diluted to obtain suspension from 0.1 to 10 mg/L in the mixture of ultrapure water and mineral water (1:1; v/v), and left 24 h in the dark to allow settling of particles. The supernatant turbidity was measured using a Hach 2100AN turbidimeter.

### 2.2. Earthworm exposure

Healthy, immature (without clitellum) earthworms (*E. fetida*) of similar size ( $265 \pm 40$  mg) were selected from the breeding stocks of our laboratory, washed with deionised water and maintained for 48 h at 20 °C in Petri dishes containing moist Whatman No. 1 filter paper to clear their gut of soil residues. Filters were changed three times per day to prevent coprophagy. Following depuration, groups of 6 worms were introduced in glass petri dishes (experiment unit) containing TiO<sub>2</sub> byproducts (0.1, 1 or 10 mg/L) freshly prepared or only mixture of water (control treatment) for a period of 24 h. Suspension of TiO<sub>2</sub> byproducts was resuspended three times during the exposure. Bioaccumulation and immune cells analyses were examined with 5 and 4 replicates per treatment respectively, while for mRNA expression of detoxification genes and apoptosis, 3 replicates per treatment were used.

After 24 h of exposure to the different concentrations (0.1, 1 and 10 mg/L) of TiO<sub>2</sub> byproducts, all worms were alive.

### 2.3. Bioaccumulation measurements

After exposure, one worm per replicate of each treatment were rinsed with deionised water and frozen at  $-20$  °C. Then, these worms were dried at 40 °C for 24 h and weighed. Metal concentrations in worms were measured by dissolving them in 2 mL of HNO<sub>3</sub> (68%) at room temperature for 2 h and at 80 °C for 20 h. After cooling, they were digested in 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) for at least 2 h at room temperature. After filtration through ash free filters (Prolabo), solutions were adjusted to 10 mL with deionised water. Aluminium and titanium concentrations were measured using ICP-AES by INRA (National Institute of Agronomic Research, Arras, France).



Because biological standard reference materials containing TiO<sub>2</sub> were not available, laboratory controls were prepared with earthworm, *E. fetida*, exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts (25 mg/L). Triplicate digestions and analyses were performed by three independent laboratory using ICP-AES. The results indicated titanium concentrations within 5% of the mean value (28.24 mg/kg).

#### 2.4. mRNA expression pattern

##### 2.4.1. Total RNA extraction and cDNA synthesis

After exposure, three worms per replicate of each treatment were rinsed with distilled water and digestive tissues were immediately dissected and pooled. The digestive tissues were placed in 4 M guanidium isothiocyanate solution (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania) and conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  to avoid RNA degradation. Total RNAs were extracted from 30 mg of each tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). The RNA integrity was estimated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE (Tris 40 mM, Acetic acid 1 mM, EDTA 40 mM) buffer and visualization under UV light. Reverse-transcription was performed on 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using the Revert Aid MuLV RT Kit (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). The reaction was conducted at  $42^{\circ}\text{C}$  for 30 min in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP mix, 2.5  $\mu\text{M}$  of OligodT primer, 10 U/ $\mu\text{L}$  of Revert Aid MuLV RT and 1 U/ $\mu\text{L}$  of Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania).

##### 2.4.2. Quantitative Real-time PCR

Evaluation of MT and SOD mRNA expression was carried out by Real-time quantitative PCR using an SYBR Green dye (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a MiniOpticon system according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, USA). Specific primers MT.F200, MTR.100, SOD.F50 and SOD.R200 were used to amplify cDNA of MT and SOD. Ubiquitin cDNA was co-amplified as a control using Ubiq.F100 and Ubiq.R100 primers. We chose specific primers according to *E. fetida* MT and SOD sequences available in GenBank (accession numbers: AJ236886, DQ286712) using Primer 3 software. Primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and their sequences are given in Table 1.

PCR amplifications were performed in 20  $\mu\text{L}$  of the following mixture: 5  $\mu\text{L}$  of diluted cDNA, 10  $\mu\text{L}$  of qPCR GoTaq Master Mix, and 500 nM of Ubiquitin, MT or SOD primers. The following PCR conditions were used: 10 min initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  followed by 40 repeated amplification and quantification steps (denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 20 s, annealing at  $58^{\circ}\text{C}$  for 20 s, polymerization at  $72^{\circ}\text{C}$  for 20 s) and a 5 min final extension at  $72^{\circ}\text{C}$ . A melting curve of PCR products ( $40$ – $95^{\circ}\text{C}$ ) was also performed to ensure the absence of artefacts (data not shown). Negative controls using non reverse-transcribed RNA were performed to confirm the absence of contamination. cDNA pool was diluted between 1:20 and 1:320 to calculate PCR efficiencies (E). Efficiency values were 0.890, 0.894 and 1.104 for ubiquitin, MT and SOD, respectively. Expression levels of the target gene (Tg) were compared to the expression of the constitutively expressed ubiquitin (ubiq) gene using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). For each condition, results were obtained from three independent RT-qPCRs from three different samples.

#### 2.5. Apoptosis

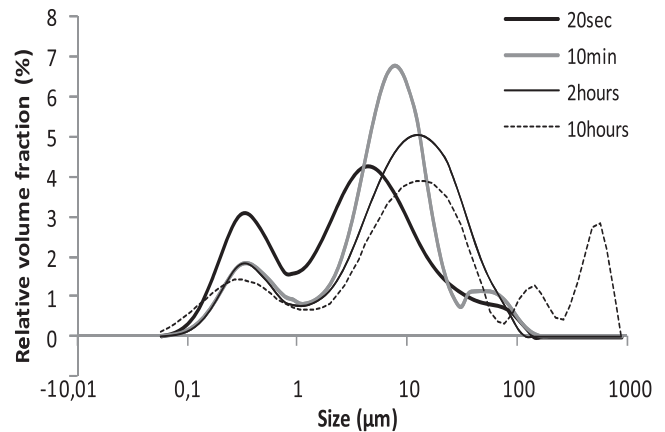
After exposure, one earthworm per replicate of each treatment was fixed in 4% buffered formaline for at least one week. Later, fixed individuals were dehydrated for 72 h, embedded in paraffin and cut into 7  $\mu\text{m}$  transverse sections in the intestinal region (approximately at segment number 30). Apoptosis was examined using two methods: Apostain and TUNEL.

The Apostain method was performed according to the manufacturer's protocol (Absys, Paris, France). To confirm results obtained with Apostain, the TUNEL method was performed using the *in situ* Cell Death Detection Kit POD (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Procedure of these two methods has been well developed by Lapiéd et al. (2010). For both methods, stained cells in five tissues (cuticule, circular musculature, longitudinal musculature, intestinal epithelium and chloragogenous matrix) were counted on histological sections using a light microscope (Nikon Eclipse E 400) connected to a Nikon DXM 1200 digital camera at 945 $\times$  magnification. In order to compare treatment effects and establish dose–response relationships, the number of Apostain and TUNEL positive stained cells per  $\text{mm}^2$  was recorded. The number of stained cells was counted on 3 different worms and on 5 one- $\text{mm}^2$  quadrats per tissue type and worm (on a same histological section).

**Table 1**

Sequences of primers used for PCR amplifications.

Primers	Sequences (5'–3')
Ubiq.F100	CACCTTCACCTTGTT
Ubiq.R100	GGAATTCCTCTTGCC
MT.F200	CTGCAAAAAGCTTTGCTGTG
MT.R100	TATTTCAATGCCTCGGCTCT
SOD.F50	TGGATTTCACGTGCATGAGT
SOD.R200	GCCAAGATCGTCCACCAGCT



**Fig. 2.** Volumic size distribution of TiO<sub>2</sub> byproducts (10 mg/L) in the earthworm exposure medium (1:1 milliQ water:mineral water; v/v) at 20 s (thick black line), 10 min (grey line), 2 h (thin black line) and 10 h (dotted line) measured by laser diffraction.

#### 2.6. Immunotoxicity

##### 2.6.1. Immune cells extrusion

After 24 h exposure to TiO<sub>2</sub> byproducts, six worms per replicate for each treatment were rinsed with LBSS adjusted to 300 mosmol/L (NaCl: 71.5 mM; KCl: 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub>: 1.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O: 0.3 mM, NaHCO<sub>3</sub>: 4.2 mM; pH 7.3) and placed in a 15 mL tube containing 3 mL of extrusion medium (LBSS 300 mosmol/L with 1% GGE and 0.02% EDTA). Then, cœlomocytes (cells from cœlomic fluid) were spontaneously extruded through dorsal pores for 3 min. After extrusion, worms were removed and cells centrifuged at  $150 \times g$  for 10 min. Supernatants were removed and 300  $\mu\text{L}$  of culture medium (MEM 85%, FBS 10%, Hepès 1%, L glutamine 2 mM, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tetracyclin 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , amphotericin B 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added. Cells from the same replicate (6 worms) were pooled and the cell suspensions adjusted to  $10^6$  cells/mL in order to evaluate cell viability and phagocytic activity.

##### 2.6.2. Cell viability

The MTT colouring assay was performed according to Carmichael et al. (1987), with some modifications. Fifty microlitre of MTT (10 mg/mL) was added to 50  $\mu\text{L}$  of cell suspension at  $10^6$  cells/mL. After 24 h incubation in the dark at  $16^{\circ}\text{C}$ , 50  $\mu\text{L}$  DMSO and 50  $\mu\text{L}$  lysis solution (0.1 N HCl in isopropanol/10% Triton X100; v/v) were added. Absorbance was recorded at 570 nm after 3 h incubation. All readings were corrected by subtracting blanks (LBSS). Tests were considered valid only if the right LBSS blank did not differ more than 20% from the left blank (Maleri et al., 2008). As well as the response of MTT is depending on the cell concentration, results were standardized based on protein content measured using BCA (bicinchoninic acid) protein methods following the manufacturer's procedure.

##### 2.6.3. Phagocytic activity

After earthworm exposure to TiO<sub>2</sub> byproducts, cœlomocytes were extruded with the same protocol as the MTT assay. Cells were adjusted to  $10^6$  cells per mL and latex beads (2  $\mu\text{m}$ , Sigma L0905) were added with a ratio of 1:100 (cells:beads). After 18 h incubation at  $16^{\circ}\text{C}$  under gentle shaking, the cell suspensions were deposited on a BSA gradient and a centrifugation at  $150 \times g$  during 10 min was performed to exclude free beads. The supernatant was removed and 100  $\mu\text{L}$  of LBSS was added. Cells were spread onto a microscope slide and fixed with paraformaldehyde (4%). Slides were washed twice in PBS buffer. Anti-fading agent (DABCO 0.2 mM; Tris-HCl 200 mM, pH 8; Glycerol 86%) was spread on each slide and a cover slip added. Slides were observed using an Epi-fluorescence microscope (Nikon eclipse E 800). For each concentration, 4 slides were prepared and two counts of one hundred cells per slide were counted blindly. The number of cells with at least 1 bead engulfed was considered as phagocytic cell among the hundred counted cells.

#### 2.7. Statistical analysis

Normality was tested using Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variance was tested by the Bartlett test. Differences in metal content between treatments were evaluated by ANOVA followed by a post hoc HSD Tukey test of log transformed data. mRNA expression levels, cellular viability and phagocytic activity were analysed by ANOVA followed by a post hoc HSD Tukey test. Differences in apoptotic activity in stained cells between treatments and tissues were evaluated by ANOVA 2 (2 factors: concentrations and tissues) followed by a post hoc HSD Tukey test.

Statistical analyses were conducted using R software (R Development Core Team, 2006). Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. TiO<sub>2</sub> byproducts characterization

The size distribution of TiO<sub>2</sub> byproducts in water (pH  $7.66 \pm 0.17$ ) as a function of time is presented in Fig. 2. Initially, the size distribution was characterized by two particle populations: one peak around 0.2–0.3  $\mu\text{m}$ , corresponding to well-dispersed stable nanocomposites in suspension, and a second peak around 5–6  $\mu\text{m}$ . The aggregation of TiO<sub>2</sub> byproducts evolved slowly and the same pattern was observed after 10 min and 2 h. The size distribution was then composed mainly by particles around 10  $\mu\text{m}$ . However, between 2 and 10 h a new size class appeared around 700  $\mu\text{m}$ . It is worth noting that the size is shown in volume fraction and that the 700  $\mu\text{m}$  particle population is a minor component if expressed in number of particles. Among such a large polydispersity, aggregates larger than 10  $\mu\text{m}$  are expected to not remain stable in suspension and therefore being rapidly settled out. This is confirmed by the relative turbidity of the overnight supernatant, which drops down to 26.9 for the 10 mg/L suspension (Table 2). However, it appears that the more diluted suspensions (0.1 and 1 mg/L) undergo slower settling, since the measured turbidity increases with dilution. This is certainly due to the interparticle collision frequency, which decreases with particle concentration, and which is a limiting parameter for aggregation kinetics.

#### 3.2. Bioaccumulation

Fig. 3 shows body concentrations of metals in *E. fetida* exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts during 24 h. For aluminium (Fig. 3a), body concentrations were constant at all the four concentrations tested with 136, 131, 114 and 122 mg/kg for worms exposed to 0, 0.1, 1 and 10 mg/L respectively (ANOVA,  $p = 0.45$ ). In contrast, a significant increase of titanium was observed in tissues for worms exposed to 10 mg/L in comparison with controls (19.50 and 9.66 mg Ti/kg, respectively; Fig. 3b; ANOVA,  $p = 0.0008$ ).

#### 3.3. mRNA expression pattern

The expression patterns of MT and SOD in gut tissues of earthworms exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts showed significantly increased transcript levels compared to controls (Fig. 4). Metallothionein levels in worms exposed to 10 mg/L showed a 9.5-folds increase compared to controls (post-hoc Tukey test,  $p = 0.004$ ), worms exposed to lower concentrations were not significantly increased. Mean SOD transcript levels at 0.1 and 1.0 mg/L were not significantly different from controls, while at 10 mg/L, SOD mRNA levels were 6.6-fold higher than in controls (post-hoc Tukey test,  $p = 0.0007$ ).

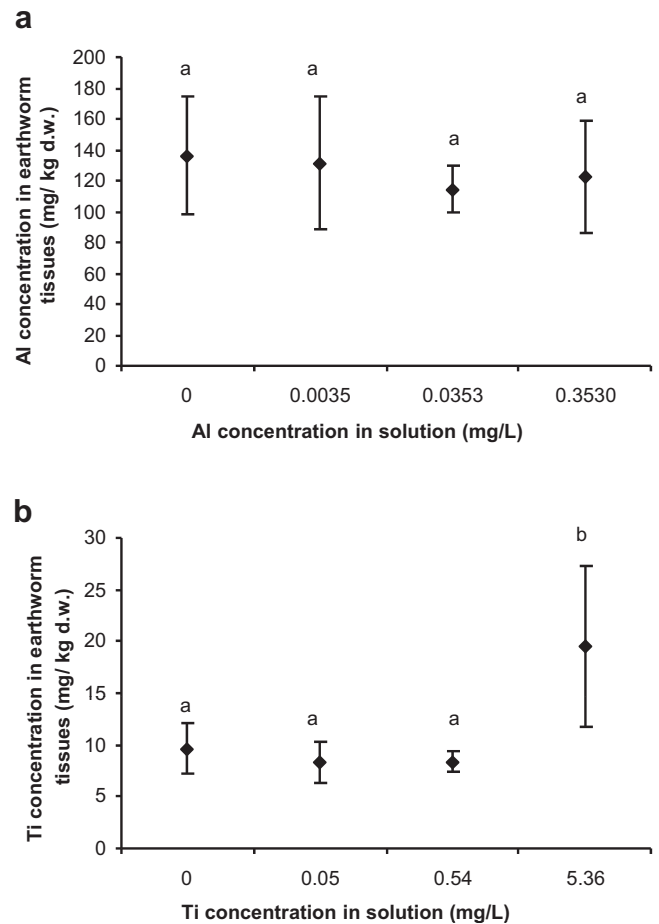
#### 3.4. Apoptosis

Fig. 5 shows apoptotic activity measured using Apostain after 24 h exposure to TiO<sub>2</sub> byproducts. Significant differences were found for different concentrations (ANOVA 2,  $p = 0.0001$ ; Fig. 5a) and

**Table 2**

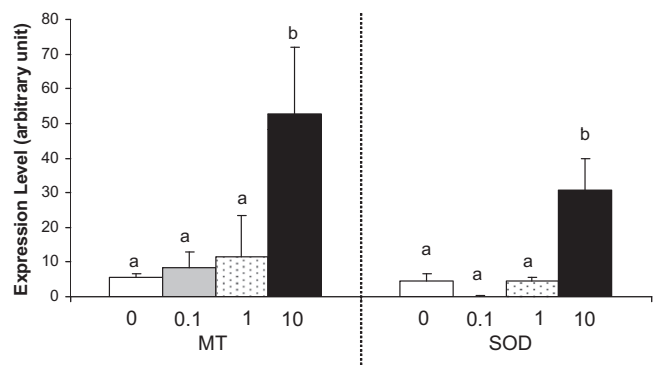
Supernatant relative turbidity of TiO<sub>2</sub> byproducts suspension at concentration tested after 24 h settling.

TiO <sub>2</sub> Byproducts (mg/L)	Relative turbidity
0.1	96.02
1	63.39
10	26.93

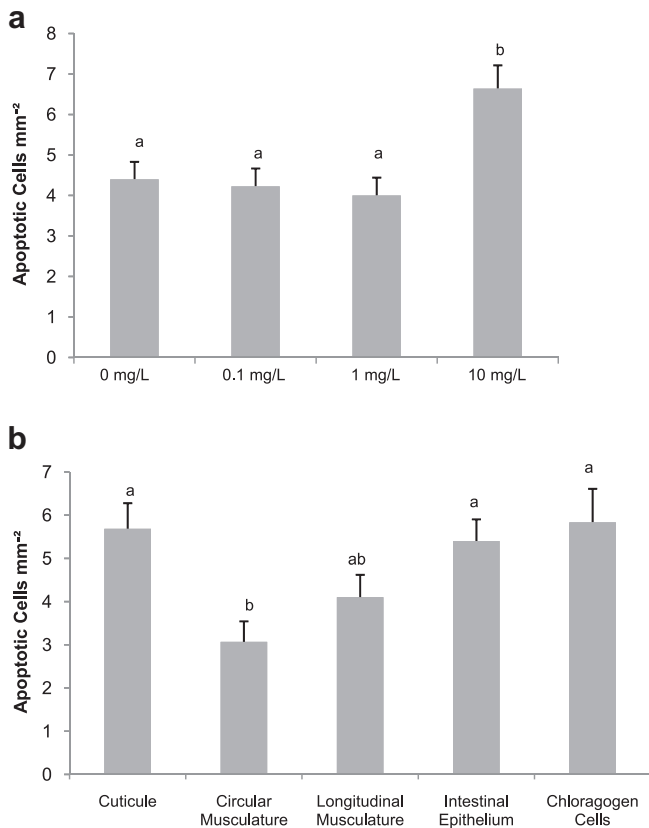


**Fig. 3.** Mean ( $\pm$ SD) of Al (a) and Ti (b) body concentrations (mg/kg, d.w.) in *Eisenia fetida* exposed for 24 h to TiO<sub>2</sub> byproducts. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ).

tissue types (ANOVA 2,  $p = 0.0004$ ; Fig. 5b). A significant increase of apoptosis compared to controls was only observed in worms exposed to 10 mg/L (Fig. 5a). Globally, apoptotic activity was higher in cuticle cells, intestinal epithelium and chloragogen cells (mean densities of Apostain positive cells: 5.68, 5.40 and 5.83 cells  $\text{mm}^{-2}$ , respectively) compared to circular musculature where the mean density was 3.07 cells  $\text{mm}^{-2}$  (Fig. 5b). Apoptotic activity in longitudinal musculature was not significantly different from that in



**Fig. 4.** Expression levels of MT and SOD mRNA (mean  $\pm$  SD) in gut tissues of *Eisenia fetida* after 24 h of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: 0, 0.1, 1 and 10 mg/L. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).



**Fig. 5.** Mean densities ( $\pm$ SEM) of Apoptain positive cells recorded in *Eisenia fetida* after 24 h of exposure to different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: a) Comparison of apoptotic response between different concentrations of TiO<sub>2</sub> byproducts: 0, 0.1, 1 and 10 mg/L. b) Comparison of apoptotic response between different type of tissue. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

other tissues. These results were confirmed by apoptotic activity measured by the TUNEL method (data not shown).

### 3.5. Immunotoxicity

No significant variation of cellular viability was observed at any of the three concentrations tested compared to control (ANOVA,  $p = 0.3$ ; Table 3). Concerning phagocytosis activity (Table 3), significant decreases corresponding to 45.4, 40.4 and 44.2% of activity for 0.1, 1 and 10 mg/L of TiO<sub>2</sub> byproducts respectively, were observed compared to controls which exhibited 59.3% of phagocytosis (ANOVA,  $p = 0.001$ ).

## 4. Discussion

In this laboratory experiment we showed that in liquid medium, TiO<sub>2</sub> byproducts reached  $\mu$ m size and can induce sublethal effects on the earthworm *E. fetida* after only 24 h exposure at byproducts concentrations below 10 mg/L.

**Table 3**

Viability and phagocytosis activity (mean  $\pm$  SD) of cœlomocytes from earthworms exposed 24 h to TiO<sub>2</sub> byproducts. Different letters indicate significant differences ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ).

	0 mg/L	0.1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L
Cell viability (%)	100.0 <sup>a</sup> $\pm$ 11.4	98.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	95.9 <sup>a</sup> $\pm$ 10.8	105.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6
Phagocytosis activity (%)	59.3 <sup>a</sup> $\pm$ 12.9	45.4 <sup>b</sup> $\pm$ 8.7	40.4 <sup>b</sup> $\pm$ 7.5	44.2 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1

### 4.1. TiO<sub>2</sub> byproducts behaviour and accumulation

The predicted environmental concentrations (PEC) of nano-TiO<sub>2</sub> in water and soil at the current rates of use and release has been estimated to be 0.7–16  $\mu$ g/L and 0.4–4.8  $\mu$ g/kg, respectively (Mueller and Nowack, 2008). Johnson et al. (2011) have also predicted a sunscreen TiO<sub>2</sub> ENP of 8.8  $\mu$ g/L for UK water. They have estimated that wasted sludge contained 305  $\mu$ g Ti/g. To evaluate the potential ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> byproducts in our study, worms have been exposed to higher concentrations than those observed in the environment, with Ti concentrations from 0.05 to 5.36 mg/L. As mentioned before, these concentrations were chosen to simulate the worst case of exposure. In our experiment, worms were exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts not only in the nanometre range, but also in the micrometre range with aggregates in the exposure medium. Nevertheless, characterization results show that worms were exposed to the same proportion of particles below 1  $\mu$ m at the 3 tested concentrations. At 10 mg/L, worms were also exposed to larger particles with a size ranging between 100 and 1000  $\mu$ m. Settling of these aggregates larger than 10  $\mu$ m could explain the strong decrease of turbidity observed at 10 mg/L of byproducts. Salts added via mineral water modified the pH of the suspension which reached 7.7 corresponding to the isoelectric point of the TiO<sub>2</sub> byproducts (Labille et al., 2010). At this pH, the repulsive forces are at their weakest due to low surface charge, and the particles are likely to undergo aggregation (Jiang et al., 2009). Compared to the initial stable byproducts suspension, the addition of salts in the aqueous medium could explain the aggregation of TiO<sub>2</sub> byproducts and the formation of micrometre-sized aggregates. However it is important to remind that aggregation due to annihilation of repulsive forces (pH and salinity modifications) is a reversible phenomenon and that particles are maintained in the aggregates only by weak forces (i.e. Details given by the DLVO theory).

Bioavailability measured as uptake in worms showed that titanium was accumulated by worms exposed to byproducts at 10 mg/L (corresponding to 5.36 mg Ti/L) with a mean body concentration of 19.5 mg Ti/kg dry weight compared to 9.66 mg Ti/kg for controls. Preliminary results obtained by X-ray fluorescent microscopy localize titanium in gut tissues (data not shown). Hu et al. (2010) also showed a significant bioaccumulation of titanium in *E. fetida* exposed for 7 days to 1 and 5 g/kg of nanosized TiO<sub>2</sub> in OECD soil, resulting in body concentrations of 10 and 30 mg Ti/kg fresh weight, respectively. Differences in exposure conditions (duration and Ti concentration), but also aggregate size, could explain higher levels of titanium in this report compared to our study. For other organisms, like fish, a slight bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> has also been observed during 14 days exposure to approximately the same range of concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg/L) (Federici et al., 2007). Galloway et al. (2010) studying the marine lugworm *Arenicola marina* observed TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in microvilli of their lumen, but without uptake from the guts into cells or tissues. The likely aggregation of nanoparticles into micrometre-sized aggregates would prevent entry into cells via gap junctions or nanosized pores and thus prevent uptake of TiO<sub>2</sub> nanoparticles across skin and gut tissues. In contrast it seems that Al was not bioaccumulated by worms exposed to the byproducts. Al content in worms did not differ between the control treatment (136 mg Al/kg) and those containing TiO<sub>2</sub> byproducts (114–131 mg Al/kg). This is in accordance with the data of Coleman et al. (2010) and Nahmani et al. (2007) who found Al concentrations in uncontaminated *E. fetida* in the same range (114–132 mg Al/kg, and 126 mg Al/kg respectively).

Moreover, based on the initial Ti/Al ratio in the TiO<sub>2</sub> byproducts, the titanium bioaccumulation by worms at 10 mg/L of byproducts was expected to be coupled with Al bioaccumulation along the

same ratio. Therefore, the Al concentration in the body would have increased by almost 10% of the Ti concentration i.e.  $\approx 10 \text{ mg} \times 0.1 = 1 \text{ mg/kg}$ . As the natural Al concentration in worms is around  $120 \pm 10 \text{ mg/kg}$ , a 1 mg/kg increase could not be detected from the background.

#### 4.2. TiO<sub>2</sub> byproducts ecotoxic effects

Induction of metallothioneins in gut tissues coincided with enhanced uptake of titanium in the whole body of worms exposed to 10 mg/L of TiO<sub>2</sub> byproducts. Metallothioneins are metals binding proteins which maintain intracellular redox equilibrium and are involved in detoxification of excess metal ions and in antioxidant defences. Unrine et al. (2010b) showed an increase of metallothioneins expression in worms *E. fetida* exposed at least to 20 mg/kg of Cu nanoparticles. TiO<sub>2</sub> byproducts thus seemed to stimulate the detoxification system, as shown by the increase of SOD mRNA levels at the highest exposure concentration. This contrasts with the findings of Cui et al. (2010) who found a reduction of MT and SOD expression levels in mouse liver after exposure to TiO<sub>2</sub> for 60 days at 10 and 50 mg/kg. SOD neutralises free radical superoxides by catalysing their conversion to peroxides and divalent oxygen (Fridovich, 1989), so the induction of MT and SOD could protect cells from oxidative stress generated by TiO<sub>2</sub>. The production of ROS associated with nanoparticles could explain the induction of proteins implied in the antioxidant system in worms (Foucaud et al., 2007). In the specific case of TiO<sub>2</sub> byproducts it has been shown that the protective Al layer prevents direct production of ROS through photocatalytic effect (Auffan et al., 2010). However in the gut, presence of organic ligands potentially complexing Al may favour alteration and/or dissolution of the Al(OH)<sub>3</sub> protective layer. This would imply exposition to the underlying bare nano-TiO<sub>2</sub> core, and thus its potential photoactivation. This may assume that oxidative stress could be induced. Then, increase of MT and SOD may be related to ROS production by TiO<sub>2</sub> byproducts at 10 mg/L.

An enhanced rate of apoptosis is another biomarker that has been used to demonstrate adverse effects of nanoparticles in earthworms (Lapied et al., 2010). The increased rate of apoptosis that we observed in worms exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts at 10 mg/L could be also explained by the formation of ROS. Moreover, the structure of the titanium dioxide nanocomposite corresponds to rutile, which is known to be an initiator of apoptosis through formation of ROS (Braydich-Stolle et al., 2008). In our study, the highest rates of apoptosis were observed in cuticle, intestinal epithelium and chloragogenous tissues. The same tendency was observed in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to the same particles, TiO<sub>2</sub> byproducts (also called aged TiO<sub>2</sub> nanocomposites) in water for 7 days (Lapied et al., in press). These authors showed that cuticle and intestinal epithelium are affected in worms exposed to 100 mg/L of TiO<sub>2</sub> byproducts.

In our study, no effect on cœlomocyte viability was observed at any concentration tested using MTT. The fact that we exposed the worms to TiO<sub>2</sub> byproducts *in vivo* could explain this lack of effect, as cœlomocytes were not directly exposed to TiO<sub>2</sub> byproducts and their aggregates. In contrast, cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> has been observed using cœlomocytes of the lugworm *A. marina* at higher concentrations (2 and 3 g/kg) in sediments using neutral red retention assay after 10 d exposure (Galloway et al., 2010). A significant decrease of CHO-k1 cells viability starting at 5 mg/L was also observed using MTT assay after a 24-h exposure to TiO<sub>2</sub> *in vitro* (Di Virgilio et al., 2010). Although cœlomocyte viability was not affected by TiO<sub>2</sub> byproducts in our study, a significant decrease of phagocytosis was observed starting at 0.1 mg/L. Even if cœlomocytes seem not to be in contact with the particles their

immune function was modified by the exposure to TiO<sub>2</sub> byproducts without any dose-effect relationship. A significant decrease of phagocytosis has been observed on macrophages (murine cells) exposed to ultrafine titanium dioxide (Renwick et al., 2001). These authors showed that TiO<sub>2</sub> particles were not directly toxic to the cells. It is well known that phagocytosis is considered as a reliable biomarker for metal pollution, but the effects of nanoparticles on this immune function are still poorly known. Our study indicates that while viability of cœlomocytes seems to be insensitive to TiO<sub>2</sub> at low concentrations, phagocytosis appears to be a promising biomarker.

The different sensitivity and responsiveness of the tested endpoints show that it is crucial to evaluate ecotoxicity of nanomaterials with a battery of biomarkers. Moreover it is worth noting that bare TiO<sub>2</sub> nanoparticles and TiO<sub>2</sub> byproducts used in sunscreen can induce different biological effects. This strongly suggests that surface structure and properties need to be addressed in nanotoxicological studies.

#### 4.3. Exposure scenario: from microcosms to the real world

In this paper, the aims were to characterize the behaviour of byproducts in the medium of exposure, and to evaluate (at reasonable TiO<sub>2</sub> concentrations) the potential effects of TiO<sub>2</sub> byproducts for earthworms, by enhancing their bioavailability for earthworm. Thus a liquid medium was chosen for the exposure. Experiments with earthworms in liquid medium have been carried out for physiological and ecotoxicological researches over periods of several weeks without severe effects (Oglesby, 1978; Kiewiet and Ma, 1991; Arnold et al., 2003). Oglesby (1978) states that the physiology of earthworms is typical of conventional freshwater invertebrates, and that they are frequently studied as if they were fully aquatic organisms (Janssen et al., 1997). This experiment in liquid medium didn't affect survival of worms after 24 h of exposure. Titanium has been bioaccumulated and the only damages at molecular and cellular level were observed on worms exposed to 10 mg/L of TiO<sub>2</sub> byproducts.

Generally, natural organic matter (NOM), clays, and others colloidal materials present in environmental systems are known to chelate heavy metals and to modify their mobility and bioavailability. Wiesner and Bottero (2007) show that NOM may alter characteristics of nanoparticles, in such a way that aggregation may unfavour direct contact with organisms, and imply a decrease of toxicity. Conversely, Domingos et al. (2009) showed that humic acid could decrease the aggregation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Actually, the ratio between nanoparticle surface and adsorbing molecules is a driving parameter that may favour either bridging flocculation or steric stabilization, so that opposite tendencies may be encountered with the same constituents (Labille et al., 2010). These considerations emphasize the need for more ecologically relevant experiments, with soil medium, in which abiotic (in progress), and biotic interactions can be taken into account.

#### Acknowledgements

This study was performed in the framework of project INSU EC2CO Cytrix « Nanoalter ». The authors also acknowledge the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the Region Lorraine for their financial support.

#### Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.envpol.2011.05.024.



## References

- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., Hull, M., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine* 56, 300–306.
- Almquist, C.B., Biswas, P., 2002. Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO<sub>2</sub> on its photoactivity. *Journal of Catalysis* 212, 145–156.
- Arnold, R.E., Langdon, C.J., Hodson, M.E., Black, S., 2003. Development of a methodology to investigate the importance of chemical speciation on the bioavailability of contaminants to *Eisenia andrei*: the 7th international symposium on earthworm ecology, Cardiff, Wales, 2002. *Pedobiologia* 47, 633–639.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 407, 1461–1468.
- Asensio, V., Kille, P., Morgan, A.J., Soto, M., Marigomez, I., 2007. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology* 43, S233–S238.
- Auffan, M., Pedeutour, M., Rose, J., Masion, A., Ziarelli, F., Borschneck, D., Chaneac, C., Botta, C., Chaurand, P., Labille, J., Bottero, J.-Y., 2010. Structural degradation at the surface of a TiO<sub>2</sub>-based nanomaterial used in cosmetics. *Environmental Science & Technology* 44, 2689–2694.
- Bae, T.-H., Tak, T.-M., 2005. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on fouling mitigation of ultrafiltration membranes for activated sludge filtration. *Journal of Membrane Science* 249, 1–8.
- Bigorgne, E., Cossu-Leguille, C., Bonnard, M., Nahmani, J., 2010. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm. *Chemosphere* 80, 1109–1112.
- Blaise, C., Gagné, F., Férard, J.F., Eullafroy, P., 2008. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology* 23, 591–598.
- Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., Masion, A., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2011. TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: structures and quantities. *Environmental Pollution* 159, 1543–1550.
- Braydich-Stolle, L.K., Schaeublin, N.M., Murdock, R.C., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub> nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 1361–1374.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2008. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 1441–1453.
- Brulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144, 334–341.
- Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., 2010. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on Mytilus hemocytes. *Aquatic Toxicology* 96, 151–158.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47, 936–942.
- Coleman, J.G., Johnson, D.R., Stanley, J.K., Bednar, A.J., Weiss Jr., C.A., Boyd, R.E., Steevens, J.A., 2010. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1575–1580.
- Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., Hong, M., Zhou, M., Wang, L., Wang, H., Hong, F., 2010. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 183, 874–880.
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Fernández Lorenzo de Mele, M., 2010. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials* 177, 711–718.
- Domingos, R.F., Tufenkji, N., Wilkinson, K.J., 2009. Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of a Fulvic acid. *Environmental Science & Technology* 43, 1282–1286.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 190–205.
- Eyambe, G.E., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals* 25, 61–67.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84, 415–430.
- Foucaud, L., Wilson, M.R., Brown, D.M., Stone, V., 2007. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicology Letters* 174, 1–9.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40, 412–420.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 7761–7764.
- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158, 1748–1755.
- Garcia, M., Römbke, J., de Brito, M.T., Scheffczyk, A., 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution* 153, 450–456.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216–9222.
- Hansen, S.F., Larsen, B.H., Olsen, S.L., Baun, A., 2007. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* 1, 243–250.
- Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J., Yang, L.Y., 2010. Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 586–591.
- Janssen, M.P.M., Glastra, P., Lembrechts, J.F.M.M., 1997. The effects of soil chemical characteristics on the 134Cs concentrations in earthworms. Uptake from liquid medium. *Journal of Environmental Radioactivity* 35, 313–330.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 77–89.
- Johnson, A.C., Bowes, M.J., Crossley, A., Jarvie, H.P., Jurkschat, K., Jürgens, M.D., Lawlor, A.J., Park, B., Rowland, P., Spurgeon, D., Svendsen, C., Thompson, I.P., Barnes, R.J., Williams, R.J., Xu, N., 2011. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO<sub>2</sub> nanoparticles in UK field scenarios. *Science of the Total Environment* 409, 2503–2510.
- Kiewiet, A.T., Ma, W.-c., 1991. Effect of pH and calcium on lead and cadmium uptake by earthworms in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21, 32–37.
- Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2010. Aging of TiO<sub>2</sub> nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution* 158, 3482–3489.
- Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine* 5, 975–984.
- Lapied, E., Nahmani, J.Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J. Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International*, in press.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-[Delta][Delta]CT</sup> method. *Methods* 25, 402–408.
- Maleri, R.A., Fourie, F., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2008. Photometric application of the MTT- and NRR-assays as biomarkers for the evaluation of cytotoxicity ex vivo in *Eisenia andrei*. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1040–1048.
- Masciangioli, T., Zhang, W.-X., 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Environmental Science & Technology*, 102–108.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42, 4447–4453.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution* 149, 44–58.
- Oglesby, L.C., 1978. Salt and water balance. In: Mill, P.J. (Ed.), *Physiology of Annelids*. Academic Press, London, pp. 555–658.
- Oughton, D.H., Hertel-Aas, T., Pellicer, E., Mendoza, E., Joner, E.J., 2008. Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1883–1887.
- Pan, Z., Lee, W., Slutsky, L., Clark, R.A.F., Pernodet, N., Rafailovich, M.H., 2009. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small* 5, 511–520.
- Pulido, M.D., Parrish, A.R., 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533, 227–241.
- Qiao, M., Chen, Y., Wang, C.-X., Wang, Z., Zhu, Y.-G., 2007. DNA damage and repair process in earthworm after *in vivo* and *in vitro* exposure to soils irrigated by wastewaters. *Environmental Pollution* 148, 141–147.
- R, Development Core Team, 2006. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org>.
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Maboeta, M.S., 2001. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia* 45, 61–68.
- Renwick, L.C., Donaldson, K., Clouter, A., 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172, 119–127.
- Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H., Schaefer, M., Johansen, A., 2008. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 616–619.
- Spurgeon, D.J., Stürzenbaum, S.R., Svendsen, C., Hankard, P.K., Morgan, A.J., Weeks, J.M., Kille, P., 2004. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138, 11–21.
- Urine, J.M., Hunyadi, S.E., Tsyusko, O.V., Rao, W., Shoultz-Wilson, W.A., Bertsch, P.M., 2010a. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science & Technology* 44, 8308–8313.
- Urine, J.M., Tsyusko, O.V., Hunyadi, S.E., Judy, J.D., Bertsch, P.M., 2010b. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms

- (*Eisenia fetida*) exposed to copper nanoparticles. *Journal of Environmental Quality* 39, 1942–1953.
- van der Ploeg, M.J.C., Baveco, J.M., van der Hout, A., Bakker, R., Rietjens, I.M.C.M., van den Brink, N.W., 2011. Effects of C60 nanoparticle exposure on earthworms (*Lumbricus rubellus*) and implications for population dynamics. *Environmental Pollution* 159, 198–203.
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Masson, P., Narbonne, J.F., 1995. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, protease) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 217–224.
- Wakefield, G., Lipscomb, S., Holland, E., Knowland, J., 2004. The effects of manganese doping on UVA absorption and free radical generation of micronised titanium dioxide and its consequences for the photostability of UVA absorbing organic sunscreen components. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 648–652.
- Wiesner, M.R., Bottero, J.Y., 2007. *Environmental Nanotechnology, Applications and Impact of Nanomaterials*. McGraw-Hill. 544.
- Xiao, N.-W., Song, Y., Ge, F., Liu, X.-H., Ou-Yang, Z.-Y., 2006. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65, 907–912.

### Analyses supplémentaires

La technique d'ICP-AES a permis de mettre en évidence la bioaccumulation de titane dans les vers entiers exposés au SPA de  $\text{TiO}_2$ . Cependant, cette méthode ne permet pas de déterminer la zone de bioaccumulation. Une analyse par micro spectroscopie à fluorescence X a été utilisée pour localiser le titane bioaccumulé. Les résultats obtenus sur des coupes transversales de vers ont localisé du titane au niveau du tube de digestif du ver de terre (Fig.6).

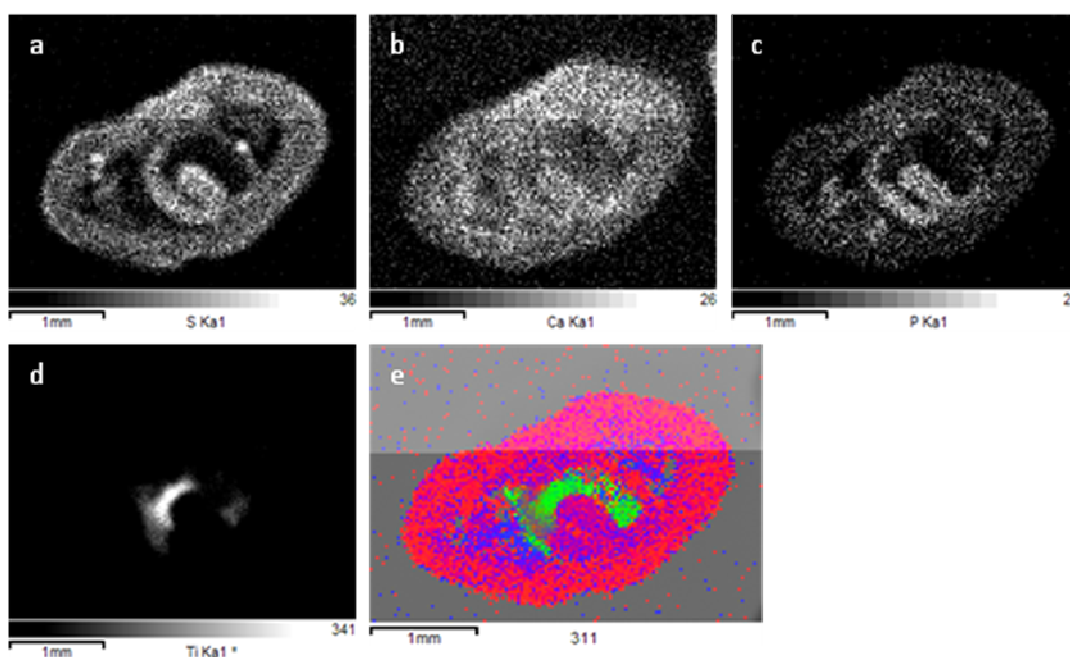


Figure 6. Analyses par  $\mu$ -XRF d'une section transversale de ver de terre après 24h d'exposition à 83 mg SPA/l. Distribution du soufre (a), calcium (b), phosphore (c), titane (d) et S/Ti/P combiné en rouge, vert et bleu respectivement (1 px=28  $\mu\text{m}$ , 128 px)

## Bilan

Les particules de SPA de  $\text{TiO}_2$  tendent à s'agréger pour atteindre plusieurs micromètres dans le milieu d'exposition (eau ultrapure/eau minérale ; v/v). Une exposition de 24h aux SPA de  $\text{TiO}_2$  n'a pas d'effet sur la survie des vers de terre. Les résultats de bioaccumulation de ces particules (aluminium et titane) montrent que seul le titane a été bioaccumulé par les vers exposés à la plus forte concentration en SPA (10 mg/l). Les analyses supplémentaires laissent supposer que le titane est présent au niveau du tube digestif des vers.

Ces résultats de bioaccumulation sont en concordance avec l'induction de l'expression des ARNm de la metallothionéine, protéine chelatrice de métaux, dans les tissus digestifs des vers exposés à 10 mg SPA/l. La production de ROS par le noyau de  $\text{TiO}_2$  des SPA semble expliquer l'induction de l'expression des ARNm de la SOD ainsi que l'augmentation de l'activité apoptotique chez les vers exposés à la plus forte concentration en SPA  $\text{TiO}_2$ . La phagocytose a été diminuée dès la plus faible concentration testée, alors qu'aucun effet sur la viabilité cellulaire des coelomocytes de ver de terre n'a été observé.

Cette étude montre qu'une exposition courte (24 h) en milieu liquide suffit pour générer des modifications à l'échelle moléculaire et cellulaire des vers sans altérer leur survie. Il est donc important d'évaluer les effets sublétaux des nanomatériaux à long terme en utilisant des biomarqueurs à différentes échelles biologiques.



# 1. Ecotoxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et des sous produits d'altération de TiO<sub>2</sub> sur le ver de terre, *Eisenia fetida*, dans des sols artificiels

Au cours de nos précédents travaux, la toxicité des SPA de TiO<sub>2</sub> et des NP de TiO<sub>2</sub> a été évaluée sur *Eisenia fetida* lors d'exposition des coelomocytes ou des organismes en milieu liquide (Bigorgne et al., 2011; Bigorgne et al., submitted to Journal of Nanoparticle Research). Ces études ont montré que ces particules pénètrent dans les tissus et les cellules. Elles modifient la réponse du système immunitaire, de détoxification et induisent une augmentation de l'activité apoptotique. Ces effets toxiques sont-ils toujours perceptibles lorsque les SPA TiO<sub>2</sub> et NP TiO<sub>2</sub> sont déversés directement sur les sols ? Le titane est-il toujours bioaccumulé par les vers ? La reproduction des vers de terre est-elle altérée ? L'expression des ARNm des gènes du système immunitaire (CCF et fétidines) et de détoxification (MT, GST, SOD) est-elle modifiée ?

Pour répondre à ces questions, le but de cette étude est d'évaluer l'accumulation et la potentielle toxicité des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> et des NP de TiO<sub>2</sub>, sur le ver de terre, *Eisenia fetida*, dans des conditions d'exposition plus proche de la réalité environnementale.

## 1. Protocole d'exposition

### 1.1. Contamination des sols

Cette expérience est réalisée en utilisant des sols artificiels contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> ou aux NP TiO<sub>2</sub>. Le sol artificiel a été choisi du fait de la simplicité de sa composition en vue des analyses de caractérisation et de son utilisation en écotoxicologie pour cette espèce de ver. En effet, il est composé de tourbe tamisée (10%), d'argile kaolinique (20%) et de sable de Fontainebleau (70%). Le pH est ajusté à  $6 \pm 0.5$  avec du carbonate de calcium.

Le substrat est humidifié avec de l'eau déminéralisée (témoin) ou la suspension de particules (SPA TiO<sub>2</sub> ou aux NP TiO<sub>2</sub>) entre 40 et 60% de sa capacité de rétention en eau totale afin d'atteindre les concentrations nominales suivantes : 2 et 20 mg/kg pour les SPA de TiO<sub>2</sub> et 2, 20, 200 mg/kg pour les NP de TiO<sub>2</sub>.

Les récipients sont placés à l'obscurité pendant 2 semaines dans une chambre climatisée à une température moyenne de  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  pour permettre les interactions et liaisons entre les constituants du sol et les ions métalliques de la suspension. Pour cela, le sol est régulièrement mélangé et pesé pour maintenir la teneur en eau.

## 1.2. Exposition des vers de terre

Les expositions sont réalisées à  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 2 (expérience 1) et 28 jours (expérience 2) à l'obscurité.

Expérience 1 : dix vers de terre, *E. fetida* ( $417 \pm 74$  mg), dépurés sont pesés puis placés dans un cristallisoir contenant le sol artificiel contaminé ou non. Trois replicats sont réalisés pour chaque condition. Les vers n'ont pas été nourris pendant l'exposition. A la fin des 2 jours d'exposition, les cœlomocytes des vers (3 vers par cristallisoir pour chaque condition) sont collectés par choc électrique pour étudier l'expression des ARNm des gènes du système immunitaire et de détoxification. Les cellules sont ajustées à  $10^6$  /ml puis conservées dans du GATC 4M à  $-80^\circ\text{C}$ .

Expérience 2 : dix vers de terre, *E. fetida* ( $426 \pm 67$  mg) dépurés sont pesés puis placés dans un cristallisoir contenant le sol artificiel contaminé ou non. Cinq replicats sont réalisés pour chaque condition. Chaque semaine, les vers de terre sont nourris avec 5 g de crottin de cheval séché, tamisé et exempt de toute trace de pollution, et l'excédent de nourriture est ensuite enlevé. La procédure normalisée du test reproduction des vers de terre a été suivie (ISO 11268-2, 1998). Après 28 jours d'exposition, la survie et la production de cocons par les vers sont mesurés. Les cœlomocytes des vers (3 vers par cristallisoir provenant de 3 replicats pour chaque condition) sont collectés par choc électrique pour étudier l'expression des ARNm des gènes du système immunitaire et de détoxification. Les cellules sont ajustées à  $10^6$  /ml puis conservées dans du GATC 4M à  $-80^\circ\text{C}$ . Les cocons sont replacés dans leurs substrats respectifs afin de mesurer le taux d'éclosion des cocons et la production de juvéniles après 28 jours supplémentaires.

### 1.3. Analyses physico-chimiques.

#### 1.3.1. Teneurs en métaux dans les sols

Les teneurs totales en titane sont mesurées dans les sols témoins et contaminés aux plus fortes concentrations en en SPA TiO<sub>2</sub> (20 mg/kg) ou NP TiO<sub>2</sub> (200 mg/kg). Les teneurs totales en aluminium sont également déterminées dans les sols témoins et contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub>. Ces analyses sont réalisées par l'INRA, Institut National de la Recherche Agronomique (Arras, France), en utilisant la technique d'ICP-AES.

#### 1.3.2. Bioaccumulation des métaux

Après 28 jours d'exposition, un ver de terre par réplicat pour chaque condition est rincé puis dépuré pendant 48 heures. Les vers de terre sont ensuite congelés à -20 °C. Les concentrations en titane sont mesurées dans les vers témoins et exposés aux SPA TiO<sub>2</sub> et aux NP TiO<sub>2</sub>, alors que les concentrations en aluminium sont mesurées dans les vers témoins et exposés aux SPA TiO<sub>2</sub>. Ces analyses sont réalisées par l'INRA, en utilisant la technique d'ICP-AES.

### 1.4. Statistiques

Le test de Shapiro-Wilk et de Bartlett ont été utilisés pour vérifier respectivement la normalité et l'homogénéité des variances. Les données du test reproduction (production de cocons, de juvéniles et taux d'éclosion) ont été analysées par un test Anova suivi du test post-hoc HSD Tukey. Les différences d'expression des ARNm entre les traitements ont été mesurées en utilisant un test Anova suivi du test post-hoc HSD Tukey sur des données log transformées. Les teneurs en titane dans les sols et les vers ont été traitées en utilisant le test Anova suivi du test post-hoc HSD Tukey alors que les teneurs en aluminium ont été traitées en utilisant le test t.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R (R). Les différences sont considérées significatives pour  $p \leq 0.05$ .

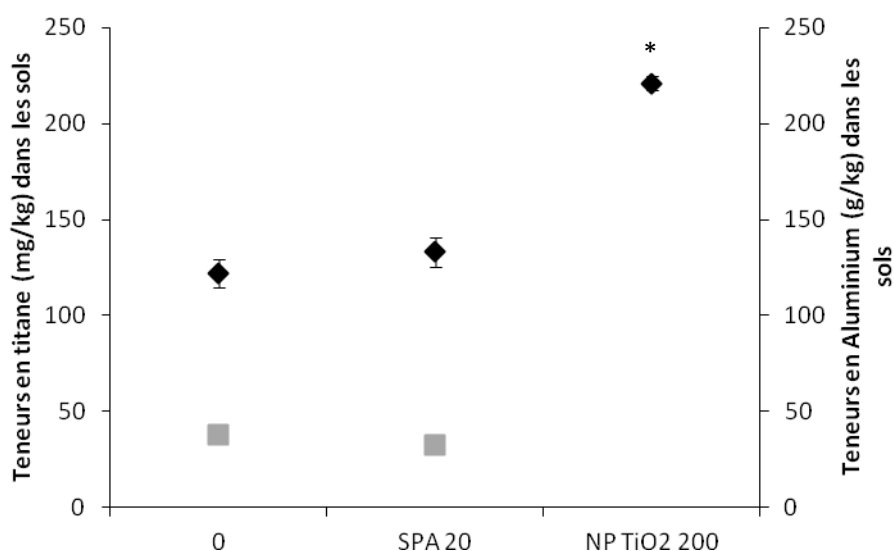
## 2. Résultats

### 2.1. Analyses physico-chimiques

#### 2.1.1. Teneurs en métaux dans les sols

La teneur moyenne en titane dans un sol artificiel non contaminé est de  $122 \pm 7$  mg/kg alors que celle dans un sol artificiel contaminé aux SPA à 20 mg/kg est de  $133 \pm 8$  mg/kg (Fig.1). Néanmoins, cette différence n'est pas significative. En revanche, les sols contaminés aux NP de  $\text{TiO}_2$  (200 mg/kg) ont une teneur moyenne en titane de  $221 \pm 4$  mg/kg ce qui correspond à un ajout de 99 mg de Ti /kg soit 165 mg de  $\text{TiO}_2$ /kg par rapport au sol artificiel témoin (Anova,  $p=1,7.10^{-5}$ ) (Fig.1).

Les teneurs en aluminium dans les sols témoins et contaminés aux SPA  $\text{TiO}_2$  sont  $38 \pm 5$  mg/kg et  $33 \pm 1$  mg/kg, respectivement. La contamination des sols artificiels aux SPA de  $\text{TiO}_2$  à 20 mg/kg n'est donc pas suffisante pour doper les sols en titane et aluminium (test t,  $p=0,14$ ).



**Figure 1.** Teneurs en titane (◆) et en aluminium (■) dans les sols artificiels témoins (0) et contaminés aux SPA (20 mg/kg) ou aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (200 mg/kg). Les astérisques montrent les différences significatives comparées au témoin correspondant (Anova,  $p<0,05$ ;  $n=3$ )

## 2.1.2. Bioaccumulation des métaux dans les vers

Les teneurs moyennes en titane et aluminium dans les vers témoins sont de l'ordre de  $16,9 \pm 8,9$  mg/kg et  $141,3 \pm 74,6$  mg/kg respectivement et ne diffèrent pas significativement de celles mesurées dans les vers exposés aux sols contaminés (Fig.2).

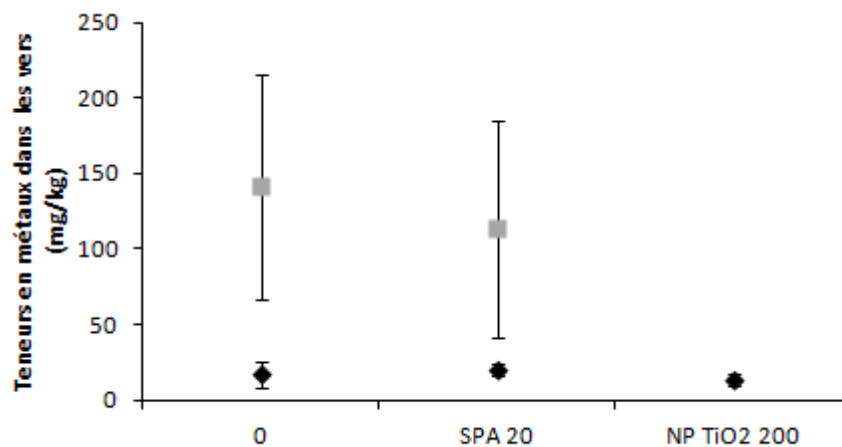


Figure 2. Teneurs en titane (◆) et en aluminium (■) dans les vers, *E. fetida*, exposés aux sols artificiels témoins (0) et contaminés aux SPA (20 mg/kg) ou aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (200 mg/kg). Les astérisques montrent les différences significatives comparées au témoin correspondant (Anova,  $p < 0,05$  ;  $n=5$ )

## 2.2. Test reproduction

Après 28 jours d'exposition aux sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> ou aux NP TiO<sub>2</sub>, tous les vers sont vivants et aucune variation de production de cocons n'est observée entre les vers exposés et les témoins (Anova, p=0,3 ; Tab.I). Aucune variation du taux d'éclosion n'a été observée quelles que soient les conditions testées (Anova, p=0,1; Tab. I). Le nombre de juvéniles par cocon produit dans les sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> ou aux NP TiO<sub>2</sub> ne diffère pas significativement des témoins (Anova, p=0,1 ; Tab. I).

**Tableau I.** Paramètres du test reproduction mesurés chez le ver de terre, *E. fetida*, exposé au sol témoin ou contaminé aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20 et 200 mg/kg). Une même lettre signifie qu'il n'y a pas de différences significatives (Anova, p<0,05 ; n=5)

	Témoin négatif	SPA TiO <sub>2</sub>		NP TiO <sub>2</sub>		
		2	20	2	20	200
Nombre de cocons produits par ver	6,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,6 <sup>a</sup>
Nombre de juvéniles produits par cocon	2,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
Taux d'éclosion des cocons (%)	93,0 ± 3,1 <sup>a</sup>	90,2 ± 7,8 <sup>a</sup>	94,7 ± 1,7 <sup>a</sup>	85,9 ± 6,3 <sup>a</sup>	86,5 ± 7,9 <sup>a</sup>	87,3 ± 4,5 <sup>a</sup>

### 2.3. Expression des ARNm des gènes du système immunitaire et de détoxification

Une exposition de 2 jours aux sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> ou aux NP TiO<sub>2</sub> ne modifie pas le niveau d'expression des ARNm des gènes du système immunitaire, fétidine (Anova, p=0,5) et CCF (Anova, p=0,3) (Fig.3a, b). De même, après 28 jours d'exposition, aucune variation d'expression n'a été observée pour la fétidine (Anova, p=0,2) et le CCF (Anova, p=0,9) (Fig.3a,

b)

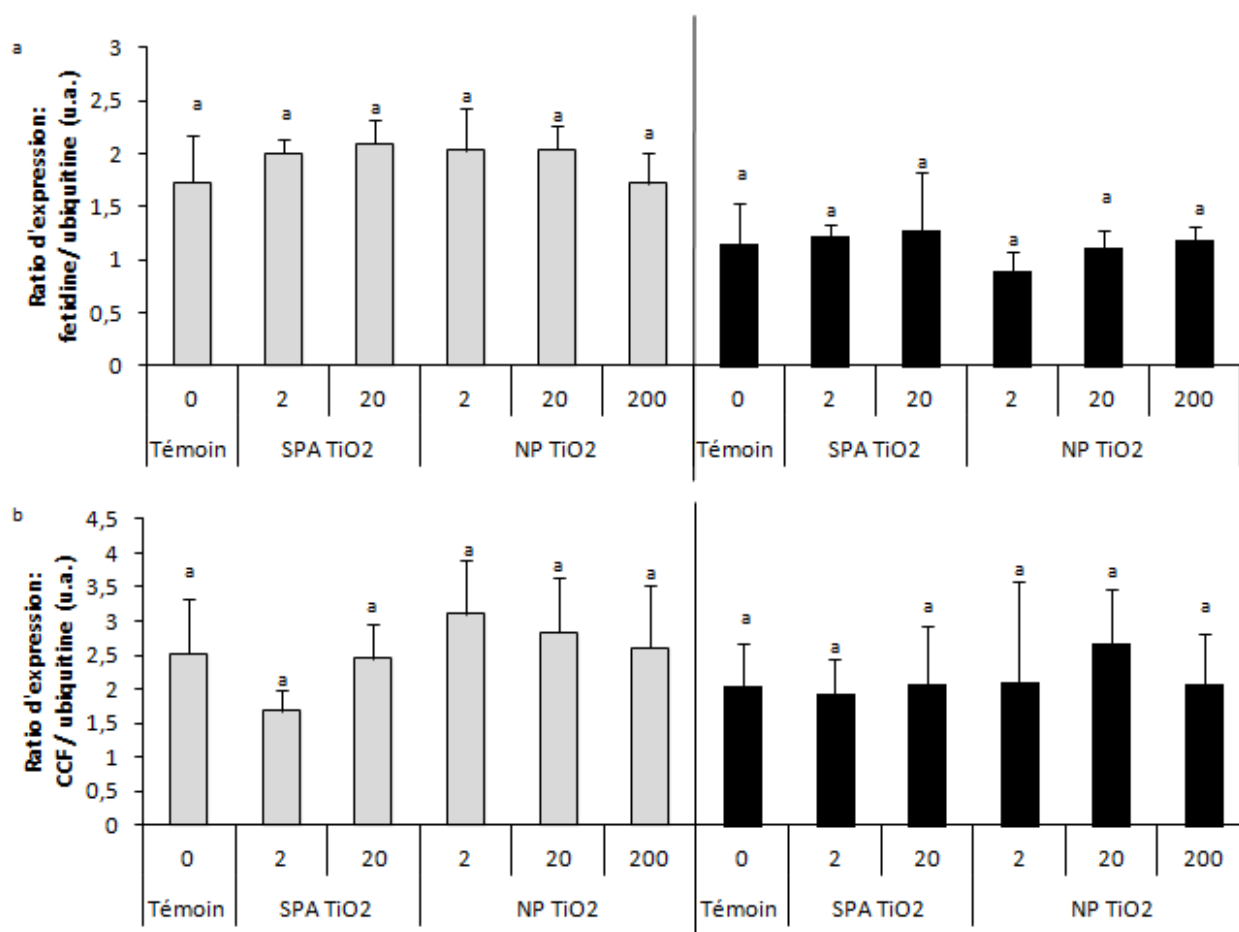


Figure 3. Niveaux d'expressions des ARNm (u.a. unités arbitraires) des gènes du système immunitaire (Fétidines, a; CCF, b) des cœlomocytes du ver *E. fetida* exposé à des sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20, 200 mg/kg) après 2 (gris) et 28 jours (noir). Une même lettre signifie qu'il n'y a pas de différences significatives (Anova, p<0,05 ; n=3)

Concernant le système de détoxification, le niveau d'expression de la MT n'a pas été modifié après 2 (Anova,  $p=0,6$ ) et 28 jours d'expositions (Anova,  $p=0,48$ ) aux sols contaminés par les différents nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  (Fig.4a). Les mêmes profils d'expression ont été observés pour la GST après 2 (Anova,  $p=0,1$ ) et 28 jours d'exposition (Anova,  $p=0,9$ ) (Fig.4b). Après 2 jours d'exposition, les cœlomocytes des vers exposés à 20 mg de SPA  $\text{TiO}_2/\text{kg}$  montrent une diminution significative de l'expression des ARNm de la SOD par rapport aux cœlomocytes des vers exposés aux sols contaminés aux NP  $\text{TiO}_2$  (3 concentrations testées) et à 2 mg SPA  $\text{TiO}_2/\text{kg}$  (Anova,  $p=0,009$  ; Fig.4c). En revanche, aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin (Fig.4c). Après 28 jours d'exposition aux sols contaminés aux NP  $\text{TiO}_2$  ou aux SPA  $\text{TiO}_2$ , ces variations ne sont pas maintenues, en effet, aucune variation significative n'a été mesurée (Anova,  $p=0,1$ ; Fig.4c).



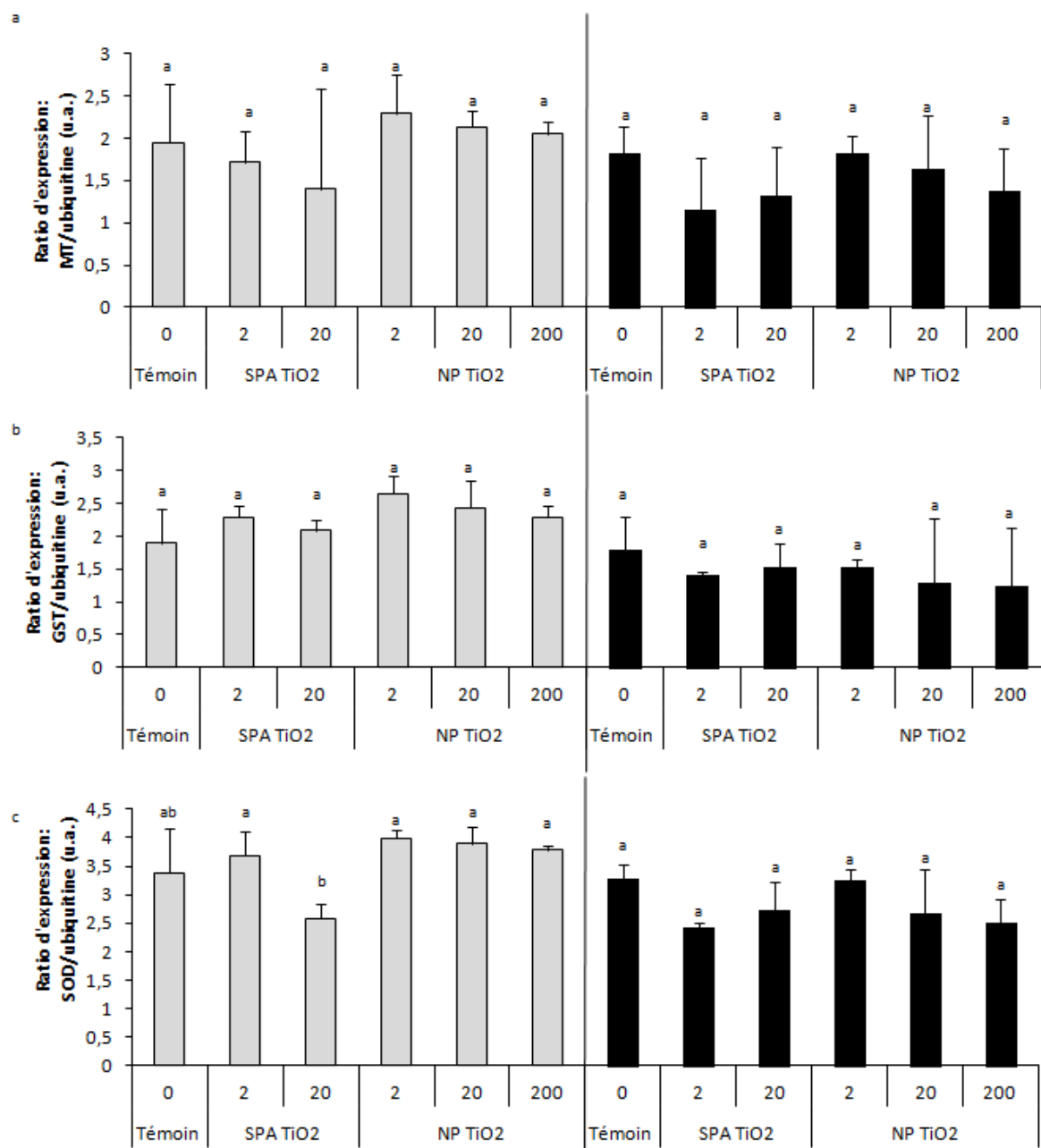


Figure 4. Niveaux d'expressions des ARNm (u.a. unités arbitraires) des gènes du système de détoxification et antioxydant (MT, a; GST, b; SOD, c) des cœlomocytes du ver *E. fetida* exposé à des sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> (2, 20 mg/kg) ou aux NP TiO<sub>2</sub> (2, 20, 200 mg/kg) après 2 (gris) et 28 jours (noir). Les lettres différentes indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant (Anova, p<0,05 ; n=3)

### 3. Discussion

Le but de notre étude était d'évaluer la toxicité des SPA de TiO<sub>2</sub> et des NP de TiO<sub>2</sub> sur le ver de terre, *E. fetida*, dans des sols contaminés. Les vers ont été exposés aux NP TiO<sub>2</sub> à des concentrations qui s'étendaient entre 2 et 200 mg/kg. Pour les SPA de TiO<sub>2</sub>, les vers n'ont pas pu être exposés à des concentrations supérieures à 20 mg/kg à cause de contraintes techniques qui n'ont pas permis de produire des suspensions de SPA TiO<sub>2</sub> plus concentrées pour contaminer les sols.

Les analyses physico-chimiques réalisées montrent que les teneurs totales en titane et en aluminium dans les sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> sont de même ordre que celles retrouvées dans les sols témoins. En effet, le dopage des sols contaminés aux SPA TiO<sub>2</sub> à 20 mg/kg est trop faible, il correspond à un ajout de l'ordre de 5,3 mg de titane et 0,35 mg d'aluminium, alors que les teneurs en titane et en aluminium dans les sols témoins sont de l'ordre de 122 ± 7 mg/kg et 38 ± 5 mg/kg, respectivement. Le dopage à 2 et 20 mg/kg n'est pas suffisant ce qui explique l'absence de bioaccumulation et d'effets biologiques sur les vers. Il aurait été intéressant de tester des concentrations plus importantes, cependant les contraintes techniques, et plus particulièrement la concentration de la suspension mère, n'ont pas permis de tester des concentrations plus fortes. En revanche, le dopage des sols artificiels aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> à la plus forte concentration (221 ± 4 mg/kg) a été suffisant puisque les teneurs totales en titane sont supérieures à celles retrouvées dans les sols témoins (122 ± 7 mg/kg). En effet, la concentration en dioxyde de titane ajoutée mesurée (env. 165 mg/kg) est légèrement plus faible que la concentration nominale (200 mg/kg). Le dopage aux NP de TiO<sub>2</sub> ne suffit pas pour que les vers bioaccumulent significativement le titane, ce qui explique certainement l'absence de réponses biologiques aux concentrations testées.

En effet, quel que soit la concentration et le type de nanomatériaux testés, la reproduction des vers n'a pas été affectée. Seule, une légère diminution de l'expression des ARNm de la SOD a été observée après 2 jours d'exposition à 20 mg de SPA TiO<sub>2</sub>/kg. D'autres études portant sur l'écotoxicité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> sur le ver de terre ont été réalisées. La bioaccumulation du titane ainsi que des effets biologiques tels que des dommages à l'ADN, l'augmentation de l'activité de la catalase et de la lipoperoxydation ont été observés chez *E. fetida* exposé 7 jours à des sols contaminés à des concentrations bien supérieures en NP TiO<sub>2</sub> (à partir de 1 g/kg) (Hu et al., 2010). En revanche, ces auteurs n'ont montré aucun effet sur l'activité de la SOD. Concernant les SPA de TiO<sub>2</sub>, aucun effet sur l'apoptose n'a été mesuré

chez les vers, *Lumbricus terrestris*, exposés 4 semaines à des sols contaminés à 15 mg SPA TiO<sub>2</sub>/kg (Lapied et al., 2011). En revanche, ces auteurs ont montré que lors d'une exposition en milieu liquide, l'activité apoptotique dans les tissus des vers exposés 7 jours à 100 mg/l de SPA TiO<sub>2</sub> était significativement plus élevée que dans les tissus des vers témoins. Lors d'une exposition en milieu liquide, nous avons montré une augmentation de l'expression des ARNm de la MT et SOD, de l'apoptose et une diminution de la phagocytose après une exposition de 24 heures d'*E. fetida* à 10 mg SPA TiO<sub>2</sub>/l (Bigorgne et al., 2011). Ces résultats soulignent le fait que les nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> semblent plus biodisponibles en milieu liquide que dans les sols. Des résultats similaires ont été observés avec les NP d'argent qui induisent des effets apoptotiques 2 à 4 fois supérieures dans les vers exposés en milieu liquide par rapport à ceux exposés à des sols contaminés (Lapied et al., 2010). Il est possible que les particules soient séquestrées par la matière organique ou les argiles et qu'elles ne soient plus disponibles pour les organismes. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la biodisponibilité des ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> (SPA et NP) en étudiant leur comportement et leur devenir dans les sols artificiels.

De rares travaux ont déjà étudié la mobilité des NP de TiO<sub>2</sub> dans des matrices solides en utilisant des expériences appelées « batch attachment experiment » (Lecoanet et al., 2004; Fang et al., 2009; Solovitch et al., 2010). Cette technique a été utilisée avec du sable et il a été montré que la plupart des NP de TiO<sub>2</sub> sont attachés au sable (charges de surface opposées) à des pH faibles, et que cette affinité diminue avec l'augmentation du pH pour une force ionique de 10<sup>-3</sup>M (Solovitch et al., 2010). Cette étude a également mis en évidence d'importants dépôts de NP TiO<sub>2</sub> (80-120 µm) distribués aléatoirement dans le milieu poreux en utilisant la micro-spectroscopie fluorescence X. Le comportement des NP de TiO<sub>2</sub> (anatase, 35 nm) a été étudié dans un sol naturel en utilisant la technique des colonnes de sol (Fang et al., 2009). Ces auteurs montrent que des sols avec des teneurs en argiles de l'ordre de 32 à 45% retiennent les NP de TiO<sub>2</sub>. Le carbone dissout, les teneurs en argiles, le potentiel zeta et la force ionique semblent être les principales propriétés des sols qui modifient la mobilité des NP de TiO<sub>2</sub>. La matière organique est connue pour diminuer la disponibilité des métaux dans les sols. En effet, les interactions entre les NP et la matière organique naturelle (MON) peuvent modifier la mobilité et l'état d'agrégation des NP de TiO<sub>2</sub> dans un milieu naturel liquide (Chen et Elimelech, 2007). Par exemple, une concentration en acide fulvique supérieure à 1 mg/l induit une diminution de l'agrégation des NP de TiO<sub>2</sub> (Domingos et al., 2009). Les suspensions de NP en présence de NOM sont généralement stables grâce à

l'augmentation des répulsions électrostatiques et stériques (Deonarine et al., 2011; Thio et al., 2011). La présence de NOM peut ainsi modifier les propriétés physico-chimiques des NP en les enrobant et par conséquent diminuer leur biodisponibilité et toxicité (Lee et al., 2011).

Comme nous n'avons pas observé d'effets biologiques sur les vers de terre, nous pouvons supposer que les particules de  $\text{TiO}_2$  ont été retenues par l'argile ou qu'elles ont été enrobées par la matière organique ce qui a diminué la biodisponibilité de ces particules. Nous envisageons d'étudier la mobilité des NP de  $\text{TiO}_2$  et des SPA de  $\text{TiO}_2$  en utilisant des colonnes de sol selon les protocoles de Fang et al (2009) et Solovitch et al. (2010) avec quelques modifications. Les résultats obtenus dans notre étude sont en concordance avec le Quotient Risque (PEC/PNEC) calculé pour les NP  $\text{TiO}_2$  par Gottschalk et al. (2009). Le Quotient Risque (RQ) dans les sols et les sols traités par les boues de station d'épuration est estimé à 0.004 et 0.3 en Europe ce qui suggère un très faible risque pour les organismes à l'heure actuelle. Cependant, une première étude a montré la biomagnification des nanoparticules à travers la chaîne trophique terrestre (Judy et al., 2011). Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires car le RQ pour les NP de  $\text{TiO}_2$  dans les effluents de stations d'épuration a déjà atteint 3.5 en Europe. Il apparaît donc essentiel de développer des analyses physico-chimiques supplémentaires et de réaliser des biomonitoring afin de s'assurer que les boues de stations d'épuration épandues sur les sols agricoles n'ont pas d'effets sur la qualité des sols à long terme.

## Références

- Bigorgne, E., Foucaud, L., Caillet, C., Giambérini, L., Nahmani, J., Thomas, F., Rodius, F., submitted to Journal of Nanoparticle Research. Cellular and Molecular responses of *E. fetida* coelomocytes exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles.
- Bigorgne, E., Foucaud, L., Lapied, E., Labille, J., Botta, C., Sirguy, C., Falla, J., Rose, J., Joner, E.J., Rodius, F., Nahmani, J., 2011. Ecotoxicological assessment of TiO<sub>2</sub> byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. Environmental Pollution 159, 2698-2705.
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. Journal of Colloid and Interface Science 309, 126-134.
- Deonaraine, A., Lau, B.L.T., Aiken, G.R., Ryan, J.N., Hsu-Kim, H., 2011. Effects of Humic Substances on Precipitation and Aggregation of Zinc Sulfide Nanoparticles. Environmental Science & Technology 45, 3217-3223.
- Domingos, R.F., Tufenkji, N., Wilkinson, K.J., 2009. Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. Environmental Science & Technology 43, 1282-1286.
- Fang, J., Shan, X.-q., Wen, B., Lin, J.-m., Owens, G., 2009. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. Environmental Pollution 157, 1101-1109.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. Environmental Science & Technology 43, 9216-9222.
- Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J., Yang, L.Y., 2010. Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biology and Biochemistry 42, 586-591.
- International Organization for Standardization (ISO 11268-2), 1998. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) -- Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.
- Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. Environmental Science & Technology 45, 776-781.
- Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). Nanomedicine 5, 975-984.
- Lapied, E., Nahmani, J.Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2011. Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. Environment International 37, 1105-1110.
- Lecoanet, H.F., Bottero, J.-Y., Wiesner, M.R., 2004. Laboratory Assessment of the Mobility of Nanomaterials in Porous Media. Environmental Science & Technology 38, 5164-5169.

Lee, S., Kim, K., Shon, H., Kim, S., Cho, J., 2011. Biototoxicity of nanoparticles: effect of natural organic matter. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 3051-3061.

R, Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Solovitch, N., Labille, J., Rose, J., Chaurand, P., Borschneck, D., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2010. Concurrent Aggregation and Deposition of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in a Sandy Porous Media. *Environmental Science & Technology* 44, 4897-4902.

Thio, B.J.R., Zhou, D., Keller, A.A., 2011. Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 189, 556-563.

# *Discussion*

L'évaluation de la toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> est devenue une priorité du fait de leur utilisation exponentielle dans les produits de consommation. Par exemple, elles sont fréquemment intégrées dans les crèmes solaires pour leurs propriétés d'absorption des UV. La surface des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> est alors modifiée pour empêcher l'effet photocatalytique et la production d'ERO (Wakefield et al., 2004; Reijnders, 2006; Lee et al., 2007). Ces nanoparticules sont ensuite enrobées de polymères lipophiles pour faciliter leur dispersion dans les crèmes solaires et elles constituent alors des nanocomposés de TiO<sub>2</sub>, comme le T-lite SF<sup>TM</sup> utilisé dans notre étude. L'usage de ces nanocomposés et des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> entraîne généralement leur déversement dans l'environnement et plus particulièrement dans les effluents de traitements des eaux et dans les sols traités par l'épandage des boues de stations d'épuration (Kiser et al., 2009; Aschberger et al., 2011; Johnson et al., 2011). Il apparaît donc essentiel d'évaluer les risques environnementaux des nanomatériaux non seulement par des études utilisant les nanoparticules mais aussi les produits issus du cycle de vie des nanomatériaux commercialisés (Ostertag et Hüsing, 2008; Som et al., 2010).

Alors que la toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> a été largement étudiée, celle des nanocomposés de TiO<sub>2</sub> et de leur sous-produits d'altération (SPA) est encore **largement méconnue** (Pan et al., 2009; Wiench et al., 2009). A notre connaissance, l'écotoxicité des SPA n'a été évaluée que sur la plante, *Vicia faba* (Foltête et al., 2011) et le ver de terre *Eisenia fetida* (Bigorgne et al., 2011; Lapied et al., 2011) au sein du projet Nanoalter. Les travaux sur la plante *Vicia faba* montrent une diminution des activités de la glutathion réductase (50 mg/l) et de l'ascorbate peroxydase (5 et 25 mg/l) dans les racines et une internalisation du titane dans les tissus racinaires superficiels après 48 h d'exposition aux SPA à pH 6,5 (Foltête et al., 2011). Dans ces mêmes conditions à 25 mg/l (pH 6,5), les SPA TiO<sub>2</sub> induisent chez *E. fetida* une augmentation de l'apoptose qui semble être liée à la bioaccumulation du titane (Lapied et al., in preparation). Nous avons montré que les cellules les plus sensibles aux SPA sont les cellules chloragènes, de la cuticule et de l'épithélium intestinal car elles présentent une densité de cellules apoptotiques plus importante que les cellules musculaires. Ces résultats suggèrent une contamination des vers par voie dermique et orale.



C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nos recherches se sont focalisées sur l'impact des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub>. Ces travaux ont pour but d'évaluer leur biodisponibilité et leur écotoxicité à différentes échelles biologiques chez le ver de terre, *Eisenia fetida*.

Pour atteindre cet objectif, quatre hypothèses ont été testées:

***H1 : Dans les milieux d'exposition, les nanomatériaux ont tendance à s'agréger bien qu'une proportion de particules reste à l'échelle nanométrique. Cette proportion diminue à mesure que le milieu d'exposition se complexifie.***

Au cours de ces travaux, trois modes d'expositions ont été utilisés. Dans un premier temps, une exposition des cellules immunitaires de vers aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> a été réalisée. Ce test *in vitro* réalisé sur des cultures primaires avait pour but de permettre la mise en contact entre les cellules et les nanoparticules dans des conditions physico-chimiques contrôlées. Ce type d'approche *in vitro* peut être envisagé pour mettre en évidence une toxicité potentielle des contaminants avant de réaliser des expositions *in vivo*. Le milieu de culture est un milieu liquide complexe qui a nécessité l'utilisation de technique de caractérisation pour contrôler l'état de dispersion des nanoparticules. Il est composé principalement de MEM (85%), HEPES (1%) et sérum de veau fœtal (SVF) (10%). Le comportement des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> a été étudié en mesurant la turbidité, la taille unitaire des nanoparticules par MET, et en évaluant la distribution de taille. Les analyses par DLS ont montré **une agrégation drastique et rapide des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>** (env. 1000 nm) dans le MEM qui est principalement composé de sels. L'ajout d'HEPES, molécule organique tampon, ne modifie pas le comportement des nanoparticules. Ces résultats sont confirmés par les mesures de turbidité qui montrent une diminution de la turbidité des suspensions suite à l'augmentation de la taille des particules et à leur sédimentation. L'agrégation des particules est certainement expliquée par la forte concentration en chlorure de sodium (6,8 g/l) dans le MEM qui serait responsable de l'instabilité de la dispersion de nanoparticules. Il est bien connu que les sels modifient le comportement des nanoparticules et induisent leur agrégation en modifiant la force ionique des milieux (Jiang et al., 2009). En revanche, l'ajout de sérum de veau fœtal au milieu de culture **améliore la dispersion** des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> avec une taille de l'ordre de 135 nm proche de celle mesurée par MET. La stabilité de la dispersion est confirmée par une turbidité stable en fonction du temps.

Plusieurs travaux ont déjà montré que la présence de sérum de veau fœtal favorisait la dispersion des nanoparticules (Murdock et al., 2008; Allouni et al., 2009). **Les cœlomocytes étaient donc exposés à des nanoparticules TiO<sub>2</sub> dispersées et stables en suspension.**

Dans un deuxième temps, une exposition *in vivo* en condition aqueuse a été choisie pour tester la potentielle toxicité des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub>. En effet, des vers ont été exposés à un milieu liquide constitué d'eau ultrapure et d'eau minérale (1/1 ; v/v). La cinétique de la distribution de taille montre que **les SPA de TiO<sub>2</sub> s'agrègent** au cours du temps pour former des particules **de taille micrométrique (>10 µm) peu stable**. En revanche, la proportion de particules inférieures à 780 nm reste relativement stable au cours du temps. Nos résultats de turbidité ont mis en évidence que **l'agrégation et la sédimentation sont plus fortes lorsque les milieux sont plus concentrés.**

Après ces expositions *in vitro* et en milieu liquide permettant un bon suivi du devenir et du statut des NP et SPA et une évaluation de leur toxicité potentielle, les vers ont été exposés dans des sols artificiels, ce qui constitue des conditions environnementales plus réalistes. Le sol artificiel utilisé est un sol normalisé composé principalement de sable, d'argile et de matière organique. Les suspensions de nanoparticules ou de sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> utilisées pour doper les sols étaient stables et dispersées. Les analyses physico-chimiques (ICP-AES) réalisées montrent que les teneurs totales en titane et en aluminium dans les sols contaminés au SPA TiO<sub>2</sub> sont du même ordre que celles retrouvées dans les sols témoins. **Le dopage à 2 et 20 mg/kg n'est donc pas suffisant pour être détecté.** La concentration de la suspension-mère était trop faible pour tester des concentrations plus importantes. En revanche, le dopage des sols artificiels aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> à la plus forte concentration (221 ± 4 mg/kg) **a été suffisant pour être détecté** puisque les teneurs totales en titane sont supérieures à celles retrouvées dans les sols témoins (122 ± 7 mg/kg). Néanmoins, la biodisponibilité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> est certainement très faible.

Le pH (Ma et al., 1983; Morgan et Morgan, 1988; Corp et Morgan, 1991; Janssen et al., 1997), la CEC (Morgan et Morgan, 1988; Corp et Morgan, 1991; Lock et Janssen, 2001), la teneur en matière organique (Ma et al., 1983; Corp et Morgan, 1991), la taille et le type des particules d'argiles (Janssen et al., 1997) sont les principales propriétés des sols qui modifient la biodisponibilité des métaux. Quelques études ont évalué le comportement des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> dans les matrices solides. Les Matières Organiques Naturelles (MON)

peuvent modifier les propriétés de surface des nanoparticules, favoriser l'agrégation et diminuer leur biodisponibilité (Wiesner et Bottero, 2007). Les acides humiques peuvent diminuer l'agrégation des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (Domingos et al., 2009). L'étude de la mobilité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans des matrices solides est quant à elle en plein développement (Fang et al., 2009; Solovitch et al., 2010). Le pH et la force ionique sont deux facteurs qui modifient la mobilité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans des sols poreux (Solovitch et al., 2010). En effet, pour des pH faibles (3,6), les charges entre les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et les particules de sable sont opposées et la rétention des nanoparticules est presque totale, alors qu'à pH 8 les NP et particules de sable sont chargées négativement, seules 5% des nanoparticules sont retenues. Ces auteurs montrent que l'agrégation des nanoparticules, leur affinité pour les particules de sable et leur taux de rétention augmente avec la force ionique. Le contenu en TiO<sub>2</sub> dans la suspension de sol est corrélé positivement avec la teneur en carbone organique dissout et les teneurs en argiles présents dans le sol, et corrélé négativement avec le pH, la force ionique et le potentiel zêta (Fang et al., 2009). **Ces travaux soulignent l'importance de contrôler les paramètres physico-chimiques des sols dopés pour pouvoir évaluer la biodisponibilité des nanomatériaux.**

⇒ **Conclusion :** La présence de sels dans les milieux liquides favorise l'agrégation des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>. L'ajout de dispersants (ex : SVF) permet d'obtenir des suspensions stables de taille nanométrique en milieu liquide. La complexité des matrices solides nécessite des analyses supplémentaires pour comprendre la mobilité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>.

## ***H2 : Ces particules nanométriques sont biodisponibles pour les vers de terre***

Lors d'exposition *in vitro*, nos résultats ont montré que les nanoparticules TiO<sub>2</sub> de taille de 130 nm ont **été internalisées** par les cœlomocytes dès 4 heures d'exposition et intégrées dès 24 heures d'exposition par des mécanismes d'endocytose (Bigorgne et al., submitted to Journal of Nanoparticle Research). Ces nanoparticules sont présentes dans le cytoplasme et majoritairement localisées dans les **lysosomes** des cœlomocytes.

Bien qu'en milieu liquide, la taille des SPA TiO<sub>2</sub> peut atteindre une taille micrométrique, **une bioaccumulation significative de titane** a été mesurée chez les vers exposés à la plus forte concentration (25 mg/l) après 24 heures. La micro spectroscopie à fluorescence X a mis en évidence le titane au niveau du tissu digestif du ver. Cette technique ne permet pas de savoir si les SPA de TiO<sub>2</sub> sont présentes dans la lumière du tube digestif ou internalisées par les cellules digestives. Le ver *L. terrestris* exposé aux SPA TiO<sub>2</sub> a montré la présence de titane dans le tube digestif par analyses de coupes histologiques par microspectroscopie à fluorescence X (Lapied et al., 2011). Cependant, l'analyse de ces coupes par microscopie optique a révélé que le titane était situé dans la lumière du tube digestif au niveau de résidus de sols non éliminés au cours de la dépuración des vers. En effet, il est important de rappeler que le titane est naturellement présent dans les sols. Contrairement à nos travaux où seul le titane est bioaccumulé par les vers, l'étude sur la plante *V. faba* montre la bioaccumulation du titane et de l'aluminium par les racines après 48 heures d'exposition à une suspension de SPA de TiO<sub>2</sub> constituée principalement de particules de taille supérieure à 10 µm (Foltête et al., 2011). La technique de µ-XRF a pu révéler uniquement la présence de titane dans les tissus périphériques racinaires sans permettre toutefois de déterminer s'il avait été internalisé par les cellules. **Les analyses de teneurs en métaux dans les organismes doivent donc être considérées avec précaution sans une localisation précise des nanomatériaux.**

Lors des expositions dans des sols contaminés aux SPA ou aux NP TiO<sub>2</sub>, nous avons montré que les vers **ne bioaccumulent pas** le titane ou l'aluminium (pour les SPA). Les analyses physico-chimiques des sols montrent que les concentrations testées en SPA (<20 mg/kg) sont trop faibles pour doper significativement les sols ce qui explique l'absence de bioaccumulation de titane et d'aluminium par les vers. En revanche, bien que les sols contaminés aux NP de TiO<sub>2</sub> contiennent un dopage de l'ordre de 165 mg/kg par rapport aux sols témoins, les vers n'ont pas bioaccumulé le titane ce qui est certainement dû à la **faible**

**biodisponibilité des nanoparticules** dans les matrices solides. Une bioaccumulation faible mais significative du titane a été observée dans les vers, *E. fetida*, exposés 7 jours à des sols artificiels contaminés aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> à des concentrations largement supérieures (1 et 5 g/kg) à celles testées dans notre étude (2 - 200 mg/kg) (Hu et al., 2010).

⇒ **Conclusion :** Les nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> de taille nanométriques ou micrométriques semblent biodisponibles pour les organismes biologiques dans des conditions d'exposition *in vitro* ou liquide. La complexité des matrices solides diminuent drastiquement leur biodisponibilité.

### ***H3 : Leur internalisation et/ou bioaccumulation induit des effets toxiques aux échelles moléculaire, cellulaire et individuelle***

Lors de l'exposition *in vitro*, nos résultats ont montré que l'internalisation de ces nanoparticules dans des lysosomes ou phagolysosomes **ne modifie pas les biomarqueurs cellulaires** testés : la phagocytose et la viabilité des cœlomocytes. En revanche, elles engendrent des **modifications significatives des biomarqueurs moléculaires** comme l'expression des ARNm des gènes du système immunitaire et de détoxication. En effet, l'expression des fétidines est augmentée dès 4 heures d'exposition *in vitro* des cœlomocytes. L'augmentation n'est pas dose-dépendante mais la réponse immunitaire humorale des cœlomocytes semble perturbée par la présence des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ville et al. (1995) qui montrent que la présence de xénobiotiques a tendance à stimuler l'activité humorale des cœlomocytes des vers. Les fétidines sont des protéines mélangées au mucus qui constituent une barrière antibactérienne externe (Cooper et al., 2004). Seules les bactéries pathogènes sont connues pour induire l'expression des fétidines (Lassègues et al., 1989), il est alors possible que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> induisent l'expression des fétidines via un mécanisme indirect. En revanche, l'expression du CCF, une protéine de reconnaissance des LPS, est diminuée aux deux plus fortes concentrations après 4 heures d'exposition. Ces résultats laissent supposer une possible interaction entre les nanoparticules et les LPS, ce qui modifierait la surface de charge des LPS et par conséquent diminuerait la reconnaissance du LPS par le site du CCF. Il a été démontré que l'ajout de

bactéries Gram-, Gram+ ou de LPS augmente l'expression du CCF (Köhlerová et al., 2004). Concernant les gènes de détoxication, l'expression des ARNm de la métallothionéine est induite aux deux plus fortes concentrations à 12 heures d'exposition. Aucun effet dose-réponse n'a été observé.

Au cours de l'exposition en milieu liquide, nous avons montré que l'immersion des vers, *E. fetida*, pendant 24 heures dans une suspension à 10 mg SPA TiO<sub>2</sub>/l suffit pour **altérer la réponse de biomarqueurs cellulaires et moléculaires**. En effet, une diminution de la phagocytose ainsi qu'une induction de l'apoptose et de l'expression des ARNm de la MT et de SOD ont été mesurées (Bigorgne et al., 2011). Ces effets peuvent être expliqués par la production d'ERO par les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> libérées de leur enrobage d'aluminium, suite à une possible altération des SPA au contact des vers. Bien que nos expositions soient réalisées à l'obscurité, les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent présenter des effets photocatalytiques en l'absence de lumière (Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006; Reeves et al., 2008). De plus, les modifications de la réponse biologique des vers semblent être liées à la bioaccumulation du titane dans les tissus des vers. Une augmentation de l'activité apoptotique a été également observée chez le ver *Lumbricus terrestris* exposé à 100 mg/l de SPA TiO<sub>2</sub> pendant 7 jours (Lapied et al., 2011).

En revanche, lors d'exposition de vers dans des sols contaminés, les nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> (SPA ou NP) **n'induisent aucun effet tant à l'échelle individuelle (survie, reproduction), que moléculaire (gènes des systèmes de détoxication, antioxydant et immunitaire)**. Une étude réalisée sur le ver *L. terrestris* exposé à un sol contaminé aux SPA (15 mg/kg) montre que ces particules n'ont pas d'effet sur l'apoptose des vers (Lapied et al., 2011). Ces auteurs supposent une faible biodisponibilité des SPA en matrice solide. Des expériences réalisées dans des conditions proches de celles de nos travaux montrent que le ver *Eisenia fetida* est sensible aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (rutile) à des concentrations supérieures à 1 g/kg (Hu et al., 2010). En effet, ces auteurs montrent des effets génotoxiques et une augmentation de l'activité enzymatique antioxydante de la catalase après 7 jours d'exposition. Il est important de noter que les effets biologiques mesurés dans les travaux de Hu et al. (2010) sont observés à des concentrations en nanoparticules de TiO<sub>2</sub> irréalistes et très largement supérieures (1 et 5 g/kg) à celles qui peuvent être retrouvées dans l'environnement (0,4 – 4,8 µg/kg) (Mueller et Nowack, 2008). **Il est donc important d'examiner les effets de ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> à des concentrations réalistes**. Bien que les nanoparticules de

TiO<sub>2</sub> aient des effets toxiques à des concentrations extrêmes, aucun effet biologique n'a été observé dans notre étude où les concentrations nominales testées (2, 20, 200 mg/kg) étaient proches de celles mesurées dans les boues de stations d'épurations (100 - 800 mg/kg) utilisées pour l'épandage (Gottschalk et al., 2009).

⇒ **Conclusion :** La présence de nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> dans les systèmes biologiques modifie leur fonctionnement.

#### ***H4 : Les biomarqueurs moléculaires sont plus pertinents et sensibles que ceux mesurés aux échelles cellulaires et individuelles***

Les travaux réalisés au cours de cette étude montrent la sensibilité de certains biomarqueurs en présence de TiO<sub>2</sub> (Fig.20). Bien que les nanoparticules et les SPA de TiO<sub>2</sub> présentent des propriétés physico-chimiques différentes en termes de structure cristalline, de surface et de taille, l'expression des ARNm de la métallothionéine apparaît comme un biomarqueur sensible à la présence de particules de TiO<sub>2</sub>. En effet, les cœlomocytes et les tissus digestifs montrent une augmentation de l'expression de la MT suite à l'exposition aux nanomatériaux de TiO<sub>2</sub>. **La métallothionéine peut être considérée comme un outil prédictif pour évaluer la présence des nanoparticules et des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> sur les vers de terre.** Bien que les nanoparticules de dioxyde de titane soient connues pour produire des ERO, seules les SPA TiO<sub>2</sub> ont induit l'expression des ARNm de la SOD. Les différences de propriétés de surface, de structure cristalline et de taille des particules de TiO<sub>2</sub> testées expliquent certainement leur différence de capacité à produire des effets photocatalytiques.

Parmi les marqueurs du système immunitaire, **la phagocytose apparaît sensible à la présence de SPA TiO<sub>2</sub>** (Fig.20). Ils induisent une diminution de l'activité phagocytaire, ce qui est caractéristique de la réponse cellulaire en présence de contaminants. En effet, de nombreux métaux et autres contaminants entraînent la diminution de l'activité phagocytaire des cœlomocytes (Fugère et al., 1996; Sauvé et al., 2002; Sauvé et Fournier, 2005). Actuellement très peu de travaux évaluent la réponse de la phagocytose en présence de nanomatériaux. Des tests *in vitro* (Renwick et al., 2001) ou *in vivo* (Renwick et al., 2004)

montrent que les particules ultrafines de TiO<sub>2</sub> (29 nm) induisent une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages. D'après ces auteurs, l'impact des nanoparticules sur les cellules semble indirect et indépendant de la taille des particules. Dans nos travaux, les nanoparticules ne modifient pas la phagocytose des cellules exposées *in vitro* alors que les SPA de TiO<sub>2</sub> entraînent sa diminution après une exposition *in vivo* en milieu liquide. Cette observation suggère que les particules de SPA de TiO<sub>2</sub> pourraient altérer la capacité de phagocytose des cœlomocytes de manière indirecte via des facteurs humoraux ou par un composé autre que le TiO<sub>2</sub>. Il a été montré que des nanoparticules composées d'un même élément métallique peuvent avoir des effets différents sur la phagocytose (Wagner et al., 2007). Les différences de propriétés de surface et d'enrobage des nanoparticules et des SPA TiO<sub>2</sub> peuvent expliquer les différences de réponses.

Contrairement à la réponse de la viabilité cellulaire où aucun effet n'a été observé, **les marqueurs moléculaires de la réponse immunitaire humorale se sont révélés particulièrement sensibles à la présence des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> en condition *in vitro*** (Fig.20). En effet, les fétidines ont répondu aux trois temps testés à des concentrations différentes, alors que le CCF a répondu rapidement pour se stabiliser à plus long terme. Ces biomarqueurs ont été testés uniquement dans des conditions *in vitro*, d'autres tests seraient nécessaires pour valider la sensibilité de ces biomarqueurs.



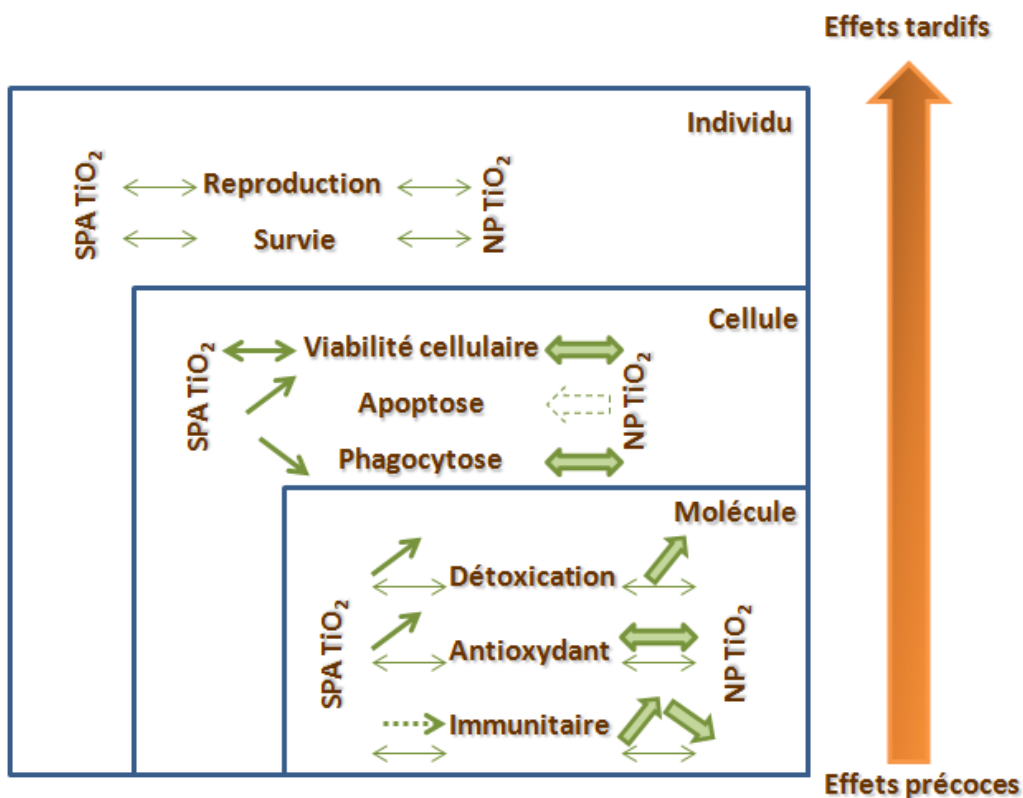


Figure 20. Schéma des réponses des différents biomarqueurs des vers de terre aux NP et aux SPA de  $\text{TiO}_2$  dans différentes conditions d'exposition: les flèches pleines pour le test *in vitro*, les flèches épaisses pour l'exposition en milieu liquide et les flèches fines pour l'exposition en sol. Les pointillés correspondent aux conditions non testées

⇒ **Conclusion** : Dans le cadre de nos travaux, nous avons pu montrer que les biomarqueurs moléculaires de détoxification (méthallothionéines) sont sensibles aux nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  dans des conditions où ils sont biodisponibles (*in vitro* ou liquide). Contrairement à des contaminants classiques, l'ensemble des résultats obtenus au cours des travaux montrent que les effets des nanomatériaux de  $\text{TiO}_2$  ne sont pas dose-réponse.

*Conclusion*

*Perspectives*

Les études concernant l'écotoxicité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> sont en plein essor, mais très peu de travaux étudient le devenir des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> dans l'environnement et leur potentielle toxicité sur les invertébrés terrestres. Cette étude avait pour but d'évaluer l'écotoxicité des nanoparticules et des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> sur le ver de terre utilisé classiquement en écotoxicologie, *E. fetida*. Un ensemble de biomarqueurs à différents niveaux biologiques ont été mesurés en réponse aux nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> testés en utilisant différentes approches. Bien que les marqueurs moléculaires se soient révélés au cours de nos recherches être des outils sensibles et potentiellement prédictifs de la toxicité des nanoparticules et des sous-produits d'altération de TiO<sub>2</sub> dans des conditions d'expositions artificielles (*in vitro* et liquide), ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> n'ont pas modifié les réponses biologiques des vers de terre dans des matrices solides contaminées à des concentrations proches de celles retrouvées dans des boues de stations d'épuration. La très faible biodisponibilité de ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> semble être le facteur responsable de l'absence d'effets biologiques.

Ces travaux mettent en évidence 3 paramètres essentiels à considérer pour permettre une évaluation pertinente des risques des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> pour l'environnement:

- la nécessaire caractérisation physico-chimiques des nanomatériaux incluant la connaissance de leur principales propriétés physico-chimiques (propriété de surface, taille, potentiel zêta) et de leur mobilité dans les milieux testés.
- l'évaluation de la biodisponibilité des nanomatériaux en mesurant les teneurs en métaux dans les milieux d'exposition et l'évaluation de la bioaccumulation suivie d'une localisation par des techniques de microscopie pour s'assurer de la présence des nanomatériaux dans les cellules.
- l'évaluation de l'écotoxicité de ces nanomatériaux en utilisant une batterie de biomarqueurs qui s'étendent de l'échelle moléculaire à celle de l'individu, voir populationnelle, tout en s'assurant que les nanomatériaux n'interfèrent pas avec les milieux réactionnels des tests biologiques.

La combinaison de ces 3 paramètres, Caractérisation-Biodisponibilité-Ecotoxicité, est devenue essentielle dans les études de nano-écotoxicologie pour comprendre le potentiel danger des nanomatériaux suite à leur utilisation et rejet dans l'environnement.

Ces premiers travaux sur les nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> ouvrent de nombreuses perspectives sur le développement de biomarqueurs plus sensibles et sur des expérimentations plus proches des conditions environnementales (ex : mésocosmes).

Dans le cadre de nos travaux, une étude complémentaire sur la mobilité des nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> dans le sol artificiel utilisé doit être réalisée afin de comprendre leur devenir dans les sols et leur biodisponibilité. Il est envisagé d'étudier la mobilité des SPA de TiO<sub>2</sub> en utilisant des colonnes de sol selon les protocoles de Fang et al. (2009) et Solovitch et al. (2010) avec quelques modifications. En effet, la réalisation de 3 colonnes serait nécessaire: une première avec du sable, la seconde avec sable et argile et la dernière avec sable, argile et tourbe. Cette technique consiste à comparer la concentration en particules dans la suspension avant l'injection et à la sortie de la colonne, ce qui permettrait d'évaluer la fraction mobile des particules. L'affinité des SPA TiO<sub>2</sub> et des NP de TiO<sub>2</sub> pour les différentes composantes du sol serait déterminée en comparant les résultats obtenus à la sortie de chaque colonne.

Par ailleurs, suite à cette étude, la sensibilité de l'apoptose, biomarqueur cellulaire, aux sous produits d'altération de TiO<sub>2</sub> suscite l'intérêt de rechercher les séquences des gènes pro-apoptotiques (Bax) et anti-apoptotiques (ex : Bcl-2) chez le ver, *E. fetida*, afin de pouvoir prédire la toxicité de ces nanomatériaux en évaluant leur expression en tant que biomarqueurs moléculaires prédictifs. Le développement de ce type de biomarqueurs permet d'anticiper les effets au niveau populationnel, souvent irréversibles.

Au commencement de cette thèse, peu d'études avaient été réalisées pour évaluer les effets des nanomatériaux sur les vers. C'est pourquoi, nous avons souhaité mener une approche multi disciplinaire (physico-chimie des nanoparticules, immunologie et génétique) et multi scalaire (des gènes aux individus). Pour aborder les effets des nanoparticules à ces différentes échelles biologiques et notamment sur les gènes, le ver de fumier, *Eisenia fetida*, constituait un macroinvertébré du sol adapté à ce type d'étude; du fait du séquençage d'un grand nombre de ses gènes. Cependant, il serait intéressant de travailler également avec des **espèces communes et plus représentatives** de nos sols comme *Lumbricus rubellus*, *L. terrestris*, *Aporrectodea caliginosa*, *A. longa* ou encore *Allolobophora tuberculata*. En effet, la réponse d'un biomarqueur pour un contaminant peut être différente selon les espèces (Spurgeon et al., 2000; Fourie et al., 2007; Maleri et al., 2008b). Il est d'ailleurs généralement recommandé d'utiliser plusieurs espèces dans les tests écotoxicologiques pour avoir une meilleure gestion

environnementale et pour avoir des procédures d'évaluation des risques écologiques plus précises (Van Straalen, 2002). Il faudrait donc accentuer nos efforts sur la recherche des gènes de ces espèces, et renforcer les études écotoxicologiques aux échelles cellulaires, individuelles et populationnelles. Par ailleurs, pour ces espèces, le dopage de sols devrait se faire dans des **sols naturels** et sans doute sur des temps d'exposition plus long que ceux choisis pour *E. fetida* (qui a un cycle de vie plus rapide). Il serait intéressant également d'évaluer l'impact des nanomatériaux sur les descendants des vers exposés en évaluant les potentiels effets reprotoxiques et/ou tératogènes. Il est bien connu que les vers de terre sont des organismes fouisseurs et décomposeur qui participent au bon fonctionnement de l'écosystème terrestre. Cependant, une altération de leur reproduction et de l'état de santé de la descendance des vers de terre pourrait entraîner des changements irréversibles sur la qualité du fonctionnement de l'écosystème terrestre.

Les vers de terre sont également des organismes clés dans la chaîne alimentaire. Une première étude a mis en évidence la biomagnification de nanoparticules d'or dans la chaîne trophique entre un producteur primaire (*Nicotiana tabacum*) et un consommateur primaire (*Manduca sexta*) (Judy et al., 2011). L'étude du transfert de ces nanomatériaux de TiO<sub>2</sub> via la chaîne trophique permettrait de mettre en évidence la potentielle biomagnification de ces nouveaux contaminants aux organismes supérieurs et le danger que peuvent représenter ces nanomatériaux pour l'Homme et l'Environnement.

*Références  
bibliographiques*

Affar, E.B., Dufour, M., Poirier, G.G., Nadeau, D., 1998. Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 185, 123-133.

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET) 2010. Les nanomatériaux: Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Edition scientifique - Agents physiques.

Ajayan, P.M., Schadler, L.S., Braun, P.V., 2003. *Nanocomposite Science and Technology*. Wiley-VCH.

Allouni, Z.E., Cimpan, M.R., Høl, P.J., Skodvin, T., Gjerdet, N.R., 2009. Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68, 83-87.

Almar, M., Otero, L., Santos, C., Gallego, J.G., 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 33, 769-783.

Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment* 407, 1461-1468.

Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., Christensen, F.M., 2011. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health -- Lessons learned from four case studies. *Environment International* 37, 1143-1156.

AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Prakash Hande, M., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *American Chemical Society* 3, 279-290.

Auffan, M., Pedeutour, M., Rose, J., Masion, A., Ziarelli, F., Borschneck, D., Chaneac, C., Botta, C., Chaurand, P., Labille, J., Bottero, J.-Y., 2010. Structural degradation at the surface of a TiO<sub>2</sub>-based nanomaterial used in cosmetics. *Environmental Science & Technology* 44, 2689-2694.

Auffan, M., Shipley, H.J., Yean, S., Kan, A.T., Tomson, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2007. Nanomaterials as adsorbents. *Environmental nanotechnology - applications and impacts of nanomaterials* ed. M.R. Wiesner and J.-Y. Bottero, 371-392.

- Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., Carriere, M., 2010. Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an *in vitro* study. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 61-73.
- Barker, P.J., Branch, A., 2008. The interaction of modern sunscreen formulations with surface coatings. *Progress in Organic Coatings* 62, 313-320.
- BBC Research, 2010. Nanotechnology: A Realistic Market Assessment. <http://www.bccresearch.com/report/nanotechnology-realistic-market-assessment-nan031d.html>.
- Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakersi, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P., Timmermans, M., 1998. Identification and Cloning of a Glucan- and Lipopolysaccharidebinding Protein from *Eisenia foetida* Earthworm Involved in the Activation of Prophenoloxidase Cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 24948-24954.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37, 2935-2947.
- Bigorgne, E., Foucaud, L., Caillet, C., Giambérini, L., Nahmani, J., Thomas, F., Rodius, F., submitted to *Journal of Nanoparticle Research*. Cellular and Molecular responses of *E. fetida* coelomocytes exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles.
- Bigorgne, E., Foucaud, L., Lapied, E., Labille, J., Botta, C., Sirguyey, C., Falla, J., Rose, J., Joner, E.J., Rodius, F., Nahmani, J., 2011. Ecotoxicological assessment of TiO<sub>2</sub> byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 159, 2698-2705.
- Bilej, M., Brys, L., Beschin, A., Lucas, R., Vercauteren, E., Hanusová, R., De Baetselier, P., 1995. Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunology Letters* 45, 123-128.
- Bilej, M., De Baetselier, P., Beschin, A., 2000. Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiologica* 45, 283-300.
- Bilej, M., De Baetselier, P., Van Dijck, E., Stijlemans, B., Colige, A., Beschin, A., 2001. Distinct Carbohydrate Recognition Domains of an Invertebrate Defense Molecule Recognize Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45840-45847.



- Bilej, M., Procházková, P., Šilerová, M., Josková, R., 2010. Earthworm Immunity. Invertebrate Immunity, edited by Kenneth Söderhäll. CHAPTER 4.
- Bilej, M., Scheerlinck, J.-P., VandenDriessche, T., De Baetselier, P., Vetvicka, V., 1990. The flow cytometric analysis of *in vitro* phagocytic activity of earthworm coelomocytes (*Eisenia foetida*; Annelida). Cell Biology International Reports 14, 831-837.
- Blaise, C., Gagné, F., Férard, J.F., Eullafroy, P., 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environmental Toxicology 23, 591-598.
- Bonnard, M., Eom, I.-C., Morel, J.-L., Vasseur, P., 2009. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. Environmental and Molecular Mutagenesis 50, 60-67.
- Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., Masion, A., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2011. TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. Environmental Pollution 159, 1543-1550.
- Bouché, 1972. M.B. Bouché, Lombriciens de France - écologie et Systématique. Annales Zoologie et Ecologie Animale 72, 1-671 (Special Issue)
- Braydich-Stolle, L.K., Schaeublin, N.M., Murdock, R.C., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub> nanotoxicity. Journal of Nanoparticle Research 11, 1361-1374.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Advanced Drug Delivery Reviews 54, 631-651.
- Brousseau, P., Fugère, N., Bernier, J., Coderre, D., Nadeau, D., Poirier, G., Fournier, M., 1997. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (oligochaeta). Soil Biology & Biochemistry 29, 681-684.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999. Manual of Immunological Methods. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2008a. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. Developmental & Comparative Immunology 32, 1441-1453.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A.N., Morgan, A.J., Kille, P., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2008b. cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida:

- Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 47-55.
- Burch, S.W., Fitzpatrick, L.C., Goven, A.J., Venables, B.J., Giggleman, M.A., 1999. *In Vitro* Earthworm *Lumbricus terrestris* Coelomocyte Assay for Use in Terrestrial Toxicity Identification Evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 547-554.
- Buzea, C., Pacheco Blandino, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17 - MR172.
- Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., 2010a. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology* 96, 151-158.
- Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., Pojana, G., 2010b. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>). *Aquatic Toxicology* 100, 168-177.
- Carlotti, M.E., Ugazio, E., Sapino, S., Fenoglio, I., Greco, G., Fubini, B., 2009. Role of particle coating in controlling skin damage photoinduced by titania nanoparticles. *Free Radical Research* 43, 312-322.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 94, 320-327.
- Chen, D., Zhang, D., Yu, J.C., Chan, K.M., 2011. Effects of Cu<sub>2</sub>O nanoparticle and CuCl<sub>2</sub> on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquatic Toxicology* 105, 344-354.
- Chen, K.L., Elimelech, M., 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 309, 126-134.
- Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* 100, 151-159.
- Cooper, E.L., Binggen Ru, Weng, N., 2004. *Complementary and Alternative Approaches to Biomedicine: Advances in experimental medicine and biology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers: Edited by Edwin Lowell Cooper, Nobuo Yamaguchi 546.

- Corp, N., Morgan, A.J., 1991. Accumulation of heavy metals from polluted soils by the earthworm, *Lumbricus rubellus*: Can laboratory exposure of 'control' worms reduce biomonitoring problems? *Environmental Pollution* 74, 39-52.
- Cossarizza, A., Cooper, E.L., Suzuki, M.M., Salvioli, S., Capri, M., Gri, G., Quaglino, D., Franceschi, C., 1996. Earthworm Leukocytes That Are Not Phagocytic and Cross-React with Several Human Epitopes Can Kill Human Tumor Cell Lines. *Experimental Cell Research* 224, 174-182.
- Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., Hong, M., Zhou, M., Wang, L., Wang, H., Hong, F., 2010. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 183, 874-880.
- Dales, R.P., Kalaç, Y., 1992. Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 101, 487-490.
- Dallinger, R., 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113, 125-133.
- Deisseroth, A., Dounce, A.L., 1970. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. *Physiological Reviews* 50, 319-375.
- Deonaraine, A., Lau, B.L.T., Aiken, G.R., Ryan, J.N., Hsu-Kim, H., 2011. Effects of Humic Substances on Precipitation and Aggregation of Zinc Sulfide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 45, 3217-3223.
- Domingos, R.F., Tufenkji, N., Wilkinson, K.J., 2009. Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology* 43, 1282-1286.
- Drobne, D., Jemec, A., Pipan Tkalec, Z., 2009. *In vivo* screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO<sub>2</sub>. *Environmental Pollution* 157, 1157-1164.
- Duan, Y.M., Li, N., Liu, C., Liu, H.T., Cui, Y.L., Wang, H., Hong, F.S., 2010. Interaction Between Nanoparticulate Anatase TiO<sub>2</sub> and Lactate Dehydrogenase. *Biological Trace Element Research* 136, 302-313.
- Duncan, R., 2006. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer* 6, 688-701.
- Dunphy Guzman, K.A., Finnegan, M.P., Banfield, J.F., 2006. Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 40, 7688-7693.

- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 3rd ed. Chapman & Hall, London.
- Environmental Protection Agency 1996 , EPA712-C-96-167. Earthworm Subchronic Toxicity Test, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7104). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.6200.
- Environmental Protection Agency 2010, EPA/600/R-09/057F. Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen. National Center for Environmental Assessment-RTP Division Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Research Triangle Park, NC.
- International Organization for Standardization (ISO 10390), 1994. Qualité du sol - Détermination du pH.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 190-205.
- Eyambe, G.E., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals* 25, 61-67.
- Fang, J., Shan, X.-q., Wen, B., Lin, J.-m., Owens, G., 2009. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental Pollution* 157, 1101-1109.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84, 415-430.
- Fisichella, M., Dabboue, H., Bhattacharyya, S., Saboungi, M.-L., Salvétat, J.-P., Hevor, T., Guerin, M., 2009. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicology in Vitro* 23, 697-703.
- Fitzpatrick, L.C., Sassani, R., Venables, B.J., Goven, A.J., 1992. Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls to earthworms *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 77, 65-69.
- Foltête, A.-S., Masfaraud, J.-F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Féraud, J.-F., Cotelle, S., 2011. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution* 159, 2515-2522.

- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160, 171-177.
- Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 361-368.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40, 412-420.
- Frankfurt, O.S., Krishan, A., 2001. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49, 369-378.
- French, R.A., Jacobson, A.R., Kim, B., Isley, S.L., Penn, L.R., Baveye, P.C., 2009. Influence of Ionic Strength, pH, and Cation valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 43, 1354-1359.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas *The Journal of Biological Chemistry* 264, 7761-7764.
- Fröhlich, E., Meindl, C., Pieber, T.R., 2010. Important issues in the cytotoxicity screening of nano-sized materials *Euro Letters Nanotox No. 001 (2010) 0001-0006*
- Fugère, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M., 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109, 157-166.
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvé, S., Blaise, C., 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* 86, 333-340.
- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158, 1748-1755.
- Garcia, M., Römbke, J., de Brito, M.T., Scheffczyk, A., 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution* 153, 450-456.

- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216-9222.
- Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., 1994. Chemical Toxicity and Host Defense in Earthworms: An Invertebrate Model. 280-300.
- Goven, A.J., Venables, B.J., Fitzpatrick, L.C., 2005. Earthworms as Ecosentinels for Chemical-Induced Immunotoxicity. *Investigative Immunotoxicology*: Edited by Tryphonas H., Fourier M., Blakley B.R., Smits J.E.G. and Brousseau P. 7, 106-119.
- Gruber, C., Stürzenbaum, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B., Dallinger, R., 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-Metallothionein from *Eisenia foetida*. *European Journal of Biochemistry* 267, 573-582.
- Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H., Jan, K.-Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66-73.
- Hamed, S.S., Kauschke, E., Cooper, E.L., 2002. Cytochemical properties of earthworm coelomocytes enriched by Percoll. In: A. Beschin, M. Bilej and E.L. Cooper, Editors, *A New Model for Analyzing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications*, IOS Press, Ohmsha, 29-37.
- Hansen, S.F., Larsen, B.H., Olsen, S.I., Baun, A., 2007. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* 1, 243-250.
- Hao, L., Wang, Z., Xing, B., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21, 1459-1466.
- Hartmann, N.B., Von der Kammer, F., Hofmann, T., Baalousha, M., Ottofuelling, S., Baun, A., 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles--Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology* 269, 190-197.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51-88.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308-1316.

- Hendawi, M., Sauvé, S., Ashour, M., Brousseau, P., Fournier, M., 2004. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 17-22.
- Hoet, P.H., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O.V., 2004. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* 2.
- Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995. Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chemical Reviews* 95, 69-96.
- Hooper, H.L., Jurkschat, K., Morgan, A.J., Bailey, J., Lawlor, A.J., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., 2011. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment International* 37, 1111-1117.
- Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J., Yang, L.Y., 2010. Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 586-591.
- Hu, J., Chen, G., Lo, I.M.C., 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Research* 39, 4528-4536.
- Hund-Rink, K., Simon, M., 2006. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on Algae and daphnids. *Environmental Sciences & Pollution Research*, 1-8.
- International Organization for Standardization (ISO 11268-1), 1993. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) -- Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel.
- International Organization for Standardization (ISO 11268-2), 1998. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) -- Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.
- International Organization for Standardization (ISO 11274), 1998. Qualité du sol - Détermination de la caractéristique de la rétention en eau - Méthodes de laboratoire. .
- International Organization for Standardization (ISO 14869-2), 2002. Qualité du sol -- Mise en solution pour la détermination des teneurs élémentaires totales -- Partie 2: Mise en solution par fusion alcaline.
- International Organization for Standardization (ISO 22036), 2008. Qualité du sol -- Dosage des éléments traces dans des extraits de sol par spectrométrie d'émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES)

- International Organization for Standardization (ISO/TS 27687), 2008. Nanotechnologies -- Terminologie et définitions relatives aux nano-objets -- Nanoparticule, nanofibre et nanofeuillet.
- International Organization for Standardization (ISO/TS 80004-1) 2010 Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms.
- Janssen, R.P.T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H.A., Van Veen, R.P.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 1997. Equilibrium partitioning of heavy metals in dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2479-2488.
- Jemec, A., Drobne, D., Remskar, M., Sepcic, K., Tisler, T., 2008. Effects of ingested Nano-sized Titanium Dioxide on Terrestrial isopods (*Porcellio scaber*) *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1904-1914.
- Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X., 2005. Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environmental Science & Technology* 39, 1378-1383.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 77-89.
- Jin, C.-Y., Zhu, B.-S., Wang, X.-F., Lu, Q.-H., 2008. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chemical Research in Toxicology* 21, 1871-1877.
- Jin, C., Tang, Y., Yang, F., Li, X., Xu, S., Fan, X., Huang, Y., Yang, Y., 2010. Cellular Toxicity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase. *Biological Trace Element Research*, 1-13.
- Johnson, A.C., Bowes, M.J., Crossley, A., Jarvie, H.P., Jurkschat, K., Jürgens, M.D., Lawlor, A.J., Park, B., Rowland, P., Spurgeon, D., Svendsen, C., Thompson, I.P., Barnes, R.J., Williams, R.J., Xu, N., 2011. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO<sub>2</sub> nanoparticles in UK field scenarios. *Science of The Total Environment* 409, 2503-2510.
- Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment* 400, 396-414.



- Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science & Technology* 45, 776-781.
- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Köhler, H.-R., Simonsen, V., Triebkorn, R., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in Terrestrial Invertebrates For Ecotoxicological Risk Soil Assessment. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 164, 93-147.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The Role of Glutathione in Detoxication. *Environment Health Perspectives* 49, 59-69.
- Kim, H.W., Ahn, E.-K., Keun Jee, B., Yoon, H.-K., Haeng Lee, K., Lim, Y., 2009a. Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 55-65.
- Kim, K.T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.-H., Kim, S.D., 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to size fraction. *Science of The Total Environment* 408, 2268-2272.
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.-H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y., 2009b. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* 23, 1076-1084.
- Kiser, M.A., Westerhoff, P., Benn, T., Wang, Y., Peñ rez-Rivera, J., Hristovski, K., 2009. Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology* 43, 6757-6763.
- Klaper, R., Crago, J., Barr, J., Arndt, D., Setyowati, K., Chen, J., 2009. Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: Changes in toxicity with functionalization. *Environmental Pollution* 157, 1152-1156.
- Koeneman, B., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J., Capco, D., 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biology and Toxicology* 26, 225-238.
- Köhlerová, P., Beschin, A., Silerová, M., De Baetselier, P., Bilej, M., 2004. Effect of experimental microbial challenge on the expression of defense molecules in *Eisenia foetida* earthworm. *Developmental & Comparative Immunology* 28, 701-711.
- Kool, P.L., Ortiz, M.D., van Gestel, C.A.M., 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* 159, 2713-2719.

- Koziol, B., Markowicz, M., Kruk, J., Plytycz, B., 2006. Riboflavin as a source of autofluorescence in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Photochemistry and Photobiology* 82, 570-573.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2009. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72, 370-377.
- Kukowska-Latallo, J.F., Candido, K.A., Cao, Z., Nigavekar, S.S., Majoros, I.J., Thomas, T.P., Balogh, L.P., Khan, M.K., Baker, J.R., 2005. Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer. *Cancer Research* 65, 5317-5324.
- Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2010. Aging of TiO<sub>2</sub> nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution* 158, 3482-3489.
- LaCourse, E.J., Hernandez-Viadel, M., Jefferies, J.R., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Barrett, J., John Morgan, A., Kille, P., Brophy, P.M., 2009. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution* 157, 2459-2469.
- Lapied, E., Bigorgne, E., Moudilou, E., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., Nahmani, J., in preparation. Bioaccumulation and apoptotic activity in the earthworm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*) after contamination by altered TiO<sub>2</sub> nanoresidues.
- Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*). *Nanomedicine* 5, 975-984.
- Lapied, E., Nahmani, J.Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.-M., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2011. Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International* 37, 1105-1110.
- Lassegues, M., Milochau, A., Doignon, F., DuPasquier, L., Valembois, P., 1997. Sequence and expression of an *Eisenia-fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *European Journal of Biochemistry* 246, 756-762.
- Lassègues, M., Roch, P., Valembois, P., 1989. Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: Specificity of the induced activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 54, 28-31.

- Lecoanet, H.F., Bottero, J.-Y., Wiesner, M.R., 2004. Laboratory Assessment of the Mobility of Nanomaterials in Porous Media. *Environmental Science & Technology* 38, 5164-5169.
- Lee, S., Kim, K., Shon, H., Kim, S., Cho, J., 2011. Biototoxicity of nanoparticles: effect of natural organic matter. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 3051-3061.
- Lee, W.A., Pernodet, N., Li, B., Lin, C.H., Hatchwell, E., Rafailovich, M.H., 2007. Multicomponent polymer coating to block photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chemical Communications*, 4815-4817.
- Légifrance, consulté le 23 août 2011a. LOI n° 2009-967 du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement (1) - Article 42  
<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020949548>.
- Légifrance, consulté le 23 août 2011b. LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement (1) -Article 185.  
<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022470434&categorieLien=id>.
- Li, L.-Z., Zhou, D.-M., Peijnenburg, W.J.G.M., van Gestel, C.A.M., Jin, S.-Y., Wang, Y.-J., Wang, P., 2011a. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International* 37, 1098-1104.
- Li, M., Czymmek, K.J., Huang, C.P., 2011b. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. *Journal of Hazardous Materials* 187, 502-508.
- Lin, W., Xu, Y., Huang, W.-R., Ma, Y., Shannon, K.B., Chen, C.-Y., Huang, W.-R., 2009. Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 25-39.
- Liu, X., Sun, Z., Chong, W., Sun, Z., He, C., 2009. Growth and stress responses of the earthworm *Eisenia fetida* to *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial soil. *Microbial Pathogenesis* 46, 266-272.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2001. Cadmium Toxicity for Terrestrial Invertebrates: Taking Soil Parameters Affecting Bioavailability Into Account. *Ecotoxicology* 10, 315-322.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2002a. Ecotoxicity of Chromium (III) to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus*, and *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 203-205.

- Lock, K., Janssen, C.R., 2002b. Ecotoxicity of nickel to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* 46, 197-200.
- Lovern, S.B., Klaper, R., 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1132-1137.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., 2007. Behavioral and Physiological Changes in *Daphnia magna* when Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environmental Science & Technology* 41, 4465-4470.
- Ma, W., Edelman, T., van Beersum, I., Jans, T., 1983. Uptake of cadmium, zinc, lead, and copper by earthworms near a zinc-smelting complex: Influence of soil pH and organic matter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 30, 424-427.
- Maboeta, M.S., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2004. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environmental Research* 96, 95-101.
- Magrez, A., Horváth, L., Smajda, R., Salicio, V.r., Pasquier, N., Forró, L.s., Schwaller, B., 2009. Cellular Toxicity of TiO<sub>2</sub>-Based Nanofilaments. *ACS Nano* 3, 2274-2280.
- Maleri, R.A., Fourie, F., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2008a. Photometric application of the MTT- and NRR-assays as biomarkers for the evaluation of cytotoxicity *ex vivo* in *Eisenia andrei*. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1040-1048.
- Maleri, R.A., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2008b. Metal uptake of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) exposed to ultramafic soils. *Applied Soil Ecology* 38, 42-50.
- Masciangioli, T., Zhang, W.-X., 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Environmental Science & Technology*, 102-108.
- Massicotte, R., Robidoux, P.Y., Sauvé, S., Flipo, D., Mathiot, A., Fournier, M., Trottier, B., 2004. Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 10-16.
- Milochau, A., Lassègues, M., Valembois, P., 1997. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1337, 123-132.
- Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 222-235.

- Moore, A., Donahue, C.J., Hooley, J., Stocks, D.L., Bauer, K.D., Mather, J.P., 1995. Apoptosis in CHO cell batch cultures: examination by flow cytometry. *Cytotechnology* 17, 1-11.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32, 967-976.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1988. Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environmental Pollution* 54, 123-138.
- Morgan, J.E., Norey, C.G., Morgan, A.J., Kay, J., 1989. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92C, 15-21.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42, 4447-4453.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *In Vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences* 101, 239-253.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007a. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution* 149, 44-58.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007b. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145, 402-424.
- Nanotechproject, 2011a. PEN The Project on Emerging Nanotechnologies - Analysis. [http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis\\_draft/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/).
- Nanotechproject, 2011b. PEN The Project on Emerging Nanotechnologies - Nanotech-enabled Consumer Products Continue to Rise. <http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/>.
- Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J.A., Hoet, P.H., 2009. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small* 5, 846-853.
- Oberdörster, G., Stone, V., Donaldson, K., 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1, 2-25.
- OECD, 1984. Guideline for testing chemicals. Earthworm acute toxicity tests Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development 207.

- Olivares Fontt, E., Beschin, A., Van Dijck, E., Vercruyssen, V., Bilej, M., Lucas, R., De Baetselier, P., Vray, B., 2002. Trypanosoma cruzi is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Eisenia foetida foetida*. *Developmental & Comparative Immunology* 26, 27-34.
- Ostertag, K., Hüsing, B., 2008. Identification of starting points for exposure assessment in the post-use phase of nanomaterial-containing products. *Journal of Cleaner Production* 16, 938-948.
- Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P., soumis à *Environmental Science & Technology*. Role of Electrostatic Interactions in the Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles toward Bacteria.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W., 2007. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* 3, 1941-1949.
- Pan, Z., Lee, W., Slutsky, L., Clark, R.A.F., Pernodet, N., Rafailovich, M.H., 2009. Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. *Small* 5, 511-520.
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., Park, K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters* 180, 222-229.
- Poole, C.P., Owens, F.J., 2003. *Introduction to Nanotechnology*. Wiley-Interscience.
- Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C.B., Murphy, K.R., Hussain, S.M., Rowe, J.J., Nielsen, M.G., *in press*. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: Size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere In Press*, Corrected Proof.
- R, Development Core Team (2006). *R: A language and environment for statistical computing*. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rahman, M.F., Wang, J., Patterson, T.A., Saini, U.T., Robinson, B.L., Newport, G.D., Murdock, R.C., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Ali, S.F., 2009. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicology Letters* 187, 15-21.

- Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D., Schiffmann, D., 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 110, 797-800.
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N., 2008. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640, 113-122.
- Reijnders, L., 2006. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *Journal of Cleaner Production* 14, 124-133.
- Reijnders, L., 2009. The release of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles from nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* 94, 873-876.
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Maboeta, M.S., 2001. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia* 45, 61-68.
- Renwick, L.C., Brown, D., Clouter, A., Donaldson, K., 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occupational and Environmental Medicine* 61, 442-447.
- Renwick, L.C., Donaldson, K., Clouter, A., 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172, 119-127.
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L., 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine Environmental Research* 69, S49-S51.
- Roch, P., 1979. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. 1-polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia fetida andrei*. *Developmental & Comparative Immunology* 3, 599-608.
- Roch, P., Valembois, P., Davant, N., Lassegues, M., 1981. Protein analysis of earthworm coelomic fluid--II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia fetida andrei* factor (EFAF). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69, 829-836.
- Roco, M.C., 2001. International strategy for Nanotechnology Research. *Journal of Nanoparticle Research* 3, 353-360.
- Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression,

- growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29, 167-172.
- Roh, J.-y., Sim, S.J., Yi, J., Park, K., Chung, K.H., Ryu, D.-y., Choi, J., 2009. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology* 43, 3933-3940.
- Roots, B.I., Johnston, P.V., 1966. The lipids and pigments of the chloragosomes of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 17, 285-286, IN289-IN210, 287-288.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera, D., 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1837-1846.
- Sauvé, S., Fournier, M., 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 67-72.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic Response of Terrestrial and Aquatic Invertebrates Following *in Vitro* Exposure to Trace Elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 21-29.
- Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B., Colvin, V.L., 2006. Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 92, 174-185.
- Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H., Schaefer, M., Johansen, A., 2008. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 616-619.
- Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V., Unrine, J.M., 2011. Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Science Society of America Journal* 75.
- Silerová, M., Procházková, P., Josková, R., Josens, G., Beschin, A., De Baetselier, P., Bilej, M., 2006. Comparative study of the CCF-like pattern recognition protein in different Lumbricid species. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 765-771.
- Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., Carrière, M., 2008. *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253, 137-146.



- Sinkora, M., Bilej, M., Tucková, L., Romanovský, A., 1993. Hemolytic function of opsonizing proteins of earthworm's coelomic fluid. *Cell Biology International* 17, 935-940.
- Sivakumar, S., Subbhuraam, C.V., 2005. Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 93-98.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Solovitch, N., Labille, J., Rose, J., Chaurand, P., Borschneck, D., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2010. Concurrent Aggregation and Deposition of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in a Sandy Porous Media. *Environmental Science & Technology* 44, 4897-4902.
- Som, C., Berges, M., Chaudhry, Q., Dusinska, M., Fernandes, T.F., Olsen, S.I., Nowack, B., 2010. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology* 269, 160-169.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. Effects of Metal-Contaminated Soils on the Growth, Sexual Development, and Early Cocoon Production of the Earthworm *Eisenia fetida*, with Particular Reference to Zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 86-95.
- Spurgeon, D.J., Stürzenbaum, S.R., Svendsen, C., Hankard, P.K., Morgan, A.J., Weeks, J.M., Kille, P., 2004. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138, 11-21.
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Rimmer, V.R., Hopkin, S.P., Weeks, J.M., 2000. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1800-1808.
- Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P.F., 2009. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 39, 613-626.
- Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., 1998. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Letters* 431, 437-442.
- Thio, B.J.R., Zhou, D., Keller, A.A., 2011. Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 189, 556-563.
- Tinto, A., Gabernet, C., Vives, J., Prats, E., Cairo, J.J., Cornudella, L., Godia, F., 2002. The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *Journal of Biotechnology* 95, 205-214.

- Tonn , J.C., Schachenmayr, W., Kraemer, H.P., 1994. *In vitro* chemosensitivity test of malignant gliomas : clinical relevance of test results independent of adjuvant chemotherapy ? *Anticancer research* 14, 1371-1375.
- Unrine, J.M., Hunyadi, S.E., Tsyusko, O.V., Rao, W., Shoults-Wilson, W.A., Bertsch, P.M., 2010a. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science & Technology* 44, 8308-8313.
- Unrine, J.M., Tsyusko, O.V., Hunyadi, S.E., Judy, J.D., Bertsch, P.M., 2010b. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to copper nanoparticles. *Journal of Environmental Quality* 39, 1942-1953.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L., 2007. *In vivo* evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon* 45, 1891-1898.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L., 2008. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229, 44-55.
- Valembois, P., Lassègues, M., Milochau, A., 1997. E3 2:15 Physiological role played by the carbohydrate component of earthworm fetidins. *Developmental & Comparative Immunology* 21, 114-114.
- Valembois, P., Lassègues, M., Roch, P., 1992. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Developmental & Comparative Immunology* 16, 95-101.
- Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., 1984. Simultaneous existence of hemolysins and hemagglutinins in the coelomic fluid and in the cocoon albumen of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 78, 141-145.
- Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., 1988. Evidence of plasma clotting system in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 51, 221-228.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
- Vamanu, C.I., Cimpan, M.R., Høl, P.J., Sørnes, S., Lie, S.A., Gjerdet, N.R., 2008. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicology in Vitro* 22, 1689-1696.
- van der Ploeg, M.J.C., Baveco, J.M., van der Hout, A., Bakker, R., Rietjens, I.M.C.M., van den Brink, N.W., 2011. Effects of C60 nanoparticle exposure on earthworms (*Lumbricus rubellus*) and implications for population dynamics. *Environmental Pollution* 159, 198-203.

- Van Straalen, N.M., 2002. Theory of ecological risk assessment based on species sensitivity distributions. In: Posthuma, L., Suter, G.W., Traas, T.P. (Eds.), *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 37-48.
- Velzeboer, I., Hendriks, A.J., Ragas, A.M.J., Van De Meent, D., 2008. Aquatic Ecotoxicity tests of some Nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1942-1947.
- Vevers, W., Jha, A., 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells *in vitro*. *Ecotoxicology* 17, 410-420.
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Masson, P., Narbonne, J.F., 1995. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, protease) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 217-224.
- Wagner, A.J., Bleckmann, C.A., Murdock, R.C., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2007. Cellular Interaction of Different Forms of Aluminum Nanoparticles in Rat Alveolar Macrophages. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 7353-7359.
- Wakefield, G., Lipscomb, S., Holland, E., Knowland, J., 2004. The effects of manganese doping on UVA absorption and free radical generation of micronised titanium dioxide and its consequences for the photostability of UVA absorbing organic sunscreen components. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 648-652.
- Wang, H., Wick, R.L., Xing, B., 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157, 1171-1177.
- Wang, J., Zhu, X., Zhang, X., Zhao, Z., Liu, H., George, R., Wilson-Rawls, J., Chang, Y., Chen, Y., 2011. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chemosphere* 83, 461-467.
- Warheit, D.B., Brock, W.P., Lee, K.P., Webb, T.R., Reed, K.L., 2005. Comparative Pulmonary Toxicity Inhalation and Instillation Studies with Different TiO<sub>2</sub> Particle formulations: Impact of Surface Treatments on Particle Toxicity. *Toxicological Sciences* 88, 514-524.
- Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L., Sayes, C.M., 2007a. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters* 171, 99-110.
- Warheit, D.B., Webb, T.R., Reed, K.L., Frerichs, S., Sayes, C.M., 2007b. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230, 90-104.

- 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 TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76, 1356-1365.
- Wiesner, M.R., Bottero, J.Y., 2007. *Environmental Nanotechnology, Applications and Impact of Nanomaterials*. McGraw-Hill, 544.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., 2006. Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 40, 4336-4345.
- Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., Krug, H.F., 2006. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Letters* 6, 1261-1268.
- Xie, H., Wise, S.S., Holmes, A.L., Xu, B., Wakeman, T.P., Pelsue, S.C., Singh, N.P., Wise, S.J.P., 2005. Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 586, 160-172.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W., 2011. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of The Total Environment* 409, 1444-1452.
- Zhang, A.-P., Sun, Y.-P., 2004. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* 10, 3191-3193.
- Zhang, W.-x., 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research* 5, 323-332.
- Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010a. Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78, 209-215.
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010b. Trophic transfer of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere* 79, 928-933.
- Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 67-75.

# *Annexe*



## Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites on *Vicia faba*

Anne-Sophie Foltête<sup>a,c,\*</sup>, Jean-François Masfarau<sup>a,c</sup>, Emilie Bigorgne<sup>a,c</sup>, Johanne Nahmani<sup>a,c</sup>, Perrine Chaurand<sup>b,c</sup>, Céline Botta<sup>b,c</sup>, Jérôme Labille<sup>b,c</sup>, Jérôme Rose<sup>b,c</sup>, Jean-François Féraud<sup>a,c</sup>, Sylvie Cotelle<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), Université Paul Verlaine-Metz, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

<sup>b</sup> Centre Européen de Recherches et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE), UMR 6635 CNRS/Aix-Marseille Université, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France

<sup>c</sup> ICEINT, International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology, F-13545 Aix-en-Provence Cedex 04, France<sup>1</sup>

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 March 2011

Received in revised form

12 June 2011

Accepted 15 June 2011

#### Keywords:

Rutile

Nanoparticles

Alteration

Titanium dioxide

Risk assessment

### ABSTRACT

Mineral sunscreen nanocomposites, based on a nano-TiO<sub>2</sub> core, coated with aluminium hydroxide and dimethicone films, were submitted to an artificial ageing process. The resulting Altered TiO<sub>2</sub> Nanocomposites (ATN) were then tested in the liquid phase on the plant model *Vicia faba*, which was exposed 48 h to three nominal concentrations: 5, 25 and 50 mg ATN/L. Plant growth, photosystem II maximum quantum yield, genotoxicity (micronucleus test) and phytochelatin levels showed no change compared to controls. Oxidative stress biomarkers remained unchanged in shoots while in roots, glutathione reductase activity decreased at 50 mg ATN/L and ascorbate peroxidase activity decreased for 5 and 25 mg ATN/L. Nevertheless, despite the weak response of biological endpoints, ICP-MS measurements revealed high Ti and Al concentrations in roots, and X-ray fluorescence micro-spectroscopy revealed titanium internalization in superficial root tissues. Eventual long-term effects on plants may occur.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

With the fastly growing number of commercial products incorporating or made of manufactured nanoparticles (MNPs), the dispersion of MNPs in the environment is not science fiction but already occurring, causing ethical, sociological (Jacobs et al., 2010) and potentially environmental problems, even if those are difficult to assess (Aschberger et al., 2011; Baun et al., 2008; Farré et al., 2011; Navarro et al., 2008; Nowack, 2009; Nowack and Bucheli, 2007). Measurements from Kaegi et al. (2008) represent the first direct evidence of the release of synthetic nanoparticles from MNPs applications into the environment. They showed the leaching of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles from house facades treated with paint containing nano-TiO<sub>2</sub> under the influence of atmospheric

conditions. A model of the behaviour and expected concentrations of nano-TiO<sub>2</sub> in the different compartments of the environment is proposed by Mueller and Nowack (2008) and by Gottschalk et al. (2010), reviewed by Menard et al. (2011).

TiO<sub>2</sub> nanoparticles are more and more included in sunscreen creams for their good UV filter properties (AFSSET, 2010). Like other cosmetic products, sunscreen components are likely to end up in bathing waters, wastewaters and waste disposals, and finally into the whole environment. During sewage treatment, TiO<sub>2</sub> nanoparticles seem to show a close affinity for activated sludge, and consequently, the greater part of these nanomaterials are expected to end up in soils through sewage sludge application (Johnson et al., 2011; Kiser et al., 2009).

The photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> nanoparticles are really problematic once these particles released into the environment. Indeed, they are powerful reactive oxygen species (ROS) producers when exposed to ultraviolet radiations (Reijnders, 2008). In plants, bare TiO<sub>2</sub> nanoparticles can show either positive or negative effects (Brar et al., 2010; Ma et al., 2010). In sunscreens, nano-TiO<sub>2</sub> particles are surface modified to inhibit ROS generation (Reijnders, 2006; Wakefield et al., 2004) and prevent toxic effects, but the stability of the protective layers and the effects of such altered structures on

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [as.foltete@yahoo.fr](mailto:as.foltete@yahoo.fr) (A.-S. Foltête), [masfa@univ-metz.fr](mailto:masfa@univ-metz.fr) (J.-F. Masfarau), [emilie.bigorgne@univ-metz.fr](mailto:emilie.bigorgne@univ-metz.fr) (E. Bigorgne), [Johanne.nahmani@univ-metz.fr](mailto:Johanne.nahmani@univ-metz.fr) (J. Nahmani), [chaurand@cerge.fr](mailto:chaurand@cerge.fr) (P. Chaurand), [celine\\_botta@yahoo.fr](mailto:celine_botta@yahoo.fr) (C. Botta), [labille@cerge.fr](mailto:labille@cerge.fr) (J. Labille), [rose@cerge.fr](mailto:rose@cerge.fr) (J. Rose), [ferard@univ-metz.fr](mailto:ferard@univ-metz.fr) (J.-F. Féraud), [cotelle@univ-metz.fr](mailto:cotelle@univ-metz.fr) (S. Cotelle).

<sup>1</sup> <http://www.i-ceint.org>.

ecosystems remain largely unknown. The possibility of the regain of photocatalytic properties by sunscreen nano-TiO<sub>2</sub> after use was proved by Barker and Branch (2008), who noticed an accelerated weathering (100-fold) of the coating of prepainted steel sheets by nano-TiO<sub>2</sub>-containing sunscreens used by workers during handling of the materials.

Auffan et al. (2010) and Labille et al. (2010) have artificially mimicked the natural expected alteration of T-Lite SF (BASF), a nanocomposite entering in sunscreen formula. T-Lite are based on a nano-TiO<sub>2</sub> core coated with aluminium hydroxide Al(OH)<sub>3</sub> and polydimethylsiloxane (PDMS) films. In the continuity of these studies, we investigated the biological effects of their Altered TiO<sub>2</sub> Nanocomposites (ATN) on a plant model, the broad bean *Vicia faba*. This model was chosen for its well-known sensitivity to pollutants. Indeed it has been used by numerous authors to assess the ecotoxicity, and particularly the genotoxicity of substances, radiations, or liquid or solid polluted matrix (Cotelle et al., 1999; Manier et al., 2009; Minouflet et al., 2005; Radetski et al., 2004; Ünyayar et al., 2006).

After exposing *V. faba* to ATN suspensions, ecotoxicological and genotoxicological endpoints were assessed. Titanium and aluminium concentrations were determined in roots, and titanium internalization was studied by X-ray fluorescence micro-spectroscopy.

## 2. Material and methods

### 2.1. Nanocomposites artificial ageing

Mineral sunscreen nanocomposites, based on a TiO<sub>2</sub> core (10 nm × 50 nm), coated with aluminium hydroxide and polydimethylsiloxane layers, were submitted to an alteration process detailed by Labille et al. (2010). Briefly, 100 mg nanocomposite powder (provided by the manufacturer) were introduced in 250 mL ultrapure water and kept agitated (690 rpm) under a white light (400 W Philips® Master HPI-T Plus) to mimic solar spectrum during 48 h. The pH was not buffered, the volume was constant. After alteration, the resulting mixture was rested for 48 h and the supernatant of stable altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites (ATN) was used for the tests.

### 2.2. ATN dilution and size characterization

ATN suspension (120 mg/L) was diluted in a water mix (50% Evian® French mineral water: 50% ultrapure water, v:v) to the following concentrations: 5, 25 and 50 mg ATN/L. Evian® is a weakly mineralized water. The predominant ions are Ca<sup>2+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The 50% dilution provided a mix with low ionic strength (4.8 mM) minimizing particle aggregation (Petosa et al., 2010), but sufficiently mineralized to ensure an acceptable plant physiological state. At the beginning of the experiment, the pH was adjusted to 6.5 with HNO<sub>3</sub>. The medium was not buffered because of the rapid ATN aggregation in every tested buffer.

Laser diffraction was used to measure ATN size distribution in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v) at 25 mg/L during the first 5 h. The apparatus used was a Malvern Mastersizer S (Malvern Instruments, Malvern, UK) displaying a measuring range from 50 nm to 900 µm. Two separate particle groups were specifically studied: particles below 700 nm, considered as stable colloidal suspension, and particles over 10 µm, considered as aggregates undergoing rapid settling.

Turbidity measurements were used to determine the limit conditions for colloidal stability of the ATN dispersion as a function of its concentration. The suspension was diluted from 5 to 50 mg/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v), and left 24 h in the dark to allow settling of particles. The supernatant turbidity was then measured using a Hach 2100 AN turbidimeter.

### 2.3. Plant germination and treatment

Commercial dry seeds of *V. faba* (var. Aguadulce, Fabre®) were used for the experiments. In accordance with the French standard NF T90-327 (AFNOR, 2004), seeds were soaked in deionized water for 24 h, allowed to germinate between two layers of wet cotton at 22 °C for 3 days. After removing the primary root tips, the seedlings were suspended in aerated Hoagland's solution at 22 °C for 4 days to promote the development of secondary roots.

Each *V. faba* plantlet was placed in an individual pot (Wheaton® glass) containing 100 mL of the diluted suspension. During exposure, plant roots and ATN suspension were protected from light while leaves were placed under plant growth lights (125 W, Envirolite®, 6400 K). Four individuals were used per concentration, randomly disposed to balance a potentially unequal light distribution. Exposure

lasted 48 h without renewing exposure medium. The pots were briefly agitated 2 times a day to resuspend the particles. Experiments were conducted in a glove box, at 20 °C ± 1.

The dilution medium was used as a negative control. Maleic hydrazide 10 µM (MH; CAS 123-33-1) was used as a positive control for genotoxicity. CdCl<sub>2</sub> 0.1 mM (CAS 10108-64-2) was used as a positive control for root elongation and as a reference metal for thiol levels in tissues and oxidative stress biomarkers (Béraud et al., 2007; Lin et al., 2007).

### 2.4. Plant harvesting

After 48 h of exposure, secondary roots were carefully rinsed twice with ultrapure water and elongation of three secondary roots per plant was assessed by the difference between their length before and after exposure.

For micronucleus test, in accordance with the French standard NF T90-327 (AFNOR, 2004), root tips were excised and fixed overnight in Carnoy solution (25% glacial acetic acid: 75% ethanol, v:v) at +4 °C and then stored in 70% ethanol at +4 °C.

Photosystem II maximum quantum yield was assessed in leaves through Fv/Fm ratio using a portable Handy PEA (Handy-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Fv/Fm ratio is commonly used as an indicator of overall plant physiological status.

Fresh weight of shoots was determined. Shoots and roots were divided into 2 groups: the first group was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for glutathione, phytochelatin and oxidative stress biomarker measurements, the second group was frozen at -20 °C for Ti and Al determinations.

### 2.5. Metal analyses

Al and Ti concentrations in roots were determined. After drying at 105 °C and mineralization in HF-HClO<sub>4</sub>, metal concentrations in tissues were measured by ICP-MS.

### 2.6. Element location in plants

In order to localize the metal (Ti) in the plant tissues, X-Ray Fluorescence micro-spectroscopy (µ-XRF) analysis was performed on secondary roots exposed to 50 mg ATN/L, fixed in Carnoy solution and kept at +4 °C in 70% ethanol. To distinguish between Ti trapped in the mucilage from Ti included in the root tissues, the remaining mucilage was removed from certain roots following the protocol of Brams (1969) after slight adaptation. Roots conserved in 70% ethanol were rinsed 10 min in ultrapure water, and then immersed in 1 M NH<sub>4</sub>Cl (pH 4.15) for 10 min. After that, they were rinsed 2 × 10 min in ultrapure water before being put back in 70% ethanol.

Resulting "with mucilage" and "without mucilage" roots were then embedded in resin and cross sections were obtained with a diamond wire saw. µ-XRF measurements were carried out at the lab-scale on a microscope (XGT<sup>7000</sup>, Horiba Jobin Yvon) equipped with an X-ray guide tube producing a finely focused beam with a 10 µm spot size (Rh X-ray tube, accelerating voltage of 30 kV, current of 1 mA). Major elements (P, S, and Ca) were also detected by µ-XRF and images of their spatial distribution were obtained. Aluminium mapping was not possible because of the low µ-XRF sensitivity for light element detection.

### 2.7. Biochemical analyses

Activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) were measured according to Qiu-Fang et al. (2005) for SOD, to Chaoui et al. (1997) for CAT, to Roy et al. (1996) for GPX, and to García-Limones et al. (2002) for APX and GR, each of them modified by Dazy et al. (2008).

Lipid peroxidation was evaluated by the thiobarbituric assay of Aravind and Prasad (2003). Briefly, 900 µL of a 0.5% TBA in 20% TCA (w/v) solution were added to 100 µL of plant extract. The mixture was incubated at 95 °C for 30 min and the reaction was stopped by transferring tubes on ice. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the 532 nm absorbance and  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was used for the calculation of malondialdehyde (MDA) level.

Phytochelatin (PC) 2, 3, 4, 5 and glutathione contents in plant extracts were measured by HPLC according to the derivatization method of Courbot et al. (2004). PC standards were commercially provided (Anaspec, San Jose, USA). Protein contents were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

### 2.8. Micronucleus frequency

As described in the French standard NF T90-327 (AFNOR, 2004), the excised root tips were hydrolyzed in 1 N HCl at 60 °C for 6 min, squashed between a slide and its coverslip and stained with 1% aceto-orcein solution. Micronucleus frequencies were scored from 1000 cells per root tip under a 400× microscope magnification. Two slides were prepared for each of the 4 replicates and a total of 8000 mitotic cells

from 8 separate slides per experimental group were observed under blindfold conditions.

### 2.9. Statistical analyses

Before comparisons were run, care was taken to check for normality of variable distributions (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variances (Levene test). A One-way ANOVA was performed between ATN-exposed samples and negative controls, followed by Dunnett's *t*-test, risk level 5%.

Student *t*-test was performed between negative controls and MH or CdCl<sub>2</sub> treated plants.

Root metal concentrations showed no homoscedasticity, that is why a logarithmic transformation was performed before testing. Data were analysed using Statistica 7.0 software (StatSoft).

## 3. Results and discussion

### 3.1. ATN physico-chemical properties

Al and Ti total concentrations in 100 mg/L ATN mother suspension were respectively 3.44 and 52.29 ppm ( $\pm 5\%$ ), as determined by ICP-AES after acid digestion. These concentrations correspond to  $1.09 \pm 0.055$  mmol/L of Ti and  $0.127 \pm 0.006$  mmol/L of Al. Dissolved Al in the mother suspension was below 0.2 mg/L, corresponding to a maximum of 7.4  $\mu$ M of Al dissolved in the solution. This rate was not depending to the pH (5–9).

Physico-chemical properties of ATN were detailed by Labille et al. (2010) and Auffan et al. (2010). These authors display that the original nanocomposites are not completely degraded: the PDMS outer coating is significantly altered and desorbed, leaving aluminium hydroxide at the surface of the TiO<sub>2</sub> nanoparticles constituting the ATN. Moreover, no dissolved aluminium is detectable in solution. Labille et al. (2010) showed that the ATN are constituted of aggregates characterized by a size larger than 100 nm and an isoelectric point around 7.3 typical for Al(OH)<sub>3</sub> surface coating. These properties confer to the residues a weakly positive surface charge at environmental pH and a tendency to aggregate in most common surface waters.

Our results were in accordance with their observations: during the first 5 h after dilution (25 mg ATN/L), ATN tended to form aggregates larger than 10  $\mu$ m in size. The volume fraction of particles over 10  $\mu$ m increased from 17 to 88%, while the volume fraction of particles below 700 nm decreased from 14 to 3% (Fig. 1). We can also see that the relative turbidity of the suspension dramatically decreased when ATN concentration increased: 35.39, 16.47 and 3.73 for 5, 25 and 50 mg ATN/L, respectively. Therefore, ATN suspensions aggregated very rapidly, and the higher ATN concentration was, the more rapidly aggregation and sedimentation occurred. This tendency of ATN to self aggregation is certainly due to a pH close to the isoelectric point of the ATN, favouring screening of the interparticle electrostatic repulsions. Concerning ionic strength, Labille et al. (2010) find a critical coagulation

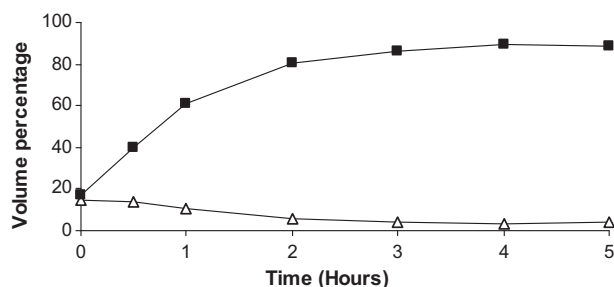


Fig. 1. Time evolution of particles size in the 5 first hours after dilution of ATN mother suspension to 25 mg ATN/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v). White triangles: particles below 700 nm; Black squares: particles over 10  $\mu$ m.

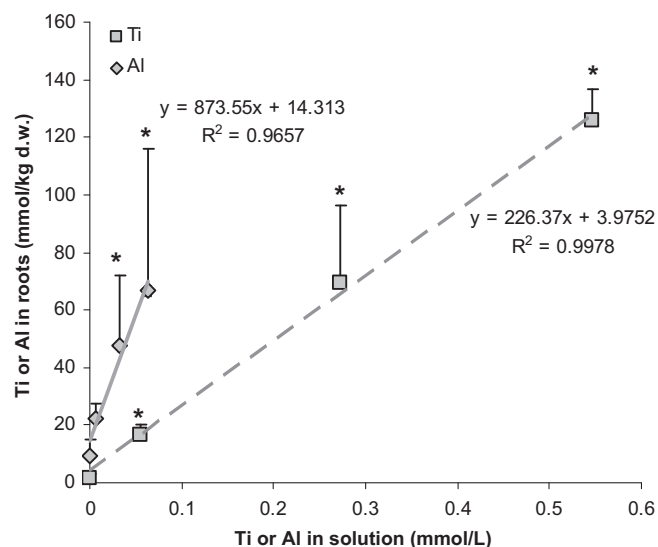


Fig. 2. Ti or Al concentrations in *V. faba* secondary roots after 48 h exposure with respect to their concentrations in exposure suspensions. \*Statistically significantly different from corresponding controls after logarithmic transformation, Dunnett's *t*-test,  $p < 0.05$ .

concentration for ATN suspension of 20 mM NaCl or 8 mM MgCl<sub>2</sub>. Nevertheless, according to these authors, a slow coagulation is initiated by 5 mM NaCl or 2 mM MgCl<sub>2</sub>, corresponding to ionic strengths of 5 and 6 mM, respectively. In comparison, our exposure matrix bore an ionic strength of 4.8 mM. Hence, to our sense, ionic strength played a minor role in ATN aggregation.

Besides, the kinetics of this aggregation mechanism is also determined by the ATN concentration, which controls their collision frequency, favouring faster aggregation and sedimentation at higher concentration. This effect is evidenced by the supernatant relative turbidities as a function of the ATN concentration. The turbidity after 24 h settling indeed decreases in a logarithmic way when the particle number increases. The equation describing the relative turbidity (*t*) as a function of the ATN concentration (*c*) is the following:  $t = -13.4 \ln(c) + 57.566$ ; the correlation coefficient is  $R^2 = 0.98715$ . However turbidity measurements gave direct evidence of colloids remaining in suspension. This implies different potential exposure routes and/or bioaccessibilities of the ATN according to their concentration.

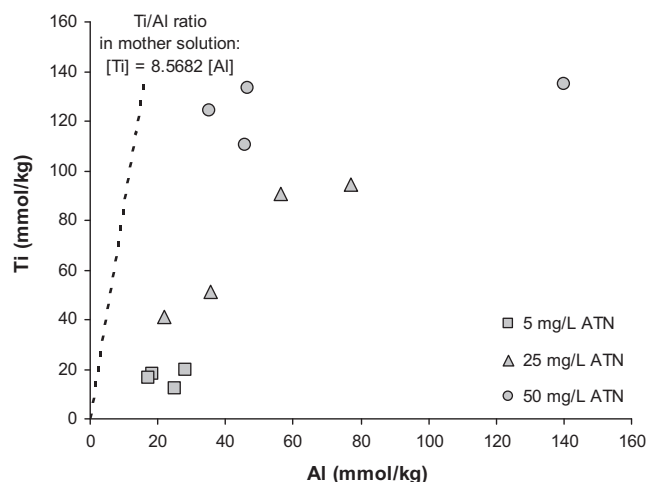


Fig. 3. Relationship between Ti and Al in *Vicia faba* secondary roots after 48 h exposure to different ATN concentrations. Dotted line: Ti/Al ratio in exposure suspension.



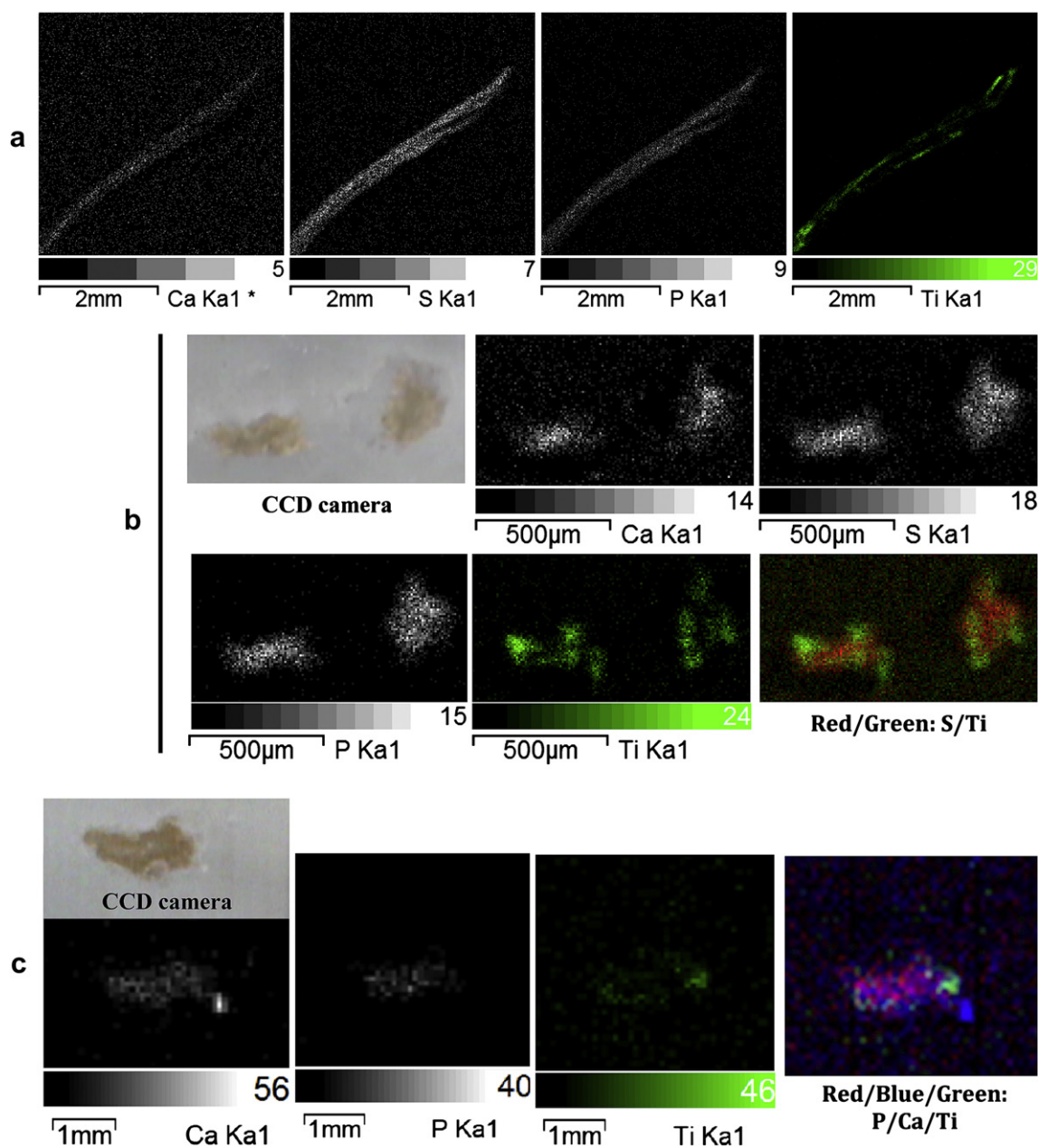
During exposure, root exudates could also have exerted an action on ATN physico-chemical properties, probably accelerating ATN aggregation.

At the end of the exposure, the pH of the exposure suspension was comprised between 6.18 and 6.87 without any clear correlation with ATN concentration.

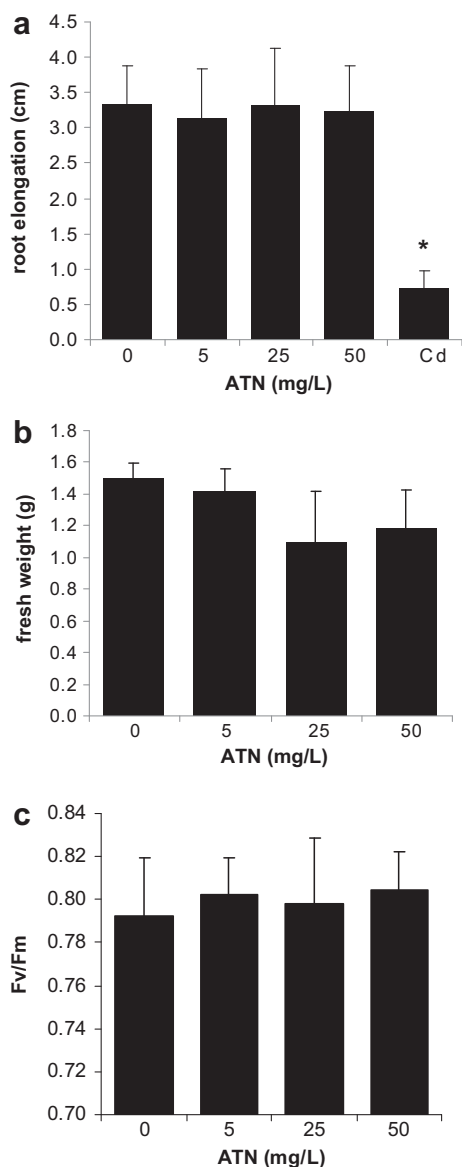
### 3.2. Ti and Al contents in tissues

Titanium and aluminium concentrations in plant roots are represented in Fig. 2. Titanium concentrations were highly different from controls regardless of ATN concentration. Aluminium concentrations were significantly different only for 25 and 50 mg ATN/L. A strong positive linear correlation exists

between Ti ( $r = 0.9661$ ,  $p < 0.001$ ) or Al ( $r = 0.6707$ ,  $p = 0.004$ ) concentrations in the ATN suspension and their respective concentrations in plant roots. Fig. 3 shows that whatever ATN concentration was, every individual contained a Ti/Al ratio smaller than the one existing in the exposure suspension. This implies that Al was internalized in a relatively larger extent than Ti into plant roots. This may be due to the higher dissolution constant of  $\text{Al}(\text{OH})_3$  coating compared to  $\text{TiO}_2$  core in the ATN, which favoured more soluble and bioavailable Al species, particularly in root microenvironment. Indeed, this one is acidified by the release of  $\text{H}^+$  ions by the root (Hinsinger et al., 2003; Yan et al., 1992) and some of the Al agglomerated to the roots can have been partially dissolved in contact with this special environment and preferentially absorbed comparing to Ti.



**Fig. 4.**  $\mu$ -XRF analyses of roots after 48 h exposure to 50 mg ATN/L. (a) Ca, S, P and Ti distribution in entire root (total counting time of  $15 \times 600$  s,  $256 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 16 \mu\text{m}$ ). (b) Ca, S, P and Ti distribution in two cross sections and S/Ti combined image (total counting time of  $15 \times 600$  s,  $128 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 8 \mu\text{m}$ ). (c) P, Ca and Ti distribution in cross section of the treated root (mucilage removed) and P/Ca/Ti combined image (total counting time of  $20 \times 600$  s,  $128 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 40 \mu\text{m}$ ). S was not detected. Contrast and luminosity were modified in the P/Ca/Ti combined image to ensure a better readability.



**Fig. 5.** (a): Secondary root elongation (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* exposed for 48 h to ATN ( $3 \times 4$  individuals). (b): Shoot fresh weight (4 individuals, mean  $\pm$  SD). (c): Fv/Fm ratio in leaves (4 individuals, mean  $\pm$  SD). Differences are not statistically significant (ANOVA,  $p < 0.05$ ) except for positive control Cd. (\*Student *t*-test,  $p < 0.05$ ).

Fig. 4a shows the spatial distribution of Ti along an entire root exposed to 50 mg ATN/L. Since the X-ray beam penetrates through the sample, Ti retention at the root surface (probably in the mucilage) or Ti included in the root tissues cannot be discriminated. Nevertheless, the chemical images of cross sections show high Ti concentrations, particularly in root periphery. Moreover Ti seems to

have been internalized in the peripheral tissues, at least in the 100 outermost micrometres of the root tissues (Fig. 4b). But it is difficult, from these chemical images, to precisely identify the interface between the mucilage and the root tissues: an additional treatment was performed on the roots in order to totally remove the mucilage.  $\mu$ -XRF mapping of this treated root (cross section) revealed the remaining presence of Ti (Fig. 4c). From these results, partial Ti penetration in root tissues can be validated.

We just showed through  $\mu$ -XRF analysis performed on roots exposed to 50 mg ATN/L that high titanium concentrations existed in root peripheral tissues. Yet, ATN particles, principally under the form of aggregates over 10  $\mu$ m, were not likely to penetrate into the root cells. In fact, nanoparticles with a diameter greater than 6 or 7 nm have few chances to pass through the cell wall pores (Andrew et al., 1997; Asli and Neumann, 2009; Baron-Epel et al., 1988; Carpita et al., 1979; Proseus and Boyer, 2005). *V. faba* root cell wall pores have an average diameter of 10–14 nm that can reach 20 nm (Hylmö, 1955, 1958). Such coating could result from the adsorption of the ATN onto the external tissues of the root and/or their trapping by mucilage. This phenomenon could reasonably be expected considering the opposite surface charges of ATN (+) (Labille et al., 2010) and cell walls (-) at pH = 6.5, enabling electrostatic attractions. The deposit of particles in the outer root tissues, leading to the filling of the cell pores and interstices, bothering or blocking the normal circulation of water and molecules of interest for the plant, is called “clogging” by Asli and Neumann (2009), who already supposed such a phenomenon on maize primary roots exposed to 30 nm TiO<sub>2</sub> nanoparticles colloidal suspension. This coating could explain the huge titanium concentrations we observed in *V. faba* roots (Fig. 2). It also could increase the smallest ATN particles intake by endocytosis via root hair (Ovečka et al., 2005), or ATN diffusion in the root tissues through the intercellular space without entering the cells. Indeed, 100 nm in size TiO<sub>2</sub> particles have shown ability to be transferred from roots towards the leaves in *Nicotiana tabacum* (Ghosh et al., 2010).

### 3.3. Biological effects of ATN on the plants

Both rutile and anatase nano-TiO<sub>2</sub> (4–6 nm diameter) can promote growth in spinach (Gao et al., 2008; Ma et al., 2010; Yang et al., 2006; Zheng et al., 2005). Nevertheless, in our study using nano-rutile, root elongation was not changed by ATN (Fig. 5a), and shoot biomass showed a slight tendency to decrease for 25 and 50 mg/L ATN (Fig. 5b). Besides, nano-anatase with 4–6 nm diameter have been proven to increase photosystem II efficiency in spinach after spraying on the leaves (Su et al., 2007; Zheng et al., 2007a). In that case, nanoparticles were shown to have been internalized in the chloroplast and bound to photosystem II (Zheng et al., 2007b). Once again, in our work, Fv/Fm ratio did not change under ATN exposure (Fig. 5c).

Shoot MDA levels and antioxidant enzyme activities were not modified following exposure to ATN comparatively to control group. In Cd-exposed plants similar results were obtained (Table 1). Thiol

**Table 1**

Malondialdehyde and oxidative stress enzymes activities in shoot tissues of *Vicia faba* plantlets after 48 h exposure to ATN (mean  $\pm$  SD). SOD units are U/g fw, where 1 U stands for the activity that inhibits nitro blue tetrazolium photoreduction by 50% compared with tubes lacking enzyme extract. No statistically significant difference from controls, ANOVA,  $p < 0.05$ . Cadmium treated plants not statistically significantly different from controls, Student *t*-test,  $p < 0.05$ .

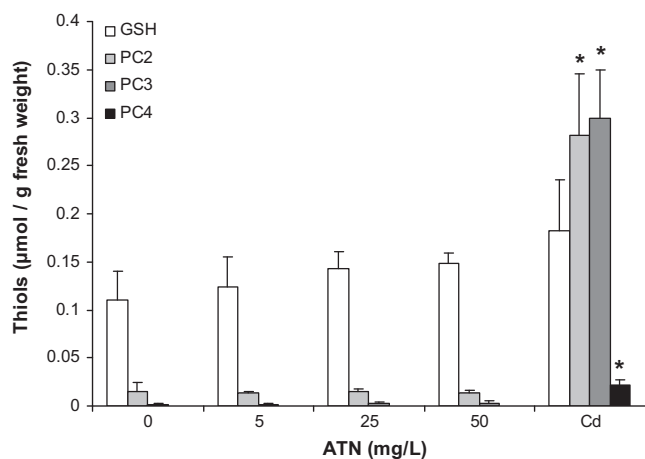
	Control	5 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	CdCl <sub>2</sub>
MDA $\times 10^{-8}$ (mol/g fw)	4.93 $\pm$ 2.02	4.69 $\pm$ 0.84	5.56 $\pm$ 2.07	4.65 $\pm$ 1.29	5.69 $\pm$ 1.21
CAT $\times 10^{-4}$ (mol/min/g fw)	8.40 $\pm$ 3.48	2.49 $\pm$ 1.37	4.74 $\pm$ 5.48	4.38 $\pm$ 2.82	7.48 $\pm$ 4.66
SOD (U/g fw)	27.00 $\pm$ 7.87	16.17 $\pm$ 2.32	20.80 $\pm$ 9.33	17.39 $\pm$ 4.16	29.86 $\pm$ 13.72
GR $\times 10^{-6}$ (mol/min/g fw)	3.60 $\pm$ 1.09	2.61 $\pm$ 0.38	2.93 $\pm$ 0.57	3.09 $\pm$ 0.53	2.76 $\pm$ 0.71
GPX $\times 10^{-6}$ (mol/min/g fw)	0.915 $\pm$ 0.176	0.884 $\pm$ 0.157	0.928 $\pm$ 0.205	0.848 $\pm$ 0.120	1.024 $\pm$ 0.310
APX $\times 10^{-6}$ (mol/min/g fw)	3.90 $\pm$ 1.97	2.72 $\pm$ 0.45	3.46 $\pm$ 0.96	4.23 $\pm$ 0.00	3.59 $\pm$ 0.86
Proteins (mol/g fw)	1.89 $\pm$ 0.78	2.74 $\pm$ 0.43	2.00 $\pm$ 1.16	2.57 $\pm$ 0.59	1.93 $\pm$ 0.79

**Table 2**  
Malondialdehyde and oxidative stress enzyme activities in root tissues of *Vicia faba* plantlets after 48 h exposure to ATN (mean  $\pm$  SD). SOD units are U/g fw, where 1 U stands for the activity that inhibits nitro blue tetrazolium photoreduction by 50% compared with tubes lacking enzyme extract. \*Statistically significantly different from controls, ANOVA followed by Dunnett's *t*-test,  $p < 0.05$ . #Cadmium treated plants statistically significantly different from controls, Student *t*-test,  $p < 0.05$ .

	Control	5 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	CdCl <sub>2</sub>
MDA $\times 10^{-8}$ (mol/g fw)	2.26 $\pm$ 0.27	2.41 $\pm$ 1.82	3.39 $\pm$ 1.32	2.85 $\pm$ 0.51	5.50 $\pm$ 1.55#
CAT $\times 10^{-7}$ (mol/min/g fw)	3.56 $\pm$ 0.94	3.11 $\pm$ 0.53	3.44 $\pm$ 0.95	3.77 $\pm$ 0.49	5.81 $\pm$ 1.07#
SOD (U/g fw)	13.83 $\pm$ 2.57	12.84 $\pm$ 2.73	15.47 $\pm$ 6.74	13.44 $\pm$ 2.58	34.38 $\pm$ 13.91#
GR $\times 10^{-6}$ (mol/min/g fw)	1.177 $\pm$ 0.131	1.157 $\pm$ 0.131	0.846 $\pm$ 0.476	0.243 $\pm$ 0.424*	0.674 $\pm$ 0.303#
GPX $\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	1.717 $\pm$ 0.125	1.748 $\pm$ 0.227	1.681 $\pm$ 0.561	1.787 $\pm$ 0.229	3.053 $\pm$ 0.415#
APX $\times 10^{-6}$ (mol/min/g fw)	5.388 $\pm$ 0.868	3.711 $\pm$ 0.517*	3.689 $\pm$ 0.315*	4.062 $\pm$ 1.294	7.741 $\pm$ 3.704
Proteins (mol/g fw)	0.729 $\pm$ 0.166	0.606 $\pm$ 0.225	0.539 $\pm$ 0.265	0.547 $\pm$ 0.200	0.340 $\pm$ 0.120#

concentrations in shoots were neither modified by ATN nor by Cd (data not shown). In roots, lipid peroxidation, MDA levels significantly increased in Cd-exposed individuals but not in ATN-exposed individuals (Table 2). CAT, SOD and GPX enzymes responded similarly to MDA levels (Table 2). On the contrary, GR enzyme and total proteins decreased in Cd-exposed roots. In ATN-exposed plants, GR activity decreased significantly at 50 mg ATN/L (ANOVA  $p = 0.0037$ ). Nevertheless, APX activity significantly decreased (ANOVA  $p = 0.0433$ ) only for 5 and 25 mg ATN/L. In other studies, anatase and rutile nano-TiO<sub>2</sub> enhanced superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities and decreased malondialdehyde in chloroplasts exposed to UV (Hong et al., 2005; Zheng et al., 2008). Malondialdehyde could also be increased in *Allium cepa* roots (Ghosh et al., 2010). To the contrary, our study showed that in shoots, none of oxidative stress biomarker was affected by ATN. Even when exposed to Cd, anti-oxidative stress biomarkers in shoots remained unchanged, suggesting a limited transfer from the root tissue. In roots exposed to ATN, none of these biomarkers was either increased, but roots remained hidden from light during exposure and, to our knowledge, no element in the literature deal with a similar case. Another hypothesis could be that the decrease of GR and APX may be due to dissolved aluminium, but in the literature, Al at low concentrations in higher plants is mostly responsible for an enhanced oxidant stress enzyme activity and/or expression (Boscolo et al., 2003; Darkó et al., 2004; Dipierro et al., 2005; Sharma and Dubey, 2007; Simonovičová et al., 2004; Tamás et al., 2006). Therefore, this hypothesis is not either convincing.

Total GSH in roots was not affected in ATN-treated individuals (Fig. 6). GSH/GSSG ratio remained constant (data not shown). PC2, PC3 and PC4 synthesis was stimulated in Cd-treated roots but not in ATN-treated ones.

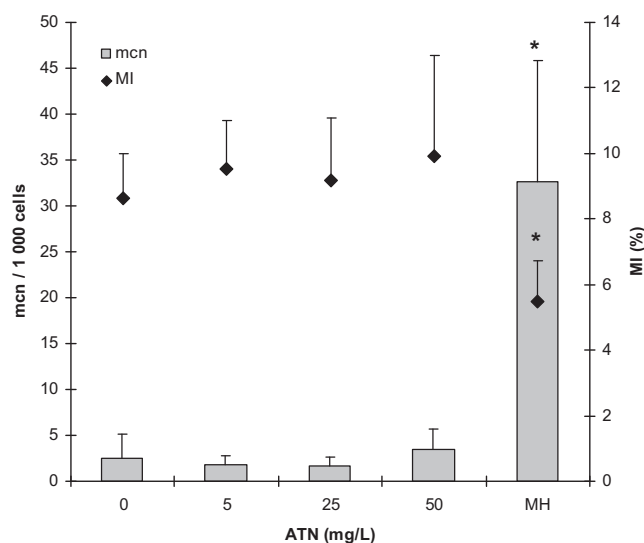


**Fig. 6.** Thiol concentrations (GSH and PCs, mean  $\pm$  SD) in roots of *V. faba* exposed 48 h to ATN (4 individuals). Differences between ATN-treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . Cd: reference metal. \*Statistically significant from controls (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ).

Not surprisingly, positive control (MH) induced a 13-fold increase of micronucleus frequency and a decrease of mitotic index (8.6 and 5.5% in negative and positive controls respectively). Exposure of *V. faba* roots to ATN did not lead to any genotoxicity (Fig. 7). Cell division, assessed by mitotic index, was not modified too.

In the literature, photogenotoxicity of nano-TiO<sub>2</sub> was proven (Nakagawa et al., 1997), but data are contradictory in plants. In *A. cepa*, no genotoxicity was found, but only the mitotic index was modified in root meristems (Klančnik et al., 2011). To the contrary, Ghosh et al. (2010) proved genotoxic effects of 100 nm in size TiO<sub>2</sub> particles in *A. cepa* roots and *N. tabacum* leaves.

Comparing effects in plants of bare TiO<sub>2</sub> nanoparticles with the effects of altered nanocomposites observed in this study leads us to suggest that no or very few bare nanoparticles were released from ATN during our experiment. To summarize, no biomarker was significantly modified by ATN in shoots, and only few ones in roots, without any clear concentration response relationship. Moreover, neither genotoxicity nor phytochelatin synthesis was seen in roots. Despite a high quantity of aluminium and titanium oxides in roots, the quasi-absence of neither effects nor defence reaction noticed in plants would be in accordance with the hypothesis according to which the metals internalized in the roots were still under a biologically inert form. Nevertheless, since Ti/Al ratio was always lower in tissues than in exposure suspension (Fig. 3), we can think that ATN structures presented by Auffan et al. (2010) and Labille et al. (2010) were not under unchanged form in tissues, since aluminium seemed to have been partly solubilized.



**Fig. 7.** Micronucleus frequency and mitotic index (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* roots exposed 48 h to ATN (2  $\times$  4 individuals). Differences between ATN-treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . MH: positive control. \*Statistically significantly different from controls (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ).

Ti and Al metals remained in the root peripheral tissues (Fig. 4b and c). We can suppose that metals found in root tissues represent a very small proportion of ATN, but our results did not indicate whether ATN particles were effectively internalized in root cells. Perhaps they only stayed in intercellular matrix. The small part of ATN internalized in root tissues and the high quantity of ATN agglomerated on the root surface could have exerted a mechanic action, for example by blocking cell connections or cell wall pores (Asli and Neumann, 2009; Ma et al., 2010), which could explain the slight decrease of shoot biomass for 25 and 50 mg/L ATN and the decrease of GR and APX activities in roots.

#### 4. Conclusion

To our knowledge, this work is the first published study related to the effects of altered commercial sunscreen nanocomposites in plants. High metal concentrations were detected in the roots exposed to ATN, and titanium internalization was even observed in the root tissues. However no biological effect was observed as opposed to results from the literature obtained on bare nano-TiO<sub>2</sub>. Therefore, for TiO<sub>2</sub> nanoparticles risk assessment, this study showed that apparently, no bare nanoparticle was released from commercial nanocomposite, which indicate that the behaviour of the nanoparticles is strongly affected by their surface modifications. Our results were obtained for exposure concentrations fortunately far above the expected concentrations of such materials in wastewaters or surface waters (Gottschalk et al., 2010; Mueller and Nowack, 2008) and like for every substance, toxicological data have to be compared with the real concentration found in the environment (Nowack, 2009). Moreover, it is noteworthy to specify that in waters with pH upper than 7.3, ATN will hold a negative charge (Labille et al., 2010), leading electronic repulsiveness with cells and possibly reducing the clogging phenomenon. Other phenomena like organic-matter adsorption could also lead to the creation of negatively charged particles playing a role in the clogging.

Therefore, sunscreen nanocomposites seem not to exert deleterious effects on our plant model in 48 h, but the observed important clogging onto the roots and above all, titanium inclusion in root tissues are worrying phenomena. Indeed, one can imagine long-term effects in the plant. A deep improvement of knowledge about long-term effects of such manufactured nanocomposites towards living organisms is seriously needed.

#### Acknowledgements

The authors thank the French National Program NANOALTER (INSU/EC2CO/CYTRIX), the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME, Paris, France) and Region Lorraine for financial support.

#### Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.envpol.2011.06.020.

#### References

AFNOR, 2004. NF T90-327. Soil Quality – assessment of genotoxic effects to higher plants – micronucleus test on *Vicia faba*. In: AFNOR. Saint-Denis, p. 13.

AFSSET, 2010. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement, p. 207.

Andrew, C., Peter, T.G., Timothy, J.W., 1997. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, 289–295.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 391–397.

Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., Christensen, F.M., 2011. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health – lessons learned from four case studies. *Environment International* 37, 1143–1156.

Asli, S., Neumann, P.M., 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell & Environment* 32, 577–584.

Auffan, M., Pedeutour, M., Rose, J., Masion, A., Ziarelli, F., Borschneck, D., Chaneac, C., Botta, C., Chaurand, P., Labille, J., Bottero, J.-Y., 2010. Structural degradation at the surface of a TiO<sub>2</sub>-based nanomaterial used in cosmetics. *Environmental Science & Technology* 44, 2689–2694.

Barker, P.J., Branch, A., 2008. The interaction of modern sunscreen formulations with surface coatings. *Progress in Organic Coatings* 62, 313–320.

Baron-Epel, O., Gharyal, P.K., Schindler, M., 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175, 389–395.

Baun, A., Hartmann, N., Grieger, K., Kusk, K., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* 17, 387–395.

Béraud, E., Cotellet, S., Leroy, P., Féraud, J.-F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 633, 112–116.

Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A., 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62, 181–189.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.

Brams, E., 1969. The mucilaginous layer of citrus roots – its delineation in the rhizosphere and removal from roots. *Plant and Soil* 30, 105–108.

Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – evidence and impacts. *Waste Management* 30, 504–520.

Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D.P., 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205, 1144–1147.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127, 139–147.

Cotellet, S., Masfarau, J.-F., Féraud, J.-F., 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426, 167–171.

Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M., Leroy, P., 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7413–7417.

Darkó, É., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., Barnabás, B., 2004. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science* 166, 583–591.

Dazy, M., Jung, V., Féraud, J.-F., Masfarau, J.-F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74, 57–63.

Dipierro, N., Mondelli, D., Paciolla, C., Brunetti, G., Dipierro, S., 2005. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. *Journal of Plant Physiology* 162, 529–536.

Farré, M., Sanchís, J., Barceló, D., 2011. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 517–527.

Gao, F., Liu, C., Qu, C., Zheng, L., Yang, F., Su, M., Hong, F., 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO<sub>2</sub> treatment related to the changes of rubisco activase? *BioMetals* 21, 211–217.

García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., Tena, M., 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 325–337.

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81, 1253–1262.

Gottschalk, F., Scholz, R.W., Nowack, B., 2010. Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: methodology and an application to engineered nano-TiO<sub>2</sub> particles. *Environmental Modelling & Software* 25, 320–332.

Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248, 43–59.

Hong, F.-S., Yang, P., Gao, F.-Q., Liu, C., Zheng, L., Yang, F., Zhou, J., 2005. Effect of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on spectral characterization of photosystem II particles from spinach. *Chemical Research in Chinese Universities* 21, 196–200.

Hylmö, B., 1955. Passive components in the ion absorption of the plant I. The zonal ion and water absorption in Brouwer's experiments. *Physiologia Plantarum* 8, 433–449.

Hylmö, B., 1958. Passive components in the ion absorption of the plant II. The zonal water flow, ion passage, and pore size in roots of *Vicia Faba*. *Physiologia Plantarum* 11, 382–400.

Jacobs, J., van de Poel, I., Ossweijer, P., 2010. Sunscreens with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nano-particles: a societal experiment. *NanoEthics* 4, 103–113.



- Johnson, A.C., Bowes, M.J., Crossley, A., Jarvie, H.P., Jurkschat, K., Jürgens, M.D., Lawlor, A.J., Park, B., Rowland, P., Spurgeon, D., Svendsen, C., Thompson, I.P., Barnes, R.J., Williams, R.J., Xu, N., 2011. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO<sub>2</sub> nanoparticles in UK field scenarios. *Science of the Total Environment* 409, 2503–2510.
- Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., Boller, M., 2008. Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* 156, 233–239.
- Kiser, M.A., Westerhoff, P., Benn, T., Wang, Y., Pérez-Rivera, J., Hristovski, K., 2009. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 43, 6757–6763.
- Klančnik, K., Drobne, D., Valant, J., Dolenc Koče, J., 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO<sub>2</sub>. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 85–92.
- Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2010. Aging of TiO<sub>2</sub> nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution* 158, 3482–3489.
- Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q., 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences (China)* 19, 596–602.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A., 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment* 408, 3053–3061.
- Manier, N., Deram, A., Le Curieux, F., Marzin, D., 2009. Comparison between new wild plant *Trifolium repens* and *Vicia faba* on their sensitivity in detecting the genotoxic potential of heavy metal solutions and heavy metal-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution* 202, 343–352.
- Menard, A., Drobne, D., Jemec, A., 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO<sub>2</sub>. Review of in vivo data. *Environmental Pollution* 159, 677–684.
- Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P.-M., Cotelle, S., Ferard, J.-F., 2005. Assessment of the genotoxicity of <sup>137</sup>Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *Journal of Environmental Radioactivity* 81, 143–153.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42, 4447–4453.
- Nakagawa, Y., Wakuri, S., Sakamoto, K., Tanaka, N., 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 394, 125–132.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386.
- Nowack, B., 2009. Is anything out there? What life cycle perspectives of nano-products can tell us about nanoparticles in the environment. *Nano Today* 4, 11–12.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150, 5–22.
- Ovečka, M., Lang, I., Baluška, F., Ismail, A., Illeš, P., Lichtscheidl, I.K., 2005. Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226, 39–54.
- Petosa, A.R., Jaisi, D.P., Quevedo, I.R., Elimelech, M., Tufenkji, N., 2010. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. *Environmental Science & Technology* 44, 6532–6549.
- Proseus, T.E., Boyer, J.S., 2005. Turgor pressure moves polysaccharides into growing cell walls of *Chara corallina*. *Annals of Botany* 95, 967–979.
- Qiu-Fang, Z., Yuan-Yuan, L., Cai-Hong, P., Cong-Ming, L., Bao-Shan, W., 2005. NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *Plant Science* 168, 423–430.
- Radetski, C.M., Ferrari, B., Cotelle, S., Masfarau, J.F., Ferard, J.F., 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment* 333, 209–216.
- Reijnders, L., 2006. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *Journal of Cleaner Production* 14, 124–133.
- Reijnders, L., 2008. Hazard reduction for the application of titania nanoparticles in environmental technology. *Journal of Hazardous Materials* 152, 440–445.
- Roy, S., Sen, C.K., Hänninen, O., 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 32, 2305–2315.
- Sharma, P., Dubey, R., 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports* 26, 2027–2038.
- Šimonovićová, M., Tamás, L., Huttová, J., Mistrík, I., 2004. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biologia Plantarum* 48, 261–266.
- Su, M., Wu, X., Liu, C., Qu, C., Liu, X., Chen, L., Huang, H., Hong, F., 2007. Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO<sub>2</sub>. *Biological Trace Element Research* 119, 183–192.
- Tamás, L., Huttová, J., Mistrík, I., Šimonovićová, M., Siroká, B., 2006. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. *Journal of Plant Physiology* 163, 781–784.
- Ünyayar, S., Celik, A., Cekic, F.O., Gozel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21, 77–81.
- Wakefield, G., Green, M., Lipscomb, S., Flutter, B., 2004. Modified titania nanomaterials for sunscreen applications reducing free radical generation and DNA damage. *Materials Science and Technology* 20, 985–988.
- Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1992. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiology* 99, 415–421.
- Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C., Yang, P., 2006. Influence of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110, 179–190.
- Zheng, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C., 2005. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research* 104, 83–91.
- Zheng, L., Su, M., Liu, C., Chen, L., Huang, H., Wu, X., Liu, X., Yang, F., Gao, F., Hong, F., 2007a. Effects of nanoanatase TiO<sub>2</sub> on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological Trace Element Research* 119, 68–76.
- Zheng, L., Su, M., Wu, X., Liu, C., Qu, C., Chen, L., Huang, H., Liu, X., Hong, F., 2007b. Effects of nano-anatase on spectral characteristics and distribution of LHCII on the thylakoid membranes of spinach. *Biological Trace Element Research* 120, 273–283.
- Zheng, L., Su, M., Wu, X., Liu, C., Qu, C., Chen, L., Huang, H., Liu, X., Hong, F., 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research* 121, 69–79.