THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Mme RAYENNE SARIA

le mercredi 3 décembre 2014

Titre :

ETUDE DES MECANISMES DE TOXICITE DES NANOTUBES DE CARBONE MULTI-PAROIS CHEZ LE MODELE AMPHIBIEN XENOPUS LAEVIS

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDUEE)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

M. ERIC PINELLI

M. LAURY GAUTHIER

Rapporteurs :

M. KHEREDDINE OUALI, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

M. STEPHANE BETOULLE, UNIVERSITE DE REIMS

Membre(s) du jury :

M. FRANCK GILBERT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ERIC PINELLI, INP TOULOUSE, Membre

M. LAURY GAUTHIER, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. PATRICE GONZALEZ, UNIVERSITE BORDEAUX 1, Membre

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.
Marcel Proust

Remerciements

À l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur».

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Laury GAUTHIER et Eric PINELLI, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'ils ont consacré à diriger cette recherche.

Je remercie tout aussi sincèrement Stéphane BETOULLE, Kheireddine OUALI et Patrice GONZALEZ d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Merci à eux d'avoir contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante. Je tiens également à remercier Franck GILBERT d'avoir accepté d'être président du jury.

*Qu'aurait été cette thèse sans la participation de l'ensemble des membres de l'équipe Écotoxicologie et Sante des Écosystèmes (*ECSECO*) et plus particulièrement Séverine JEAN-DUPUY, George MERLINA, Jérôme SILVESTRE, Jean KALLERHOFF mais aussi Christophe LAPLANCHE, David BAQUET et Florence MOUCHET.*

Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution et le dévouement du personnel du service d'exploration de la fonction respiratoire et médecine du sport et plus particulièrement le professeur Jacque RAMI et la technicienne Régine. Un grand merci à Frederic MARTINS et Jean-José MAORET, de la plateforme génome et transcriptome. Leur rigueur et leur pédagogie hors du commun ont donné une qualité exceptionnelle à ce travail de thèse.

Ce travail a également pu aboutir grâce à l'aide remarquable de ma collègue et amie Annie PERRAULT qui m'a soutenue aussi bien moralement qu'intellectuellement durant ces trois

années de dur labeur. Merci à elle d'avoir su être une maman, une copine mais aussi une partenaire hors du commun lors des expérimentations très délicates que nous avons eu l'occasion de réaliser ensemble durant cette thèse. Merci à elle aussi pour ces instants de rire que nous avons partagé et qui m'ont permis de me remotiver lors des moments difficiles que j'ai pu rencontrer durant ma thèse.

Je remercie également l'ensemble du personnel ECOLAB et plus particulièrement Annick CORREGE, Marie-josée TAVELLA, Virginie PAYRE-SUC et Catherine GIOVANNINI. Même si ces personnes n'ont pas dirrctement été impliquées dans mon travail de thèse, elles ont néanmoins contribué par leur sympathie et leur bonne humeur à mon épanouissement au sein de mon lieu de travail quotidien.

Je tiens aussi par ce travail à rendre hommage à un très grand homme, Monsieur Bruno FAUCON. Un chercheur hors normes qui savait allier rigueur et humour. Saches que même si aujourd'hui tu ne fais plus partie de ce monde, tu resteras à tout jamais gravé dans ma mémoire et je ne pourrais à aucun moment oublier tout ce que tu as fait pour moi. Cette thèse elle est pour toi et pour la famille formidable que tu as.

Je ne pourrais jamais oublier l'ensemble des étudiants que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant ma thèse et qui ont participé chacun à sa manière à ce travail. Floriane BOURDIOL, Désirée el AZZI, Abdoul BASTOYE, Lauris EVARISTE, Ingrid GONZALEZ, Oussama CHAMSSI, Elsa YKEN, Jessica KARAM, Loubna EL FELS, Moulka BRAIA et Clemens VON SCHEFFER…. Merci pour chaque bon moment que nous avons passé ensemble.

Un grand merci va aussi à mes amis Carol, Dominique, Marion, Bedour, Kahina, Amel, Céline, Dimitri…qui m'ont soutenu du début et jusqu'au dernier jour de ma thèse. Ces personnes ont joué un rôle très important dans la concrétisation de mon rêve le plus cher, celui d'être « docteur ».

Mes remerciements vont aussi à ma famille avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doute, elle m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à mon papa et ma maman qui n'ont jamais douté de moi, même dans les moments difficiles. Merci à eux de m'avoir toujours poussé à

aller le plus loin possible même si cela à leur a nécessité certains sacrifices. Merci à mes sœurs Lydia et Yasmine qui m'ont toujours épaulé dans les périodes de doute et les moments de nostalgie. Je remercie également ma tante Nadia, son mari Slimane et mes cousines Camélia, Lina et Nawel. Merci à eux de m'avoir accueilli et de m'avoir offert cette chaleur familiale qui me manquait tant.

Je clôture ces remerciements avec une attention particulière à mon cher et adorable mari Nasrallah. Ce n'était pas toujours facile pour lui de gérer les soirées de stress, de pleur et même de travail acharné qu'il a pu subir durant ces trois années de thèse. Je le remercie pour son soutien et son dévouement sans limites qui m'ont permis d'atteindre mon objectif. Je tiens également à le féliciter pour l'obtention de son titre de docteur en même temps que moi.

Table des matières

Liste des figures 1
Liste des tableaux 3
Liste des abréviations 4
Introduction générale 8
Références bibliographiques 14
Chapitre I : introduction bibliographique 16
I. Généralités sur les nanotubes de carbone 16
I.1. Définition des nanomatériaux 16
I.2. Structure et morphologie des nanotubes de carbone 16
I.3. Propriétés des nanotubes de carbone 18
I.3.1. Propriétés mécaniques 19
I.3.2. Propriétés électriques 19
I.3.3. Propriétés chimiques 20
I.3.4. Propriétés optiques 20
I.4. Synthèse des nanotubes de carbone 21
I.4.1. Méthode de synthèse par arc électrique 21
I.4.2. Méthode de synthèse par ablation laser 22
I.4.3. Méthode de synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD) 22
I.5. Production et applications des nanotubes de carbone 23
I.5.1. La production mondiale des nanotubes de carbone 23
I.5.2. Les domaines d'application des nanotubes de carbone 25
II. Ecotoxicité des nanotubes de carbone 28
II.1. Etat de l'art 28
II.2. Etude de l'écotoxicité des NTC sur différents organismes 28
II.2.1. Impact des NTC sur les micro-organismes 29
II.2.2. Impact des NTC sur les végétaux 30
II.2.3. Impact des NTC sur les organismes terrestres 32
II.2.4. Ecotoxicité des NTC vis-à-vis des organismes aquatiques 33
II.2.4.1. Effets des NTC sur les microorganismes autotrophes et hétérotrophes aquatiques. 34
II.2.4.2. Effets des NTC sur les invertébrés benthiques et pélagiques 35

II.2.4.3. Effets des NTC sur les vertébrés pélagiques 37
III. Mécanismes de toxicité des NTC 39
III.1. Adsorption, absorption et translocation des NTC 39
III.2. Induction du stress oxydant 41
III.2.1. définition *41*
III.2.2. Stress oxydant et nanotubes de carbone *42*
III.2.3. Systèmes antioxydants *43*
III.2.3.1. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) 44
III.2.3.2. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9) 46
III.2.3.3. La catalase (EC 1.11.1.6) 47
III.2.3.4. La glutathion réductase (EC 1.6.4.2) 48
III.2.3.5. Les peroxyrédoxines 49
III.2.4. Dégâts oxydatifs cellulaires *51*
III.2.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN 51
III.2.4.2. peroxydation lipidique 53
III.2.4.3. Induction de la réponse inflammatoire 55
Références bibliographiques 58
Chapitre II : présentation du modèle biologique et des conditions d'exposition aux NTCMW 70
I. Le modèle biologique : l'amphibien *Xenopus laevis* 70
II. Elevage de l'amphibien *Xenopus laevis* 73
II.1. Elevage des adultes reproducteurs 73
II.2. Reproduction *in vivo* et élevage des larves jusqu'au stade 50 et 54 73
III. Evaluation de la toxicité des NTCMW vis-à-vis du model amphibien *X. laevis* 75
III.1. Protocole d'exposition des larves 75
III.2. Préparation des milieux d'exposition 76
III.2.1. Dispersion des NTC par un bain à ultrason (NTC bruts) *77*
III.2.2. Dispersion des NTC par la matière organique « suwannee river » (NTC dispersés) *77*
IV. Gestion des déchets contaminés par les nanotubes de carbone 78
Références bibliographiques 80
Chapitre III : mise en évidence de l'effet des NTCMW sur les larves de *Xenopus laevis* 82
I. Introduction 82

II. Production et caractérisation des NTCMW 84
III. Évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW 87
III.1. protocoles 87
III.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë des NTCMW 87
III.1.2. Mesure des paramètres du stress oxydant 87
III.1.2.1. Mesure de la concentration du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 87
III.1.2.2. Mesure des activités enzymatiques impliquées dans la réponse au stress oxydant 88
III.1.3. Mesure de la peroxydation des lipides 92
III.1.4. Mesure des dommages à l'ADN par le test des Comètes 93
III.2. Analyses statistiques des données 98
III.3. Résultats 98
III.3.1. Evaluation de la toxicité aigüe des NTCMW 98
III.3.2. Effet des NTCMW sur l'induction du stress oxydant 99
III.3.2.1. Induction d'ERO par des larves exposées au NTCMW 100
III.3.2.2. Induction des enzymes du stress oxydant en présence de NTCMW 101
III.3.3. Effets de la dispersion des NTCMW sur les paramètres du stress oxydant 103
III.3.3.1. Impact des NTCMW dispersés sur la production d'H_2O_2 103
III.3.3.2. Impact des NTCMW dispersés sur les activités enzymatiques GR, CAT et SOD105
III.3.4. Effet des NTCMW sur la peroxydation des lipides 107
III.3.5. Evaluation des effets génétiques des NTCMW par le test des Comètes 108
IV. Discussion 110
V. Conclusion 117
Références bibliographiques 118
Chapitre IV : Mécanisme d'induction du stress oxydant chez les larves de Xenopus laevis exposées aux NTCMW bruts 122
I. Introduction 122
II Matériel et méthodes 126
II.1. Mesure du relargage des métaux par les NTCMW 126
II.2. Localisation des NTCMW dans les larves de Xenopus laevis 127
II.3 Dosages des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition (O_2, pH) 127
II.4. Dosage des paramètres sanguins chez les larves de X. laevis exposées à des NTCMW bruts 129
II.5. Mesure de l'expression de gènes par une technique de RT-PCR quantitative (q RT-PCR) innovante (Fluidigm C1 single cell) 130

II. 5.1. Principe de mesure *130*
II.5.2. Préparation des échantillons *132*
II.5.3. Préparation des réactifs *132*
II.5.3.1. Préparation des ARN étalon (ARN spikes) 132
II.5.3.2. Préparation du pool d'amorces à 500 mM 133
II.5.3.3. Préparation de la solution de lyse (Lysis Mix) 135
II.5.3.4. Préparation du mix de rétro transcription (RT Final Mix) 135
II.5.3.5. Préparation de la solution de pré-amplification (PreAmp final mix) 135
II.5.3.6. Préparation de la solution de marquage des cellules mortes et vivantes (LIVE/DEAD Cell Staining solution) 136
II.5.4. Préparation de la puce C1 ..... *136*
II.5.4.1. Pré-remplissage de la puce 136
II.5.4.2. Préparation des cellules (Cell Mix) 137
II.5.4.3. Chargement des cellules 138
II.5.4.4. Lyse, retro-transcription (RT) et pré-amplification sur puce C1 139
II.5.4.5. Récupération des produits pré-amplifiés 140
II.5.5. Préparation des tubes contrôles *140*
II.5.5.1. Lyse et RT 140
II.5.5.2. Pré-amplification 141
II.5.5.3. Dilution et dénaturation 141
II.5.6. Quantification de l'expression des gènes cibles par le système BioMark *141*
II.5.6.1. Préparation des échantillons (Sample Pre-Mix) 141
II.5.6.2. Préparation des amorces (Primer Pre-Mix) 142
II.5.6.3. Chargement de la plaque 142
II.5.7. Exploitation des résultats *143*
II.6. Traitement statistique des données 143
III. Résultats 145
III.1. Evaluation du relargage des métaux par les NTCMW dans le milieu d'exposition 145
III.2. Détection de la présence de NTCMW chez les larves de *X. laevis* 146
III.3. Impact des NTCMW bruts sur les paramètres sanguins (pO_2, pCO_2, pH et ctHb) des larves de *X. laevis* 148
III.4.Détermination des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition 150
III.5. Analyse de l'expression de gènes dans les érythrocytes de larves de *X. laevis* par qRT-PCR 151

IV. Discussion 155
V. Conclusion 164
Références bibliographiques 166
Discussion, conclusion générale et perspectives 172
Références bibliographiques 190

Liste des figures

Figure I.1 : Représentation d'un feuillet graphène; d'un NTC mono-paroi fermé par deux demi-fullerènes et du fullerène C60. 17
Figure I.2 : Représentation schématique d'un nanotube de carbone mono-paroi, bi-paroi et multi-paroi. 17
Figure I.3 : Evolution de la surface spécifique des NTC en fonction du nombre de parois et du diamètre. 19
Figure I.4 : Estimation de l'évolution de la capacité de production mondiale de NTC 24
Figure I.5 : Observation en MET d'une coupe de feuille d'Oryza sativa. 31
Figure I.6: Sécrétion de mucus et adsorption de NTCSW à la surface de branchies de truites (Oncorhynchus mykiss). 40
Figure I.7: Transformations chimiques de l'oxygène moléculaire dans un systeme biologique 41
Figure I.8: Schéma des défenses anti-oxydantes enzymatiques 43
Figure I.9: Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir de l'acide arachidonique. 54
Figure I.10 : Formation de marqueurs pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique 56
Figure II.1: Xenopus laevis : couple d'adultes et œufs 71
Figure II.2 : Illustration de la métamorphose des larves de xénope jusqu'à l'obtention du stade juvénile en vue dorsale 71
Figure II.3 : Photographie en vue dorsale de larves de xénope au stade 50, 54 et en début de métamorphose 72
Figure II.4: Anatomie générale d'une larve de X.laevis 73
Figure II.5: Accouplement de xénopes adultes 74
Figure III.1 : Observation en MET d'échantillons de NTCMW bruts 85
Figure III.2 : Courbe étalon H_2O_2. 88
Figure III.3 : Courbe étalon BSA pour le dosage des protéines. 89
Figure III.4 : Principe de dosage de la SOD 91
Figure III.5 : Courbe étalon du malondialdéhyde 93
Figure III.6 : Les trois types d'ADN observés par le test des Comètes. 96
Figure III.7 : Calcul du profil d'intensité de la comète 97
Figure III.8 : Résultat de toxicité aiguë (mortalité) chez les larves de Xénope après 96 h d'exposition statique aux NTCMW bruts 99
Figure III.9 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant après exposition des larves de *X. laevis* à différentes concentrations de NTCMW bruts 102
Figure III. 10 : Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant après exposition des larves de *X. laevis* à des NTCMW (0,1 mg/L) bruts ou dispersés 106
Figure III.11 : Concentration du MDA chez des larves de *X. laevis* exposées à des NTCMW bruts 107
Figure IV.1. : Boitier et sondes ODEON Ponsel 128

Figure IV.2 : Protocole de mesure des différents paramètres sanguins sur des larves de *X. laevis* 129
Figure IV.3 : Les phases de la PCR quantitative 131
Figure IV.4 : Représentation schématique de la puce C_1 ™ Single-Cell et des emplacements de pré-remplissage 137
Figure IV.5 : Représentation schématique de la structure des chambres réactionnelles d'une puce C_1 ™ 138
Figure IV.6 : Représentation schématique des différentes chambres réactionnelles de la puce C1 et des étapes successives permettant l'obtention de l'ADNc. 139
Figure IV.7 : Observations macroscopiques de la tête et de l'intestin de larves de xénope . 146
Figure IV.8 : Observations macroscopiques de la zone branchiale de larves de xénope 147
Figure IV.9 : Variations des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition contenant des NTCMW bruts 150
Figure IV.10. Expression relative de gènes de réponse à l'apoptose, au stress oxydant, aux dommages à l'ADN, à la réponse inflammatoire et à l'hypoxie dans les cellules érythrocytaires de larves de *X. laevis* 154
Figure V.1 : Observations macroscopiques de la tête de larves au stade 54 exposées au NTCMW bruts pendant 24 h. 173
Figure V.2 : Shéma syntéthique du potentiel mécanisme de toxicité des NTCMW bruts chez les larves *X. laevis* 187

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Exemples d'applications de NTC existants actuellement et à venir dans un futur plus au moins proche 27
Tableau II.1: Composition de l'eau reconstituée. 76
Tableau III.1 : Caractérisation des nanotubes de carbone multi-parois Graphistrength®. 86
Tableau III.2 : Concentration de peroxyde d'hydrogène chez des larves de *Xenopus laevis* exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts 100
Tableau III.3 : Concentration de peroxyde d'hydrogène chez des larves de *Xenopus laevis* exposées à des NTCMW bruts ou dispersés par la MO. 104
Tableau III.4. : Résultats des essais Comètes sur les érythrocytes des larves de *X. laevis* exposées aux NTCMW bruts. 109
Tableau IV.1 : Composition de la solution ARN standard 133
Tableau IV.2 : Liste des amorces spécifiques des 25 gènes de *X. laevis* testés 134
Tableau IV.3 : Composition du Pre-Mix Sample pour puce BioMark 142
Tableau IV.4: Concentration en métaux dans l'eau reconstituée après 24 h. 145
Tableau IV.5 : Différents paramètres sanguins chez les larves de de *X. laevis* exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts. 149
Tableau V.1 : Variation de l'ensemble des paramètres impliqués dans l'état d'hypoxie 175

Liste des abréviations

$^1O_2$: oxygène singulet

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondriale

ADNn : acide désoxyribonucléique nucléaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

C60 : fullerènes

CAT : catalase

CCVD : dépôt chimique catalytique en phase vapeur (*catalytic chemical vapor deposition*)

CE_{50} : Concentration efficace médiane

CI_{50} : concentration inhibitrice médiane

CL_{50} : concentration létale médiane

COX : cyclo-oxygénase

DEC : densité d'énergie cinétique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ER : Eau reconstituée

ERO : espèces réactives de l'oxygène

GA : gomme arabique

GPx : Glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH ; glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé ou glutathion di-sulfite

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

HCG : Hormone Chorionique gonadotrope

HNE : hydroxynonénal

LOEC : la plus petite concentration induisant un effet observé (Lowest Observed Effect Concentration)

LOX : lipoxygénases

LT : leucotriènes

MDA : malondialdéhyde

MET : microscopie électronique à transmission

MMS : methyl methanesulfonate

MO : matière organique

MS222 : Ethyl-3 benzoate méthanesulfonate

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

NM : nanomatériaux

$NO^{\cdot}$: monoxyde d'azote

NP : nanoparticule

NTC : Nanotubes de carbone

NTCDW ou DWCNT : nanotube(s) de carbone bi-paroi (double-walled carbon nanotube)

NTCMW ou MWCNT: nanotube(s) de carbone multi-paroi (multi-walled carbon nanotube)

NTCSW ou SWCNT : nanotube(s) de carbone mono-paroi (Single-Walled Carbon Nanotube)

$O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde

$OH^{\cdot}$: radical hydroxyle

ONOOH : acide peroxynitreux

PF : poids frais

PG : prostaglandines

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

PMSG : gonadotrophine sérique équine (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin)

*p*O2 : pression partielle en dioxyde de carbone

*p*O2 : pression partielle en oxygène

Prx : peroxyrédoxine

qPCR : réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction) qauntitative

$ROO^{\cdot}$: radical peroxyle

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

rpm : rotation par minute

RT : rétro-transcription

SOD : superoxyde dismutase

TBA : acide thio-barbituriuqe

TCA : acide trichloracétique

TMB : tetramethylbenzidine

WST : sel de tétrazolium

Introduction générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire EcoLab (laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement). Créé en 2007, ce laboratoire est issu de la formation d'une unité mixte de recherche (UMR 5245) du CNRS (Centre National de Recherche Scientifique), de l'UPS (Université Paul Sabatier) et de l'INPT (Institut National Polytechnique de Toulouse). Sa vocation est l'étude combinée du fonctionnement des communautés, des écosystèmes et de leurs interrelations. Le laboratoire de recherche EcoLab est composé de 5 Equipes dont l'équipe « Écotoxicologie et Santé des Écosystèmes » (ECSECO). Cette dernière développe depuis quelques années des protocoles d'évaluation de l'écotoxicité de contaminants environnementaux chez des organismes aquatiques modèles tels que l'amphibien *Xenopus laevis*. Le test micronoyau sur amphibien (évaluation de la génotoxicité) a d'ailleurs fait l'objet d'une normalisation au niveau national (AFNOR) et international (ISO, 2006) (Mouchet et al., 2011).

Par ailleurs, des travaux sont réalisés depuis 2007, en partenariat avec l'industriel Arkema-France. Cette collaboration offre entre autres, la possibilité d'étudier des nanoparticules industrielles puisque la société Arkema dispose d'un brevet et d'un pilote de production de nanotubes de carbone multi-parois (NTCMW) à l'échelle préindustrielle, sur le site de Lacq (Pyrénées Atlantiques). Cette collaboration a abouti à la création en 2010, du laboratoire commun Nautile (Nanotubes et Ecotoxicologie), premier laboratoire commun de recherche mixte public/privé dédié à l'étude de l'impact éco-toxicologique des nanotubes de carbone dans le compartiment aquatique (eau douce).

Dans ce contexte des travaux préliminaires ont été réalisés par Mouchet *et al*., (Mouchet et al., 2005, 2007, 2008, 2010) sur des larves de xénope exposées à différentes concentrations de NTCMW sur une durée de 12 jours. Les résultats obtenus ont mis en évidence une inhibition de croissance malgré l'absence d'effets génotoxiques (essai des micronoyaux). Ils n'ont

toutefois pas permis de montrer le passage des nanoparticules carbonées à travers la barrière intestinale chez le xénope (spectrométrie RAMAN).

Ceci nous a conduits à suspecter un probable effet indirect des NTCMW sur les larves de xénope. Afin de répondre à cette problématique, les travaux engagés sur l'évaluation de la toxicité potentielle des nanotubes de carbone multi-parois chez les larves de xénope ont été poursuivis. L'objectif principal de ces travaux a été de tenter de mettre la lumière sur les différents mécanismes mis en place par les larves de xénope en réponse à une exposition à court-terme (24 h maximum) à des nanotubes de carbone multi-parois. Deux scénarios d'exposition ont été utilisés. Le premier prend en compte l'agglomération et la sédimentation des nanotubes de carbone (NTC) bruts dans l'eau. Le second tient compte de la présence, dans le milieu aquatique, de composés naturels tels que la matière organique, pouvant entrainer la persistance de nanotubes, plus ou moins individualisés, dans la colonne d'eau, et la modulation des réponses biologiques.

Un interêt particulier a été accordé à la capacité des NTC à induire un stress oxydant chez les organismes qui y sont exposés et qui a été largement décrit dans la littérature (Ali et al., 2014; Folkmann et al., 2009; Pacurari et al., 2008; Shvedova et al., 2008, 2014). Ces nanoparticules ont en effet été identifiées comme étant à l'origine d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Saria et al., 2014). Cependant, les mécanismes de génération des ERO par les NTC et l'importance relative de ce phénomène dans la toxicité ont été à ce jour très peu étudiés.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier les effets d'une contamination aux NTCMW sur des larves de xénope et les relations qui existent entre le stress oxydant généré au cours des expositions et les effets observés. Du fait de la quasi inexistence de littérature concernant la réponse précoce d'organismes aquatiques à une exposition aux NTCMW, nous avons attaché une attention particulière à la détermination des effets de ces nanoparticules sur

des temps courts d'exposition en considérant plus particulièrement (i) l'induction d'une toxicité aiguë, (ii) l'évolution dans le temps de marqueurs du stress oxydant (production d'ERO, activités des enzymes anti-oxydantes, peroxydation lipidique et dommages à l'ADN) et (iii) l'identification de sources potentielles d'induction d'ERO. Le choix de l'organisme d'étude s'est naturellement porté sur l'amphibien *X. laevis*, une espèce de plus en plus utilisée en éco-toxicologie et pour laquelle le laboratoire possède une bonne expertise. De plus cette espèce a été choisie pour sa facilité d'élevage et de reproduction, l'abondance des larves obtenues à partir d'une seule ponte mais surtout pour sa sensibilité reconnue aux changements environnementaux (Gauthier, 1996).

Parallèlement à ces études, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes impliqués dans la réponse à une exposition aux NTCMW par une technique de RT-PCR quantitative innovante basée sur des mesures réalisées à l'échelle de cellules uniques.

Ce manuscrit divisé en quatre chapitres, débute par une introduction bibliographique qui présente les différentes structures et morphologies des nanotubes de carbone, les principales méthodes de synthèse et les propriétés mécaniques, électriques et chimiques hors du commun de ces nanoparticules. L'ensemble de ces informations permettra au lecteur de mieux comprendre pourquoi ces molécules font l'objet de travaux de recherche, qui rayonnent dans des domaines très variés, entrainant le développement exponentiel de leur production et leur application dans différents domaines, aboutissant à leur mise sur le marché.

La deuxième partie de ce chapitre se place dans un contexte socio-économique et aborde la dissémination et le devenir des nanotubes de carbone dans l'environnement et plus particulièrement dans le compartiment aquatique. Elle décrit un état de l'art des connaissances principales acquises en termes d'évaluation de l'écotoxicité des nanotubes de carbone sur différents organismes (microorganismes, végétaux, organismes terrestres et aquatiques). Une

attention particulière a toutefois été accordée aux organismes aquatiques, au sein desquels notre modèle d'étude, l'amphibien *Xenopus laevis* a été placé.

La troisième partie du « chapitre I » est consacrée aux connaissances actuelles sur les mécanismes de toxicité des nanotubes de carbone et notamment à leur aptitude d'adsorption et de translocation à travers différents organites cellulaires et compartiments de l'organisme. Nous évoquerons également la capacité des NTC à induire un stress oxydant chez les organismes qui y sont exposés ainsi que l'ensemble des mécanismes enzymatiques qui sont impliqués dans la réponse à ce déséquilibre de la balance d'oxydo-réduction (les superoxydes dismutases, la glutathion réductase et peroxydase, la catalase et les peroxyrédoxines). Nous finirons par la description de quelques travaux de la littérature consacrés à l'étude des dégâts oxydatifs cellulaires des nanotubes de carbone. Une attention particulière a été accordée aux dommages à l'ADN, à la peroxydation des lipides et à la réponse inflammatoire.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente le modèle biologique utilisé dans le cadre de nos expérimentations avec une description des étapes de développement, du mode d'élevage des adultes reproducteurs et des larves. Nous avons également décrit dans ce chapitre la préparation des milieux utilisés pour l'exposition des larves de xénope aux nanotubes de carbone multi-parois, sous leur forme brute ou dispersée. Nous finirons par un paragraphe sur la gestion du matériel de laboratoire contaminé par les nanotubes de carbone.

Le chapitre III, occupe une place importante dans ce mémoire. En effet, en plus d'inclure le mode de production et la caractérisation des NTCMW utilisés, ce chapitre englobe l'ensemble des protocoles mis au point pour permettre l'évaluation des mécanismes de toxicité des NTC fournis par la société Arkema. Les résultats de l'évaluation de la toxicité aigüe des NTCMW sur des larves de xénope exposées à différentes concentrations (de 0 à 500 mg/L) sur des durée de 24, 48, 72 et 96 h y sont représentés. Ce chapitre inclut également l'ensemble des résultats concernant l'évaluation de la capacité des NTCMW bruts ou dispersés à induire un

stress oxydant chez les larves de *X. laevis*. Ainsi, les résultats de mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène) et de l'induction d'enzymes de réponse au stress oxydant chez les larves exposées aux NTC sont inclus dans cette partie.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux conséquences de l'induction d'un stress oxydant chez les larves de xénope avec une attention particulière portée à la peroxydation des lipides (dosage du malondialdéhyde) et à l'induction des dommages à l'ADN (test des Comètes). La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit n'est pas d'une importance moindre puisque l'ensemble des protocoles et des résultats de l'étude des voies potentiellement impliqués dans l'induction d'un stress oxydant chez les larves de xénope exposées aux NTCMW bruts y sont présentés. Ainsi, tous les protocoles utilisés pour l'identification des causes possibles d'un déséquilibre de la balance d'oxydoréduction chez les larves de xénope exposées aux NTCMW bruts ont été détaillés. Les résultats de ce chapitre peuvent être divisés en deux parties importantes. Une première relative à l'implication des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition dans l'induction d'un stress oxydant, à savoir, le relargage des métaux de synthèse, le pourcentage d'oxygène et le pH de l'eau. La seconde partie est essentiellement focalisée sur la mise en évidence d'une probable pénétration des NTC dans différents organes (branchies et intestin) par des observations macro- et microscopiques. Un éventuel colmatage des branchies est évalué par la mesure des paramètres sanguins (pression en oxygène et en gaz carbonique dans le sang, pH et concentration en hémoglobine), mais aussi par le dosage de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à une hypoxie (*hif-1α*, *vegf*, *epo* et *hba1*).

Enfin, la dernière partie de ce chapitre a été consacrée à la présentation des essais de RT-PCR quantitative, réalisés dans le but de confirmer une partie des résultats obtenus dans les

chapitres III mais aussi de mettre la lumière sur d'autres voies connues pour être des conséquences directes d'un stress oxydant, comme l'apoptose et la réponse inflammatoire.

Ce manuscrit de thèse sera clôturé par une discussion générale qui regroupera l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail et leur comparaison avec ceux de la littérature. Cette dernière partie permettra au lecteur de mieux comprendre les mécanismes mis en place par les larves de *X. laevis* en réponse à une exposition aux NTCMW de la société Arkema.

Références bibliographiques

Ali, D., Ahmed, M., Alarifi, S., Ali, H., **2014**. Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail Lymnaea luteola L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environ Toxicol*.

Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., Møller, P., **2009**. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 117, 703–708.

Gauthier, L., **1996**. The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution. *Alytes*. 14, 53–84.

Mouchet, F., Gauthier, L, Mailhes, C., Jourdain, M.J., Ferrier, V., Devaux, A., **2005**. Biomonitoring of the genotoxic potential of draining water from dredged sediments, using the comet and micronucleus tests on amphibian (Xenopus laevis) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). *J. Toxicol Environ Health Part A*. 68, 811–832.

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., **2007**. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology*. 1, 149–156.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2008**. Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. *Aquat Toxicol*. 87, 127–137.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK*. 5, 963–974.

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2011**. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environ Toxicol*. 26, 136–145.

Pacurari, M., Yin, X.J., Zhao, J., Ding, M., Leonard, S.S., Schwegler-Berry, D., Ducatman, B.S., Sbarra, D., Hoover, M.D., Castranova, V., Vallyathan, V., **2008**. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect*. 116, 1211–1217.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Shvedova, A.A., Kisin, E., Murray, A.R., Johnson, V.J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P.A., Kagan, V.E., **2008**. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol*. Physiol. 295, 552–565.

Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Mouithys-Mickalad, A., Stadler, K., Mason, R.P., Kadiiska, M., **2014**. ESR evidence for in vivo formation of free radicals in tissue of mice exposed to single-walled carbon nanotubes. *Free Radical Bio Med*. 73, 154–165.

Chapitre I : introduction bibliographique

I. Généralités sur les nanotubes de carbone

I.1. Définition des nanomatériaux

La commission européenne définit un nanomatériau (NM) comme « un matériau formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm » (Janez, 2011).

Une « particule » correspond à « un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis ». Les particules peuvent êtres soudées ou fusionnées (liaisons fortes) pour former une autre particule dénommée « agrégat ». Enfin, un amas friable de particules ou d'agrégats dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels est identifié comme étant un « agglomérat ». Ces particules sont liées par des forces d'intensité plus faibles (*e.g.* Van der Waals, forces électrostatiques) (Oberdörster et al., 2005).

I.2. Structure et morphologie des nanotubes de carbone

Depuis leur découverte par Iijima en 1991 (Iijima, 1991), les nanotubes de carbone (NTC) suscitent un grand intérêt scientifique du fait de leurs propriétés exceptionnelles.

Le diamètre moyen des NTC varie du nanomètre (NTC mono-paroi) à quelques dizaines de nanomètres (NTC multi-parois) et leur longueur de quelques microns à quelques centaines de microns (pouvant atteindre le centimètre dans certains cas (Huang et al., 2006; Zheng et al., 2004).

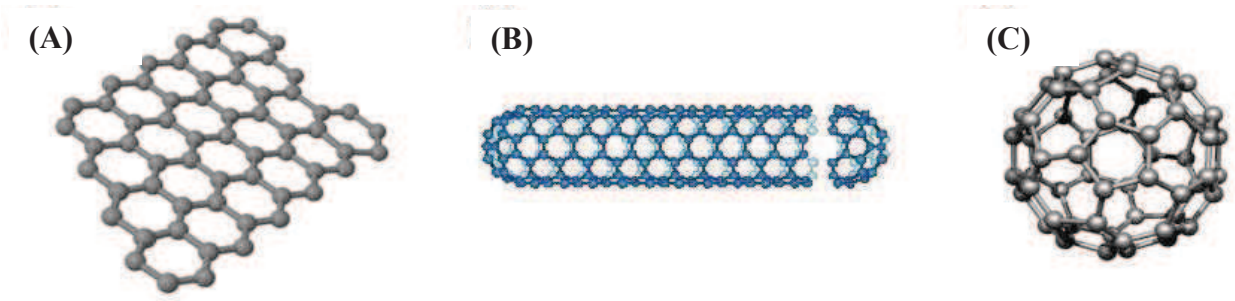

Figure I.1 *: Représentation d'un feuillet graphène (A); d'un NTC mono-paroi fermé par deux demi-fullerènes (B); du fullerène C60 (C).*

Il est possible de décrire simplement la structure d'un NTC comme un feuillet de graphène (**figure I.1.A**) enroulé sur lui-même, formant un cylindre creux (**figure I.1.B**) fermé à ses extrémités par des demi-fullerènes ou des structures plus complexes [exemple de fullerène : C60], (**figure I.1.C**).

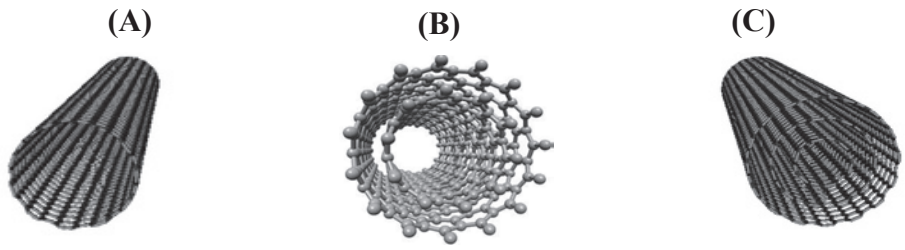

Figure I.2 *: Représentation schématique d'un nanotube de carbone mono-paroi (A) bi-paroi (B) ou multi-paroi(C).*

Selon le nombre de parois, on distingue deux types de NTC. Les NTC dits mono-paroi (NTCSW) ou SWCNT pour "*single-walled carbon nanotubes*" (**figure I.2.A**), sont constitués d'un seul feuillet de graphène enroulé sur lui-même, dont le diamètre varie habituellement

entre 1 et 3 nm. Bethune *et al*, (Bethune et al., 1993) ainsi que Iijima et Ichihashi (Iijima and Ichihashi, 1993) ont été les premiers à rapporter leur synthèse.

Les NTC dits multi-parois (NTCMW) ou MWCNT pour "*multi-walled carbon nanotubes*" (**figure I.2.B**), sont constitués de plusieurs feuillets (2 à 50) de graphène arrangés en cylindres concentriques. Les NTC multi-parois regroupent également les nanotubes biparois (NTCDW) ou encore appelés DWCNT (*double-walled carbon nanotubes*). Ces derniers forment un groupe particulier car, comme leur nom l'indique, ils sont constitués de seulement deux parois concentriques et sont donc à l'interface entre les SWCNT et les MWCNT.

I.3. Propriétés des nanotubes de carbone

Les NTC présentent généralement une grande surface spécifique, pouvant atteindre théoriquement 1310 m^2/g pour des NTCSW fermées et isolés. En pratique, les NTC sont souvent regroupés en faisceaux et contaminés par des sous-produits de synthèse, conduisant à des valeurs de surfaces spécifiques plus modestes. L'augmentation du nombre de parois et à un moindre degré celle du diamètre, conduit aussi à une diminution de la surface spécifique des NTC (**Figue I.3**) (Peigney et al., 2001). De par leur structure, leur taille et leur composition, les nanotubes de carbone possèdent des propriétés exceptionnelles.

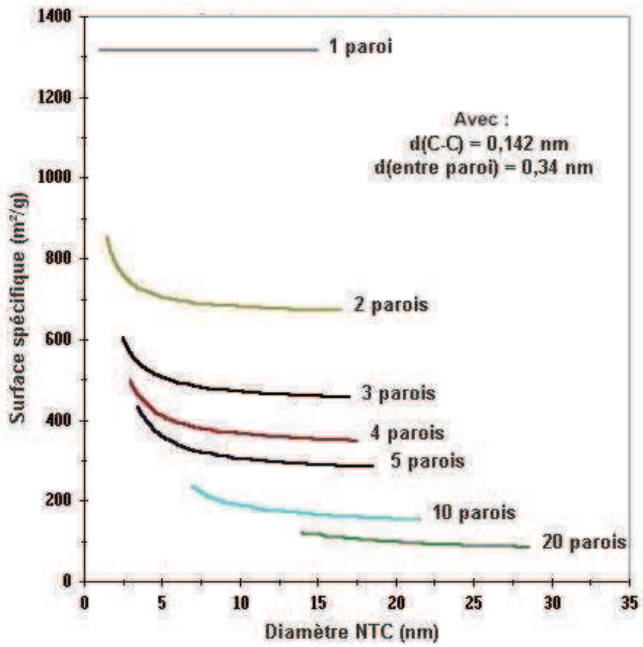

Figure I.3 *: Evolution de la surface spécifique des NTC en fonction du nombre de parois et du diamètre (Peigney et al., 2001).*

I.3.1. Propriétés mécaniques

Les nanotubes de carbone possèdent de nombreuses propriétés mécaniques. Parmi ces dernières nous pouvons citer leur rigidité que l'on peut comparer à celle de l'acier tout en restant extrêmement légers. Une autre propriété qui fait l'exception de ces matériaux est leur dureté et leur conductivité thermique comparables voire supérieures, dans le cas des NTCSW, à celle du feuillet de graphène ou du diamant de haute pureté (Savas, 2000). Les NTC peuvent également être très flexibles (environ 200 fois plus que l'acier pour un poids 6 fois inferieur) et ceci réversiblement, sans détérioration, jusqu'à un angle d'environ 110° pour des NTCSW (Iijima et al., 1996).

I.3.2. Propriétés électriques

Du fait de la faible diffusion des électrons et de leur grande stabilité à haute température (jusqu'à 250°C sous air et 1500°C sous vide), les NTC peuvent supporter des densités de

courant extrêmement élevées (jusqu'à 3 ordres de grandeur plus importants que celle du cuivre) (Yao et al., 2000). De plus, en fonction de leur géométrie (diamètre du tube et l'angle d'enroulement du feuillet de graphène), les NTC ont la particularité, tout à fait exceptionnelle, de pouvoir être semi-conducteurs ou métalliques (Miaudet, 2007). Par ailleurs, les nanotubes de carbone possèdent une grande mobilité des électrons sous l'effet d'un champ électrique : 100 000 cm^2. V^{-1}. s^{-1} à 300 K. Il est également important de noter que ces nanoparticules présentent le grand avantage d'être supraconducteurs à basse température.

I.3.3. Propriétés chimiques

Les nanotubes sont des structures creuses, que l'on peut remplir avec d'autres composés chimiques, ce qui en fait des récipients clos à l'échelle nanométrique, appelés « nanofils ».
Les nanotubes de carbone sont relativement peu réactifs et une modification chimique de leur surface fait souvent appel à des espèces fortement réactives (*eg*. oxydants forts, réducteurs forts, espèces). C'est pourquoi une chimie de greffage de nanotubes basée sur des interactions non covalentes s'est fortement développée ces dernières années (adsorption de tensioactifs, enroulement de polymères, d'ADN, adsorption de pyrènes, *etc.*) (Hirsch, 2002).

I.3.4. Propriétés optiques

Le matériau le plus noir jamais conçu par l'homme est un tapis de nanotubes disposés verticalement, réalisé par des chercheurs de l'Université Rice autour du professeur Pulickel Ajayan (Cao et al., 2005); avec un indice de réflexion de 0,045 %. Ce matériau est 30 fois plus sombre que le carbone, ce qui lui permet d'absorber 99,95 % de la lumière qu'il reçoit. Cette capacité d'absorption est trois fois supérieure à celle de l'alliage nickel-phosphore qui était le matériau réputé le plus sombre.

Les propriétés optiques singulières des NTC ont été mises au service d'un système d'émission de lumière infrarouge par des nanotubes de carbone semi-conducteurs placés dans une géométrie de transistor (Barone et al., 2005).

Il est important de noter que, les propriétés exceptionnelles des NTC ont tendance à se dégrader lorsque le nombre de parois augmente, pour tendre progressivement vers celles du graphite.

I.4. Synthèse des nanotubes de carbone

Les NTC peuvent être synthétisés selon trois méthodes principales : l'arc électrique, l'ablation laser et le dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD). Ces voies de synthèse ont en commun la nécessité de disposer d'une source de carbone, d'énergie apportée sous forme de chaleur et éventuellement de pression et d'un catalyseur. Il existe également d'autres méthodes plus particulières (*e.g.* combustion d'hydrocarbures, ablation solaire, synthèse électrochimique).

I.4.1. Méthode de synthèse par arc électrique

L'arc électrique est la méthode historique pour la synthèse des NTC. Cette méthode était initialement une voie de synthèse des fullerènes, elle a été modifiée par la suite pour produire des NTC (Iijima, 1991, Ebbesen and Ajayan, 1992). La technique consiste en la décharge d'un arc électrique entre deux électrodes de graphite. Dans le cas où les électrodes sont en graphite pur, des NTCMW sont préparés (Ebbesen et al., 1993). Il est possible d'utiliser une anode en graphite contenant un métal, jouant le rôle de catalyseur et d'obtenir ainsi des NTCSW (Iijima and Ichihashi, 1993). Le catalyseur le plus employé est à base de nickel (Ni) et de yttrium (Y) (Journet et al., 1997). Les échantillons de NTC obtenus par cette voie sont contaminés par des nanoparticules métalliques, des fullerènes, des particules de

graphite et du carbone amorphe. Ils contiennent généralement au mieux 30% de NTC. Pour éliminer ces contaminants, des purifications poussées sont nécessaires mais elles endommagent les NTC et les rendements obtenus sont finalement relativement faibles.

I.4.2. Méthode de synthèse par ablation laser

L'ablation laser constitue une autre voie de synthèse des NTC par vaporisation d'une cible de graphite par un faisceau laser. Les NTCMW sont synthétises à partir d'une cible en graphite pur alors que les NTCSW peuvent être obtenus à partir d'une cible en graphite contenant également des métaux (par exemple : Co/Ni, Co, Ni, Co/Pt, Ni/Pt, Co/Cu). Le rendement et la qualité des échantillons sont meilleurs que dans le cas de l'arc électrique (Guo et al., 1995, Thess et al., 1996). Cette méthode présente cependant deux inconvénients majeurs : son coût et la difficulté de contrôle des paramètres expérimentaux.

I.4.3. Méthode de synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD)

Cette technique vise à décomposer un flux gazeux contenant une source de carbone (*e.g.* hydrocarbure ou monoxyde de carbone) sur des nanoparticules catalytiques. Ces derniers peuvent être obtenues par décomposition d'un précurseur organométallique (Schneider et al., 2000), par réduction d'un précurseur imprégné sur un support (Jason H. Hafner, 1998) ou par réduction sélective d'une solution solide (Govindaraj et al., 1999; Peigney et al., 1997). De nombreux paramètres (température, durée de traitement, composition du flux gazeux, débit des gaz, nature et composition du catalyseur…) jouent sur la nature des espèces carbonées produites. Les NTC ont d'abord été synthétisés par décomposition de l'acétylène (Hernadi et al., 1996, Yacaman et al., 1993). D'autres sources de carbone sont également utilisées pour synthétiser des NTC comme le méthane (CH_4) (Peigney et al., 1997), le monoxyde de carbone (CO) (Dai et al., 1996), le benzène (C_6H_6) (Díaz et al., 1998) ou l'éthanol (C_2H_5OH) (Cele

and Coville, 2009). La CCVD se distingue des deux autres techniques (dites à "haute température") par ses nombreux avantages, notamment un meilleur contrôle des conditions opératoires, sa facilité de mise en œuvre, son faible coût et la possibilité de travailler facilement à grande échelle. C'est la technique principale pour la synthèse industrielle de NTC.

Lors de la synthèse des NTC, le principe de croissance du nanotube repose sur la décomposition de la source carbonée à la surface des particules catalytiques. Le carbone ainsi produit diffuse à la surface et/ou à l'intérieur des nanoparticules (NP) et finit par précipiter une fois les particules saturées en carbone (*i.e.* atteinte de la limite de solubilité) (Grüneis et al., 2006). Cette condensation conduit à la formation d'une calotte de graphène, qui vient coiffer le dessus des particules. Le carbone continuant à diffuser à l'intérieur et/ou à la surface des particules, ce chapeau carboné est expulsé de la particule en même temps que la paroi cylindrique d'un NTCSW se forme et croît. Un ou plusieurs chapeaux peuvent également se former sous le premier avant qu'il soit expulsé. Il y aura dans ce cas croissance de NTCMW sur le substrat.

I.5. Production et applications des nanotubes de carbone

I.5.1. La production mondiale des nanotubes de carbone

A ce jour, nous pouvons répertorier une centaine de groupes produisant des NTC, mais leur nombre pourrait être supérieur à 200 dans les cinq prochaines années (Patel, 2011). On recense également environ 1000 sociétés et institutions activement engagées dans la recherche et le développement de NTC (Patel, 2011).

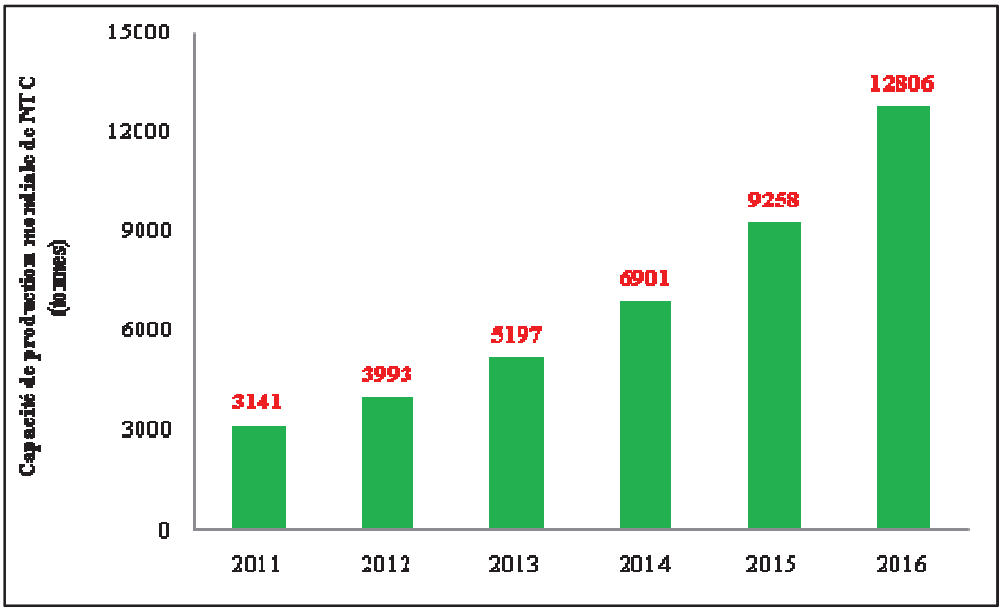

Figure I.4 *: Estimation de l'évolution de la capacité de production mondiale de NTC (Patel, 2011).*

Le marché mondial des NTC est dominé par quelques fournisseurs opérant dans de multiples secteurs d'activité et localisés principalement en Asie (44% en 2010), aux États-Unis (29% en 2010) et en Europe (24%). La capacité de production mondiale a considérablement augmenté ces cinq dernières années, franchissant les 2500 tonnes en 2010 et pouvant atteindre 13000 tonnes en 2016 (**figure I.4**) (V. Patel, 2011).

La plupart des compagnies produisant les NTC à l'échelle industrielle ont focalisé la production et le développement de leur équipement sur la synthèse par CCVD (83% de la production mondiale en 2010) et particulièrement celle des NTCMW. C'est le cas de Bayer Material Science ou Nanocyl, mais également d'Arkema-France qui a développé la production de NTCMW Graphistrength® en mettant au point un pilote (production de 10

tonnes/an) en Février 2006, puis une unité industrielle dont la capacité de production atteint 400 tonnes/an (Bordere et al., 2011).

La société de conseil D&Consultants, mandatée par la Direction Générale de la Compétitivité de l'Industrie et des Services (DGCIS), a mené une étude auprès des entreprises françaises identifiées comme possédant une activité dans les NM (D&Consultants, 2012). Ainsi en 2010, 11% des entreprises productrices de NM recensées se positionnaient sur la production de nano-fibres et de nanotubes de carbone, ce qui représente plusieurs dizaines de tonnes produites par an pour un budget d'environ 100 M€.

I.5.2. Les domaines d'application des nanotubes de carbone

Les nanotechnologies apparaissent comme les technologies émergentes de ce siècle et pourraient être à l'origine d'une véritable révolution industrielle. Les NTC se démarquent des différentes NP du fait de leur affiliation structurale avec le graphite, ainsi que par leur forme tubulaire et leur diamètre nanométrique, ce qui leur permet de combiner des propriétés mécaniques, électriques, thermiques, magnétiques et optiques (**voir paragraphe I.3**). Les domaines d'application touchent principalement les industries plastiques et composites (69% du marché mondial en 2010 (V. Patel, 2011)) qui exploitent leurs propriétés exceptionnelles de résistance à la déformation, de flexibilité et de dureté mais aussi leur conductivité thermique hors norme (**voir paragraphe I.3**).

Les secteurs électriques et électroniques occupent la seconde place, avec 10% du marché mondial des NTC en 2010 (V. Patel, 2011). Les propriétés de comportement métallique et/ou semi-conducteur des NTC (NTCSW et NTCMW) en font de parfaits candidats pour l'élaboration de composants électroniques (Seichepine et al., 2012; Tinguely, 2012), tels que les diodes et les transistors, dont les performances seraient supérieures à celles du silicium.

Le secteur de l'énergie représentait, quant à lui, 8% du marché mondial des NTC en 2010 (Patel, 2011). Ces nanoparticules seraient en effet propices au stockage de gaz et d'énergie (électrode de batteries et de super-condensateurs). Par ailleurs, des recherches sont également conduites pour l'élaboration des pales d'éoliennes, de cellules photovoltaïques, *etc*, à partir de NTC.

Les autres domaines d'applications comprennent la médecine (*e.g*. système d'administration ciblée de médicaments (Sanz et al., 2011), imagerie et ingénierie tissulaire (Béduer et al., 2012), traitement de cancers (Neves et al., 2012)), le traitement de l'eau et des sols (*e.g*. membranes de filtration, absorbants de polluants pour la bioremédiation) et plus généralement les capteurs chimiques.

Le **tableau I.1** représente les applications intégrant des NTC, parmi lesquelles figurent des produits de consommation courante déjà présents sur le marché, ainsi que les prochaines générations de produits.

Tableau I.1 : *Exemples d'applications de NTC existants actuellement (liste non exhaustive) et à venir dans un futur plus au moins proche (Morinobu et al., 2008, Patel, 2011; Woodrow Wilson International Center for Scholars)*

Présent	- Articles de sport : raquettes de tennis, battes de baseball, clubs de golf, planches de surf, cross de hockey, pièces de vélo, kayak ; - Aéronautique et Automobiles : ailes d'avion, trains d'atterrissage des hélicoptères, systèmes de transport de carburant à dissipation électrostatique ; - Electrique et Electronique : films transparents conducteurs, écrans OLED (prototypes), pointes de sondes à balayage, capteurs ; - Energie : pales d'éoliennes, électrodes de batterie ; - Médecine : équipements spécialisés (*e.g.* cathéters, membranes de filtration) ;
Futur proche (< à 5 ans)	- Electrique et Electronique : nanosystèmes électromécaniques (NEMS), électrodes de supercondensateurs, écrans à émission de champs, écrans LCD ou OLED, sources de rayons-X - Energie : électrodes de piles à combustibles, de stockage et d'hydrogène, système de régulation thermique - Capteurs biologiques - Encres d'impression, adhésifs
Futur plus lointain (> à 5 ans)	- Electrique et Electronique : câbles de transport d'électricité, conducteurs en micro-électronique, composants électroniques flexibles, transistors à effets de champs - Aéronautique et Automobile : composites - Energie : dispositifs photovoltaïques - Médecine : systèmes d'administration ciblée de médicaments

II. Ecotoxicité des nanotubes de carbone

II.1. Etat de l'art

Les NTC constituent une innovation et un enjeu économique majeurs. Ils disposent d'importantes propriétés qui rendent leurs applications nombreuses et variées. Malgré une production croissante de ces nanoparticules au cours de ces dernières années, leurs conséquences sur la santé humaine et celle de notre environnement restent à ce jour mal explorées et constituent une réelle préoccupation de nos sociétés industrialisées. La présence et l'utilisation de ces nanoparticules carbonées dans un grand nombre de produits du quotidien (**paragraphe I.5.2**) constituent un danger potentiel pour la santé de notre environnement.

En effet, la production des NTC, leur utilisation et donc leur usure *via* des processus photochimiques et mécaniques [irradiation par UV A/B et abrasion (Nowack et al., 2012)] ou encore leur traitement en tant que déchets (enfouissement, incinération, recyclage) (Gottschalk et al., 2009) favorisent leur dissémination potentielle dans tous les compartiments de l'environnement (*i.e.* eau, sol, air). Leurs voies d'entrée potentielles peuvent être liées à des sources de contaminations ponctuelles (*e.g.* usine de production, zone d'enfouissement, effluents d'eaux usées) ou diffuses (*e.g.* dégradation des produits pendant leur utilisation, ruissellement des eaux de pluie, crues, dépôts humides atmosphériques) (Wiesner et al., 2006). Ces nanoparticules peuvent ainsi rejoindre le compartiment aquatique, bien connu pour être le réceptacle principal de la majorité des polluants (Lovern et al., 2007).

II.2. Etude de l'écotoxicité des NTC sur différents organismes

Alors que les NTC ont été découverts il y a plus d'un demi-siècle, la toxicité potentielle induite par ces nanoparticules carbonées n'est évaluée que depuis une dizaine d'années. La majorité de ces travaux est toutefois portée sur l'impact toxicologique des NTC relatif à l'homme avec des études *in vitro* réalisées sur des modèles cellulaires (Muller et al., 2008,

Simon-Deckers et al., 2008, Barillet et al., 2010, Palomäki et al., 2011;) et *in vivo* menées sur des organismes modèles [*e.g*. rats (Masato Naya, 2012; Muller et al., 2012), souris (Shvedova et al., 2008)]. Cependant, encore à ce jour, peu d'études relevant réellement de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone sont disponibles. Parmi elles, la plupart concernent le fullerène (C60). Ces études mettent en évidence l'ingestion du C60 et sa toxicité associée chez plusieurs organismes modèles : crustacés d'eau douce (*Daphnia magna* et *Hyalella azteca*), copépodes marins et poissons (*Pimephales promelas*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Micropterus salmoides*) (Oberdörster, 2004, Lovern and Klaper, 2006; Oberdörster et al., 2006, Zhu et al., 2006, Lovern et al., 2007, Zhu et al., 2007b, Usenko et al., 2008).

La présente synthèse a pour objectif de réaliser un état de l'art des connaissances disponibles concernant les effets écotoxiques des NTC chez divers organismes. Une attention particulière sera accordée aux NTC multi-parois (NTCMW). D'autres types de NTC (mono-paroi -NTCSW- et bi-parois -NTCDW-) dont la réactivité de surface est semblable aux NTCMW, bien que la morphologie soit généralement significativement différente, seront aussi mentionnés succinctement afin de compléter cet état de l'art.

II.2.1. Impact des NTC sur les micro-organismes

La toxicité des NTC multi-parois et mono-parois a été testée sur différentes souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif). Les effets les plus marqués ont été observés pour les NTCSW. Ces derniers étaient en effet capables d'inactiver le plus fort pourcentage de cellules dans les cultures d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* ainsi que dans des communautés microbiennes présentes dans les fleuves et dans les effluents d'eaux usées. L'ajout de matières organiques (MO) naturelles à des concentrations élevées avait entrainé une diminution de l'adhésion des NTCSW sans pour autant réduire leur toxicité. En revanche en présence de NTCM dans le milieu, une activité

antibactérienne plus modérée a été observée (Kang et al., 2009). Des études réalisées sur le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* avec des NTCMW bruts ou fonctionnalisés, avaient mis en évidence le rôle de la fonctionnalisation des NTC. En effet les NTC modifiés par la glucosamine avaient stimulé la croissance du protozoaire avec un effet de dose. Au contraire, une fonctionnalisation des NTC par la décylamine, a abouti à une inhibition de la croissance cellulaire (Guo et al., 2008). D'autres travaux visant à évaluer l'impact des NTCSW sur le protozoaire, *Tetrahymena thermophila* (espèce importante dans le traitement des eaux usées et un bon indicateur de la qualité des effluents) avaient mis en évidence l'apparition de quatre symptômes : réduction de la mobilité, agrégation cellulaire, accumulation de la matrice extracellulaire et mort cellulaire au-delà de 7µg/mL (Ghafari et al., 2008).

Long *et al*., avaient démontré qu'une exposition de l'algue verte *Chlorella* sp. à une concentration de 100 mg/L de NTCMW pendant une durée de 96 h était à l'origine d'une inhibition de croissance (Long et al., 2012). Par ailleurs, des expérimentations menées sur la souche bactérienne *Escherichia coli*,exposée à des concentrations allant jusqu'à 8 µg/mL de NTCMW ne montraient aucun effet de toxicité (Roy et al., 2012).

II.2.2. Impact des NTC sur les végétaux

Une étude *in vitro* sur les cellules d'*Arabidopsis* T87 avait montré que des NTCMW, sous forme d'agrégats de tailles différentes, étaient à l'origine d'une toxicité qui différait en fonction du diamètre moyen des agrégats. En effet, les échantillons les moins agrégés étaient les plus toxiques avec des effets inhibiteurs sur la viabilité cellulaire, la quantité de chlorophylle et l'activité superoxyde dismutase. Les auteurs avaient émis l'hypothèse d'une probable activation des signaux d'hypersensibilité pour les faibles doses de NTCMW et de la mort cellulaire pour les concentration les plus élevées (Lin et al., 2009a).

Dans le but d'étudier la transmission générationnelle des nanoparticules, des graines de riz *Oryza sativa* avaient été prétraitées avec des NTCMW, suspendus dans une solution de MO à des concentrations allant jusqu'à 800 mg/L. Après avoir laissé les plantes, atteindre une taille de 6 cm, des observations microscopiques avaient été réalisées. Ces dernières ont mis en évidence la présence de quelques agrégats dans le système vasculaire (**figure I.5**) mais pas dans les tissus de la plante (Lin et al., 2009b). En revanche, lorsque des graines de moutarde ou de tomate ont été mises à germer en présence de NTCMW bruts ou oxydés, les NTC avaient pénétré dans les téguments des graines mais aussi dans les tissus des racines (Khodakovskaya et al., 2009; Mondal et al., 2011). Chez la tomate, les nanotubes avaient augmenté la vitesse de germination et de croissance qui étaient plus importantes sur les terrains enrichis en NTCMW par rapport au contrôle (Khodakovskaya et al., 2009)

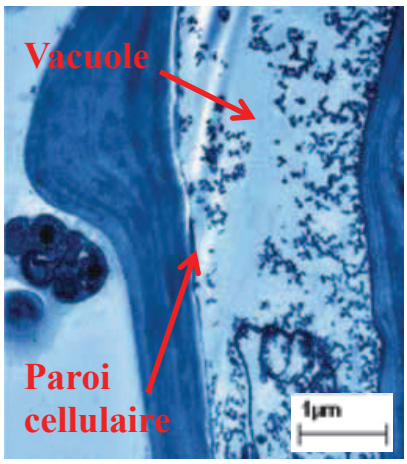

Figure I.5 *: Observation en MET d'une coupe de feuille d'Oryza sativa dont les graines ont été exposées aux NTCMW où apparait l'incorporation des particules de* C_{70} *dans la vacuole et la paroi cellulaire (Lin et al., 2009a).*

Dans une étude récente, l'absorption des NTCMW marqués au C_{14} a été quantifiée dans le blé *Triticum aestivum* et le colza *Brasica napus*. Les résultats ont montré que moins de 0,05

‰ de la concentration initiale en NTC a été absorbée par les racines et les feuilles (Larue et al., 2012).

Des travaux visant à évaluer l'impact des NTCSW bruts ou modifiés avec l'acide poly-3-aminobenzène sulfonique sur six différents types de végétaux (choux, carottes, concombre, salade, oignon et tomate) ont montré que la croissance des racines a été plus affectée en présence de NTC bruts. Ces derniers ont été capables d'inhiber l'élongation des racines chez la tomate et au contraire de la stimuler chez le concombre et l'oignon. La carotte et le choux n'ont quant à eux pas été affectés par l'exposition aux NTCSW. Les effets observés ne sont pas dûs à une internalisation des nanotubes dans les plantes, mais aucune autre hypothèse n'a été formulée (Cañas et al., 2008).

II.2.3. Impact des NTC sur les organismes terrestres

En ce qui concerne l'impact des NTC sur les invertébrés terrestres, très peu d'études existent à ce jour. Des essais de toxicité sublétale ont été réalisés sur le ver de terre *Eisenia veneta* exposé pendant 28 jours à des NTCDW (Scott-Fordsmand et al., 2008). Des concentrations allant jusqu'à 495 mg/kg d'aliment sec n'ont pas affecté la viabilité ni réduit le poids des vers. Cependant à partir de la concentration de 37 mg/kg d'aliment sec le nombre de cocons a diminué de 10% laissant penser que les NTCDW pourraient impacter la reproduction des vers de terre (Scott-Fordsmand et al., 2008).

Une étude comparative chez la mouche *Drosophila melanogaster* visant à évaluer l'effet potentiel de différentes nanoparticules carbonées (C60, noir de carbone, NTCSW et NTCMW) n'a mis en évidence aucun effet lorsque l'exposition (contamination par la nourriture) a eu lieu au stade larvaire, malgré une contamination évidente des organismes. En revanche, la contamination directe des adultes a montré que les différences d'adhérence des nanoparticules (plus marquées pour le noir de carbone et les NTCSW) pouvaient conduire à

différents effets. L'adhésion des NTC (essentiellement le noir de carbone) au corps des mouches a ainsi réduit leur comportement de toilettage, leur fonction locomotrice et induit une mortalité dans les cas extrêmes (Liu et al., 2009).

En ce qui concerne les vertébrés terrestres, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur des espèces sauvages. Par contre, de nombreux travaux ont utilisé les rongeurs comme modèle, avec une exposition aux NTC généralement par inhalation ou par injection (Aschberger et al., 2010; Van der Zande et al., 2011).

La toxicité des NTC sur la reproduction a été testée sur des souris CD-1 ayant ingérées 10 mg/kg de NTCSW dispersés à la gomme adragante et ceci au 9ème jour de gestation. Les résultats obtenus ont montré une apparition de défauts morphologiques et des anomalies du squelette sans effet sur la taille de la portée ou sur le poids de la mère ou de ses descendants. Des concentrations dix fois plus importantes (100 mg/kg) n'ont provoqué aucun effet indésirable. Les auteurs attribuent cette absence de toxicité à l'agglomération des NTC dans la solution de gavage (Philbrook et al., 2011). Dans une étude chez le rat Sprague-Dawley, l'administration orale de NTCMW du 6ème au 19ème jour de gestation à une concentration de 1000 mg/kg/ jour (ce qui fait une dose totale de 14000 mg/kg) n'a pas induit de tératogénicité, malgré un effet sur la fonction immunitaire mis en évidence par une réduction du poids du thymus maternel (Lim et al., 2011).

II.2.4. Ecotoxicité des NTC vis-à-vis des organismes aquatiques

Les activités anthropiques impactent les écosystèmes depuis plusieurs décennies, posant de réels problèmes environnementaux en ce qui concerne la biodiversité et les ressources, notamment dans le milieu aquatique, réceptacle final des polluants. Les contaminants émergeants, dont les NTC, deviennent ainsi une source de préoccupation environnementale.

II.2.4.1. Effets des NTC sur les microorganismes autotrophes et hétérotrophes aquatiques

Comme chez les bactéries, les effets toxiques des NTC chez les algues et les protozoaires unicellulaires sont principalement dus à un contact direct avec la surface. La croissance des algues peut être inhibée par l'effet d'ombrage des NTC et la formation d'agglomérats algues-NTC comme suggéré par l'étude menée par Schwab *et al*. (Schwab et al., 2011). Ces travaux ont été menés sur deux algues vertes : *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, exposées à des NTC bruts ou oxydés, suspendus dans le milieu de culture des algues par sonication. Les résultats obtenus ont montré au bout de 96 h d'exposition à une solution de NTC bien dispersée, une inhibition de croissance de *C. vulgaris* à partir d'une concentration de 0,053 mg/L contre 5,5 mg/L pour *P. subcapitata* qui semble être donc moins sensible aux NTC (Schwab et al., 2011). Dans une autre étude, l'algue marine *Dunaliella tertiolecta* a été exposée à des NTCMW pendant une durée de 96 h. Un retard de croissance a été observé à partir de 5 mg/L. Une induction du stress oxydant et une inhibition de la photosynthèse ont également été notées à 10 mg/L de NTC (Wei et al., 2010)

Pour des essais de toxicité chronique, les protozoaires ciliés *Tetrahymena thermophila* ont été exposés à des NTCSW pendant 96 h. Une première perte de mobilité et une mort cellulaire ont été observées à partir de 1,6 mg/L de NTC. La présence de nanoparticules a également inhibé la capacité bactérivore des protozoaires à partir d'une concentration de 3,6 mg/L. La présence de NTC dans le milieu aquatique peut ainsi perturber un rôle important des protozoaires : la régulation des populations bactérienne (Ghafari et al., 2008).

II.2.4.2. Effets des NTC sur les invertébrés benthiques et pélagiques

De nombreuses études abordant la toxicité aquatique des NTC en eau douce et dans les estuaires mais aussi chez les invertébrés marins vivant à la fois dans la colonne d'eau et dans le benthos sont disponibles.

Une étude récente visant à évaluer les effets chroniques des NTCMW sur une communauté benthique a été réalisée. L'impact de concentrations de NTCMW allant de 0,002 à 2 g/kg sur une durée de 15 mois a été évalué. Les effets observés après 15 mois d'exposition ont été comparés avec ceux obtenus sur une communauté exposée en simultanée à du charbon actif, dans les mêmes conditions expérimentales (Velzeboer et al., 2013). Les résultats obtenus ont montré une variation de 51,7% de la composition de la communauté après 15 mois avec une réduction de NTCMW de 9,9%. L'impact des NTCMW s'est avéré significatif dès les concentrations les plus faibles (0,002 g/kg), Concentration qui peut être considérée comme pertinente pour l'environnement. Les effets observés avec les NTCMW étaient similaires à ceux obtenus avec du charbon actif dont la concentration était 50 fois supérieur à la dose maximal de NTC (2 g/kg), suggérant une sensibilité plus importante des communautés benthiques aux NTCMW (Velzeboer et al., 2013).

L'impact des NTCSW et des NTCMW sur l'immobilisation et la mortalité a également été évalué sur *Daphnia magna*. Les résultats obtenus montrent un immobilisation des daphnies à partir de 48 h d'exposition à une concentration efficace médiane (CE_{50}) de 1,3 mg/L et une induction de la mortalité à une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de 2,4 mg/L (Zhu et al., 2009). Cette étude a également montré une toxicité aigüe des NTC testés avec un effet dose. Des observations microscopiques ont montré que les daphnies étaient capables d'ingérer les NTC et de les accumuler dans l'intestin. Les auteurs ont a également pu noter que les NTCMW avaient la capacité d'adhérer à la surface externe des organismes. L'ensemble des travaux réalisés ont permis de mettre en évidence une toxicité plus importante

avec les NTCMW (Zhu et al., 2009a). Les NTCMW remis en suspension dans de la matière organique naturelle (MON) n'ont cependant induit aucun effet de mortalité à des concentrations de 20 mg/L (Zhu et al., 2009a). En revanche une exposition prolongée sur une durée de 96 h a entrainé une induction de la une mortalité à la concentration létale médiane (CL_{50}) de 2,5 mg/L (Kim et al., 2009) et une réduction de croissance à partir de 0,25 mg/L (Edgington et al., 2010).

La reprotoxicité des NTCMW a été testée sur la puce d'eau douce *Ceriodaphnia dubia* en présence de MO sur une durée de 7 jours. Aucune mortalité n'a pu être observée à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/L. La croissance a cependant été affectée à partir de 0,2 mg/L. D'autre part, une réduction de la reproduction a été observé à partir d'une LOEC (la plus petite concentration induisant un effet observé).de 0,25 mg/L.

D'autres travaux visant à évaluer l'impact des NTC sur les organismes benthiques ont été réalisés. Le copépode *Amphiascus tenuiremis* a été exposé à des NTCSW dans le but d'évaluer les effets de toxicité aigüe et chronique. Les résultats obtenus ont montré que les NTC dispersés dans de l'eau de mer ont induit une mortalité et une réduction de la mue et de la fertilité à une LOEC de 10 mg/L (Yang et al., 2010). Une étude réalisée sur les organismes vivant dans les sédiments d'eaux douces (l'amphipode *Hyalella Azteca*, le moucheron *chironomus dilutus* et l'oligochète *Lumbriculus variegatus*) a testé la toxicité des NTC mono et multi-parois sur une durée de 14 jours à une concentration de 1 g/L. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets du prétraitement des NTC (sonication et lavage à l'acide) sur la toxicité. Les NTC lavés à l'acide et débarrassés des métaux présents à leur surface ont montré une toxicité moins importante que les NTC bruts. Les résultats concernant la sonication restent cependant moins claires et dépendent de l'organisme (Mwangi et al., 2012).

II.2.4.3. Effets des NTC sur les vertébrés pélagiques

Les études menées sur les vertébrés aquatiques visent à tester les effets de toxicité aigüe et chroniques induits par les NTC. La plupart de ces travaux sont réalisés soit sur les première étapes de vie de l'organisme ou alors une fois que son développement est terminé.

Des études ont montré que les nanotubes de carbone peuvent être à l'origine de pathologies au niveau de différents organes (branchies, foies, intestins, cerveaux) mais peuvent aussi induire des défauts de développement, une toxicité respiratoire et un stress oxydant chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) selon différentes conditions d'exposition (Du et al., 2013). Une autre étude visant à évaluer l'impact des NTC sur le développement a été réalisé sur des embryons de *D. rerio* exposés aux NTCSW sur une durée de 4 à 96 h post-fécondation. Un retard d'éclosion a été observé pour une LOEC de 120 mg/L, alors que le développement embryonnaire n'a pas été affecté à la concentration maximale de 360 mg/L (Cheng et al., 2007). Dans cette même étude des NTCDW ont entrainé un retard d'éclosion à une LOEC de 240 mg/L (Cheng et al., 2007).

La toxicité des NTC et les effets des protocoles de dispersion ont également été testés sur les premiers stades de développement de l'amphibien *Xenopus laevis*. Les larves de xénope ont été exposées à partir du stade 50 [selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956)] à différentes concentrations de NTC double et multi-parois, sur une durée de 12 jours. La toxicité aigüe ainsi que la génotoxicité des NTC ont ensuite été évaluées (Mouchet et al., 2011, 2008 ; Bourdiol et al., 2013). Les résultats obtenus avaient montré que dans le cas des NTCDW, le dispersion par la gomme arabique (GA) était plus importante dans le cas des expositions en semi-statique (changement quotidien de milieu) en comparaison avec les expositions en conditions statiques (pas de changement de milieu pendant toute la durée de l'expérience). En conditions semi-statiques, les NTCDW semblent être toutefois moins toxiques avec une mortalité mineure (entre 5 et 15%) observée à 10 mg/L

et un retard de croissance à 100 mg/L. Pour les essais en conditions statiques, un taux de mortalité important (85%) a été observé à 500 mg/L et un retard de croissance à partir de 10 mg/L. Les auteurs suggèrent que la toxicité observée pourrait être due au colmatage des branchies par les NTC avec une réduction du taux d'oxygène (Mouchet et al., 2008). Par ailleurs, des analyses en spectroscopie Raman ont permis de vérifier que les NTC ne traversaint pas la barrière intestinale (Mouchet et al., 2010).

D'autres travaux réalisés sur l'axolotl *Ambystoma mexicanum* ont montré que malgré une forte ingestion de NTC, aucun signe de toxicité, ni de génotoxicité n'a pu être observé même aux concentrations maximales testées (1000 µg/mL) (Mouchet et al., 2007).

Comme nous avons pu le voir à travers ces quelques exemples, les études menées sur l'évaluation des impacts des NTC sur différents organismes montrent dans certains cas des résultats contradictoires en termes de toxicité. Ces différences peuvent être expliquées par la grande variabilité des paramètres d'exposition, telle que la nature des organismes aquatiques, durée de l'exposition, la nature des NTC (SWCNT *vs*. MWCNT), la teneur variable en sous-produits carbonés et/ou métalliques (Kennedy et al., 2008; Stephen , 2008).

Par ailleurs, en raison de la diversité des caractéristiques des NTC (*e.g*. taille, forme, état de surface, fonctionnalisation, état de dispersion, pureté, composition chimique), pouvant contribuer à la modulation des effets biologiques observés, et de la dimension nanométrique de ces particules, l'étude de l'écotoxicité des NTC n'en est qu'à ses débuts. Les travaux menés jusqu'à ce jour, par le biais de tests *in vitro* et *in vivo*, ont permis de mettre en évidence des effets toxiques chroniques et génotoxiques de ces NTC. Toutefois, les mécanismes régissant la toxicité et l'internalisation potentielle de ces nanoparticules n'ont pas complètement été élucidées.

III. Mécanismes de toxicité des NTC

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, les travaux récents en éco-toxicologie ont permis de mettre en évidence l'impact des nanoparticules sur des organismes aquatiques modèles. L'évaluation de cette écotoxicité est cependant généralement basée sur des marqueurs simples tels que la viabilité et la croissance, qui limitent la compréhension des phénomènes d'interaction entre les nanoparticules et les organismes biologiques. Une meilleure maitrise de l'impact de ces contaminants nécessite toutefois une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action et d'interaction avec le vivant.

III.1. Adsorption, absorption et translocation des NTC

De plus en plus d'auteurs s'intéressent à la détection des NTC dans différents organes (*e.g*. paroi du tube digestif, foie, cerveau…) ou dans des vecteurs potentiels tels que le sang (Mouchet et al., 2011) dans le but de mettre en évidence des phénomènes potentiels d'adsorption et de translocation des NTC. Ainsi, Il a pu être démontré chez l'homme, que certaines nanoparticules peuvent franchir les différents mécanismes de défense et être transportées sous forme insoluble dans l'organisme (Andujar et al., 2009). Elles peuvent donc se retrouver dans le sang, franchir les membranes pulmonaires ou gastro-intestinales, se distribuer dans les différents organes et s'accumuler à certains sites spécifiques. D'autres peuvent voyager le long des nerfs olfactifs et pénétrer directement dans le cerveau ou encore franchir les barrières cellulaires et rejoindre le noyau de la cellule (Ostiguy et al., 2008). Cependant, qu'il s'agisse de technique microscopique [*e.g.* MET (Edgington et al., 2010) ou spectroscopique Raman (Mouchet et al., 2010, 2011)], aucun NTC n'a pu être détecté dans les tissus biologiques.

Les NTC peuvent également être ingérés par certains organismes aquatiques tels que les larves d'axolotl [*Ambystroma mexicanum* (Mouchet et al., 2007)] et de xénope [*Xenopus*

laevis (Mouchet et al., 2008, 2010, 2011)], les daphnies [*Ceriodaphnia dubia* (Kennedy et al., 2008; Li and Huang, 2011) et *Daphnia magna* [(Roberts et al., 2007, Zhu et al., 2009a, Edgington et al., 2010)], les copépodes [*Amphiascus tenuiremis* (Templeton et al., 2006)] et les poissons [(*Oncorhynchus mykiss* (Smith et al., 2007)]. Des observations microscopiques avaient permis de mettre en évidence la présence de NTC dans leur tube digestif mais aussi dans leurs excréments.

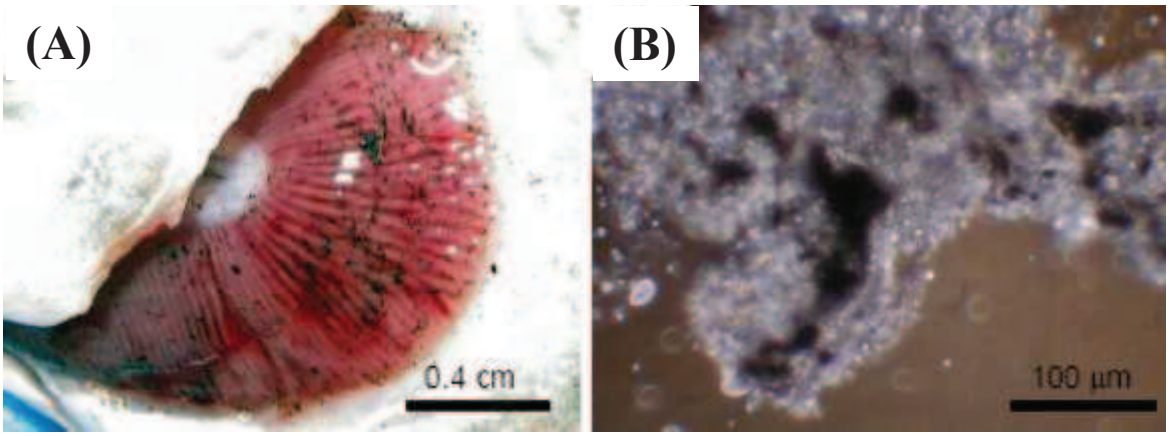

***Figure I.6**: (A) Sécrétion de mucus et adsorption de NTCSW à la surface de branchies de truites (Oncorhynchus mykiss) exposées à 0,5 mg/L de NTCSW dispersés à l'aide de détergeant (SDS). (B) agglomérats de NTCSW associés aux mucoprotéines (Smith et al., 2007).*

Par ailleurs, la présence d'amas noirs a été observée au niveau des corbeilles branchiales de larves de xénope exposées à des suspensions de NTCDW bruts ou dispersées (Mouchet et al., 2008, 2011). Ces masses noires ont également été mise en évidence au niveau des branchies de truite (*Oncorhynchus mykiss*) avec la formation d'agglomérats de NTCSW associés aux mucoprotéines (**figure I 6**) (Smith et al., 2007).

III.2. Induction du stress oxydant

III.2.1. définition

Pour définir le stress oxydant il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le NO sont peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaîne qui forment des radicaux libres beaucoup plus réactifs.

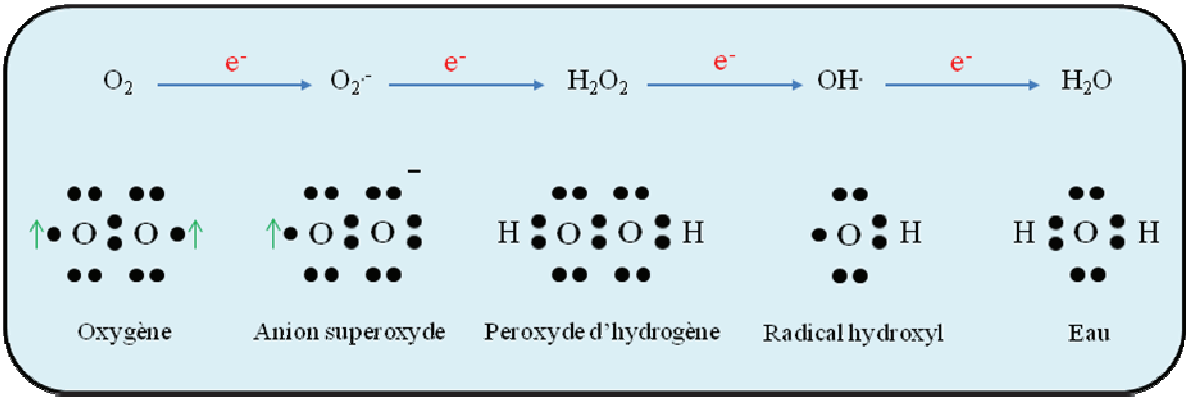

***Figure I.7**: Transformations chimiques (réductions successives) de l'oxygène moléculaire dans un systeme biologique (Shahid, 2010)*

Les radicaux peroxyles ($ROO^{\cdot}$) et hydroxyle ($OH^{\cdot}$) sont très réactifs et sont issus respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et du clivage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$). Il existe aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'H_2O_2, l'oxygène singulet ($^1O_2$) et l'acide peroxynitreux (ONOOH), qui, s'ils ne sont pas des radicaux libres au sens propre, sont très réactifs et peuvent eux aussi conduire à l'oxydation des molécules. Les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'O_2 (**figure I.7**). L'H_2O_2 produit de la dismutation de l'$O_2^{\cdot -}$, est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques.

L'O_2 est indispensable au fonctionnement cellulaire mais constitue également une source d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. C'est le paradoxe de l'oxygène. Notons toutefois que les ERO sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. Ils sont en effet impliqués dans la prolifération des cellules, la mort cellulaire programmée et agissent comme second messager (Thannickal and Fanburg, 2000, Dröge, 2002). Au sein des cellules, un équilibre (une quantité d'ERO nécessaire et suffisante au bon fonctionnement cellulaire) est maintenu grâce à un système d'élimination des ERO. Un stress oxydant peut ainsi être défini comme un déséquilibre en faveur de la production d'ERO qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydants peu avoir une origine endogène (*e.g*. dysfonctionnement de certaines sources de production ou d'élimination de ROS) ou exogène telles que des toxines ou des contaminants.

III.2.2. Stress oxydant et nanotubes de carbone

La toxicité intrinsèque des nanoparticules (y compris les nanotubes de carbone) a souvent été attribuée à leurs caractéristiques physico-chimiques uniques (*i.e*. leur petite taille, leur grande surface par unité de masse et leur forte réactivité) (Auffan et al., 2009). Cette réactivité physico-chimique est fréquemment corrélée à la capacité de ces nanoparticules à déclencher la formation de radicaux libres de manière directe ou *via* l'activation de la voie enzymatique oxydative conduisant à un stress oxydant.

Dans le cas des NTC, trois scénarios pourraient être impliqués dans l'induction du stress oxydant et la génération d'un excès de radicaux libres. En premier lieu, cette induction pourrait être due à une activité redox inhérente aux NTC ou à leur capacité à catalyser une activité redox du fait de leurs caractéristiques / propriétés de surface. De plus en considérant les NTC comme bio-persistants, ils pourraient induire une réponse inflammatoire initiant la

mobilisation et l'activation de leucocytes inflammatoires, générant ainsi un excès de radicaux libres. Enfin les NTC pourraient pénétrer dans les cellules et interagir physiquement avec elles, entrainant des dommages structurels au niveau d'organelles telles que la mitochondrie, entrainant là aussi la production en excès de radicaux libres (Petersen and Nelson, 2010). Par ailleurs l'induction du stress oxydant par les NTC pourrait être reliée à la présence de catalyseurs métalliques présents à leur surface. En effet différents travaux ont montré l'implication des particules métalliques de synthèse dans l'induction du stress oxydant (Shvedova et al., 2012).

III.2.3. Systèmes antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO chez les organismes vivants est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable à une concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables en retardant ou en empêchant leur oxydation.

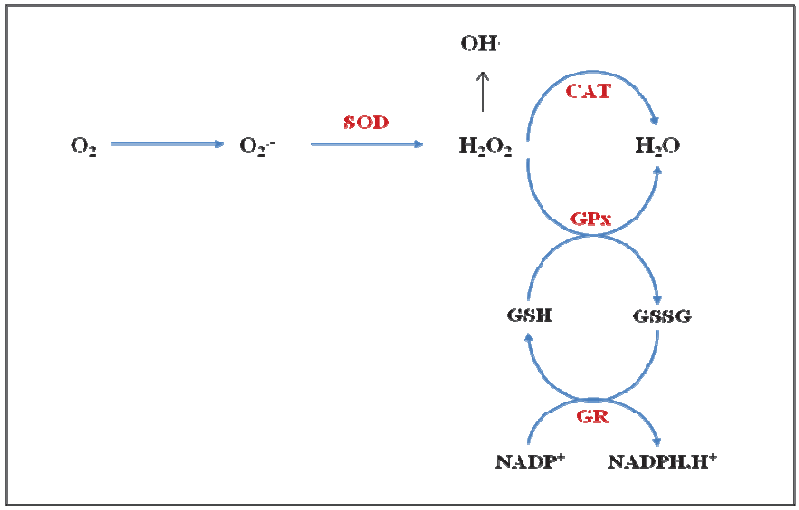

***Figure I.8**: Schéma des défenses anti-oxydantes enzymatiques (http://www.olivie.ma/fr)*

Les antioxydants cellulaires peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques (vitamine E et C). Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons essentiellement sur les antioxydants enzymatiques et plus particulièrement la superoxyde dismutase, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la catalase (**figure I.8**).

III.2.3.1. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo enzyme produite dans toutes les cellules aérobies. Elle représente la première ligne de défense contre le stress oxydatif produit par les ERO. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'$O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 (McCord and Fridovich, 1969) qui pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O2$$

La SOD est présente chez tous les organismes aérobies et représente l'une des enzymes les plus abondamment synthétisées dans les cellules.

Chez l'homme et les mammifères, il y a coexistence de trois isoformes de SOD : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (SOD-1), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD-2) et une forme extracellulaire (SOD-3).

Chez les eucaryotes il n'existe que deux types de SOD. La Cu/Zn-SOD, un homodimère de poids moléculaire de 32500 daltons, présente dans le compartiment cytosolique cellulaire et la Mn SOD, présente au niveau des mitochondries.

Chez les amphibiens, il a été démontré que cette enzyme est fortement présente dans le cerveau contrairement au foie ou on la trouve en très faible quantité (Pérez-Campo et al., 1993). A l'inverse, chez la truite *Salmo Trutta* cette enzyme est majoritairement présente au niveau du foie (Pérez-Campo et al., 1993).

L'induction de l'activité SOD en réponse à une exposition à des NTC a été mise en évidence par plusieurs études. Par exemple, Il a été rapporté par Saxena *et al*., (Saxena et al.,

2009) une forte activation de la SOD chez différentes souches de *Staphylococcus aureus* en réponse à une exposition à des NTCMW.

D'autres travaux réalisés sur le ver du fumier *Eisenia fetida*, ont mis en évidence une augmentation de l'activité SOD après une exposition à 200 mg/L de NTCMW pendant 2 jours. Cette augmentation ne devient toutefois significative qu'à partir de 400 mg/L (Zhang et al., 2014).

L'analyse transcriptomique de cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à une concentration de 6,6 µg/mL de NTCSW pendant 24 h a montré une nette augmentation de l'expression de la SOD-1 (SOD cytosolique) mais pas la SOD-2 (SOD mitochondriale) qui reste à des taux similaires à ceux du contrôle négatif (Park et al., 2014).

A l'opposé, d'autres travaux utilisant des cellules épithéliales pulmonaires de rat comme modèle d'étude ont mis en évidence une diminution de 30 et 40% du taux des enzymes SOD-1 et SOD-2 respectivement au bout de 24 h d'exposition à 2,5 µg/mL de NTCSW et ceci en comparaison avec le contrôle (Sharma et al., 2007).

L'inhibition de l'activité SOD a également été observée sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* exposées à des concentrations allant de 10 à 600 mg/L de NTCMW (Lin et al., 2009a). Les essais réalisés sur des agglomérats de NTC de tailles différentes ont mis en évidence une corrélation entre la diminution de l'activité SOD et la dimension des agglomérats de nanoparticules. En effet, après une exposition de 30 min à une concentration de 10 mg/L de NTCMW, une diminution significative de l'activité SOD a été observée pour les plus petits agglomérats (Lin et al., 2009a).

L'ensemble de ces travaux montre l'influence des nanotubes de carbone sur l'activité SOD chez les organismes vivants. L'effet des NTC semble toutefois dépendre de plusieurs paramètres (organisme étudié, concentration, état de dispersion, durée d'exposition,…).

III.2.3.2. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme à sélénium , découverte en 1957 par Gordon Mills (Mills, 1959). Cette enzyme est présente dans les liquides extra cellulaires mais aussi au niveau du cytosol et des mitochondries où elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques et lipidiques notamment de type ROOH en ROH (Taniguchi, 2012).

La GPx est l'enzyme clef du système antioxydant et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase, qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons (**figure I 8**). Le rapport GSH/GSSG est un indice de l'état d'oxydation dans la cellule.

Différents travaux visant à étudier l'effet oxydant des NTC ont pu montrer l'impact de ces derniers sur l'activité GPx. Il a ainsi été été démontré qu'une exposition de l'escargot d'eau douce *Lymnaea luteola* à des concentrations relativement faibles de NTCSW (0,3 mg/L) pendant 96 h était à l'origine d'une forte diminution de l'activité GPx (Ali et al., 2014).

Chez le poisson d'eau douce *Carassius auratus*, une exposition à des NTCMW avait également entrainé une diminution significative de l'activité GPx au bout de 3 jours. Cette inhibition n'a toutefois pu être observée à la fin de l'expérience (12 jours) (Qu et al., 2014).

D'autre travaux réalisés sur deux espèces marines (le ver *Hediste diversicolor* et la moule *Mytilus galloprovincialis*) exposées à une concentration de 1, 5 et 10 mg/L de NTCSW pendant 24 et 48 h, ont montré que la présence des NTC dans le milieu pouvait affecter le système antioxydant dans certaines conditions expérimentales. Chez le ver *H. diversicolor* des similaires de l'activité GPx ont été observées aux différentes concentrations testées. Une légère inhibition a toutefois été observée au bout de 48 h d'exposition à 10 mg/L. Chez la moule *M. galloprovincialis* l'activité GPx, a quant à elle, considérablement diminuée aux

deux concentrations les plus élevées (5 et 10 mg/L) aussi bien après 24 h que 48 h d'exposition (Moschino et al., 2014).

Au final, il semblerait que l'activité GPx soit négativement impactée par la présence de NTC, probablement due à une diminution du glutathion intracellulaire elle-même induite par un phénomène de cytolyse et/ou d'apoptose, provoquée par un forte production d'ERO (Sharma et al., 2007).

III.2.3.3. La catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase (CAT) réagit efficacement avec l'H_2O_2 pour donner de l'eau et de l'O_2.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Elle est localisée principalement dans le peroxysome mais on peut la retrouver également dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ensemble l'élimination du H_2O_2 Toutefois, la catalase semble jouer un rôle important en présence de fortes concentrations en H_2O_2, alors que la GPx prend en charge les hydroperoxydes et l'H_2O_2 même en faible quantité.

Comme pour les autres enzymes, l'implication de l'activité CAT dans la réponse à une exposition aux NTC a été mise en évidence par plusieurs travaux.

L'inhalation des NTC mono ou multi-parois par des souris pendant une durée de 7 jours a entrainé une diminution de 40 à 50% de l'activité CAT au niveau des poumons (Ravichandran et al., 2011).

Cette inhibition de l'activité CAT a également été observée chez le poisson *Carassius auratus* chez lequel une exposition de 12 jours à des NTCMW avait entrainé une diminution d'environ 19,1% de l'activité CAT en comparaison avec le témoin négatif (Qu et al., 2014).

Au contraire, l'exposition de lignées cellulaires, provenant d'adénocarcinomes coliques, à différentes concentrations de NTCSW (de 0 à 1000 µg/mL) pendant 24 h a

entrainé une production significativement importante d'ERO à partir de 100 µg/ml et qui a atteint son maximum à 1000 µg/mL. Cette forte production d'ERO a été accompagnée d'une induction maximale de l'activité CAT à 500 µg/ml de NTC qui a ensuite diminué à la plus forte concentration testée (1000 µg/ml) (Pichardo et al., 2012).

Chez la plante *Vicia faba*, une corrélation a été observée entre l'activation de catalase au niveau des feuilles et l'augmentation de la concentration de NTCMW dans le milieu de culture. Les auteurs justifient cette augmentation par une probable élimination d'H_2O_2 (Wang et al., 2014) .

En résumé, il semble que l'activation ou l'inhibition de l'activité CAT en présence de NTC serait largement tributaire des conditions expérimentales rapportées dans ces études.

III.2.3.4. La glutathion réductase (EC 1.6.4.2)

La glutathion réductase (GR), également connue sous le nom de glutathion disulfure réductase est une enzyme homodimère capable de catalyser la réduction du glutathion disulfure (GSSG) en glutathion sulfhydryle (GSH) aux dépens du NADPH qui lui-même est régénéré grâce à la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

Cette enzyme est présente dans de nombreux tissus où elle permet le maintien d'un niveau adéquat de GSH cellulaire et protège ainsi les cellules contre l'oxydation.

A ce jour, plusieurs travaux ont montré l'implication de l'activité GR dans la réponse à une exposition à des nanotubes de carbone.

Une exposition *in vitro* de cellules humaines coliques à différentes concentrations de NTCSW (0 à 1000 µg/mL) pendant une durée de 24 h a entrainé une faible inhibition de l'activité GR, observée à partir de 1000 µg/mL (Pichardo et al., 2012).

L'étude de l'impact de l'inhalation de NTC mono ou multi-parois sous forme d'aérosols par des souris, pendant une durée d'une semaine à raison de 20 min d'inhalation par jour, a permis de mettre en évidence l'impact des NTC sur différents paramètres du stress oxydant. La détection de différentes activités enzymatiques par immunoblot a permis d'observer une inhibition de l'activité GR pulmonaire après une exposition aux NTC. Parmi les paramètres mesurés, l'activité GR pulmonaire semble être inhibée après une exposition aux NTC (Ravichandran et al., 2011).

Chez le poisson d'eau douce *Cyprinus carpio*, une exposition *in vitro* du cerveau et des branchies aux fullerènes (C_{60}) a entrainé de nombreux dommages oxydatifs malgré un temps de contact relativement court. En effet, les organes ont été exposés pendant seulement 1, 2 ou 4 h à la concentration de 1 mg/L de C_{60}. La mesure de l'activité GR a indiqué une forte induction dans le cerveau après 4 h et dans les branchies après seulement 1 h (Ferreira et al., 2012).

Plus récemment, Hu *et al*., (Hu et al., 2013) se sont intéressés à l'impact des NTCMW sur le ver *Eisenia fetida*. Pour ce faire, des vers ont été exposés à différentes concentrations de nanotubes (0,1 ; 1 et 10 mg/kg de sol) seuls ou adsorbés sur du nonylphénol. Après une exposition de 7 jours les auteurs n'ont observé aucun effet significatif des NTC sur l'activité GR et ce pour toutes les conditions expérimentales testées.

L'activité GR reste donc, comme pour les autres enzymes, dépendante des paramètres expérimentaux et des conditions d'exposition.

III.2.3.5. Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (Prx) ou thiorédoxines peroxydases, ont été découvertes il y une vingtaine d'années et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions anti-oxydantes (Kim et al., 1988; Rhee et al., 2005; Wood et al., 2003). Elles sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, associées au noyau et aux membranes et

permettent la dégradation du H_2O_2, des hydroperoxydes organiques ainsi que des peroxynitrites (Fisher et al., 1999). Ces enzymes peuvent être divisées en 6 types. Les Prx 1-5 disposent de 2 résidus de cystéine actifs et utilisent les thiorédoxines ou le glutathion comme substrat réducteur. Les Prx 6, quant à elles, possèdent un seul résidu de cystéine actif et utilisent le glutathion pour la réduction catalytique de l'H_2O_2 et divers hydroperoxydes organiques (Wood et al., 2003, Manevich et al., 2004, Knoops et al., 2007)

En plus de leur capacité à dégrader l'H_2O_2, les peroxyrédoxines agissent également comme molécules de signalisation (Hall et al., 2009). En effet, certaines Prx telles que le PRDX-1 répondent aux stress oxydant par la formation d'un complexe oligomérique. Ce dernier va agir comme un super chaperon et protéger ainsi les autres protéines de la dégradation (Jang et al., 2004).

Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, il existe 2 isoformes de la protéine PRDX codé par 2 gènes différents, *xen1* et *xen2*. Ce dernier est exprimé durant tous les stades de développement, avec une expression plus importante entre les stades 0 et 5 selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956). *xen1* est, quant à lui, exprimé beaucoup plus tardivement (à partir du stade 47-48) (Sharapov et al., 2011).

L'implication des Prx dans la réponse à un stress oxydant induit par les NTC a été mise en évidence dans quelques travaux. La mesure de ce marqueur reste toutefois peu utilisée.

Une exposition de cellules d'hépatome humain à une concentration de 0,1 µg/mL de NTCSW ou de graphène pendant 48 h, semble impacter le système anti-oxydatif et notamment les protéines PRDX. En effet, ces dernières sont positivement régulées par la présence de NTCSW et de graphène dans le milieu de culture. L'induction reste toutefois moins importante dans le cas du graphène (Yuan et al., 2011). Au contraire, une exposition de

kératinocytes humains à une concentration de 0,4 mg/mL de NTCMW pendant 24 à 48 h a entrainé une inhibition des protéines PRDX (Witzmann and Monteiro-Riviere, 2006).

De nombreux travaux n'ont toutefois pas pu mettre en évidence l'impact des NTC sur les peroxyrédoxines. Ainsi Blaze-Yost *et al*, n'ont observé aucune induction des protéines PRDX après une exposition de 48 h à 0,004 ou 0,04 µg/mL de fullerènes (C60) ou de NTC mono ou multi-parois (Blaze-Yost et al., 2011).

D'autres expériences ont été réalisées sur des souris instillées par voie intra-trachéale avec des NTCSW à une concentration de 0,5 mg/kg. Après un traitement de 3 et 14 jours, l'expression de plusieurs enzymes tels que PRDX-5, impliqué dans la détoxification de l'H_2O_2, reste inchangée quel que soit la durée de l'exposition (Chou et al., 2008).

Chez le poisson tête de boule, *Pimephales promelas*, l'injection par voie intra péritonéale de fullerènes (C60) n'a entrainé au bout de 48 h aucune différence significative de l'expression du gène *prdx2* en comparaison avec le témoin et ceci pour toutes les concentrations testées (0,2 ; 2 et 20 µg de NTC /g de poids frais) (Jovanović et al., 2011).

III.2.4. Dégâts oxydatifs cellulaires

III.2.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN

Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN : l'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des sources d'ERO cellulaire : la chaine respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn

Les réactions d'oxydation de l'ADN créent un grand nombre de dommages qui peuvent être dus à une oxydation directe (*e.g*. lésions de bases puriques et pyrimidiques) ou la formation d'adduits à l'ADN. Bien que cette oxydation soit naturellement induite au cours de

différents processus de développement des organismes, celle-ci peut être largement influencée par la présence de certains xénobiotiques et présenter de graves conséquences pour l'organisme.

L'induction de dommages à l'ADN en présence de NTC a été mise en évidence depuis quelques années chez différents organismes vivants.

Ainsi Zhu *et al*., ont pu noter une induction de dommages à l'ADN dans des cellules souches embryonnaires de souris exposées à des NTCMW (Zhu et al., 2007a). En effet le dosage de la protéine P53, connu pour son implication dans la réponse à un stress génotoxique, a permis d'observer un accroissement des dommages à l'ADN avec l'augmentation de la concentration en NTC mais aussi avec l'allongement de la durée d'exposition. Les premiers effets ont été observés à partir de 2 h pour une concentration en NTCMW de 5µg/ml (Zhu et al., 2007a).

La capacité des NTC à induire des dommages à l'ADN a également été démontrée *in vivo* chez des rats gavés avec des NTCSW à des concentrations allant de 0,064 à 0,64 mg/kg pendant 24 h. Une augmentation significative des dommages oxydativfs de l'ADN au niveau des tissus pulmonaires et hépatiques a été observée par le dosage de la 8-oxo-deoxyguanosine, un marqueur des lésions oxydatives de l'ADN (Folkmann et al., 2009).

Chez certains organismes aquatiques tels que le ver *Lymnaea luteola*, l'impact des NTCSW sur l'altération de l'ADN a été évalué grâce au test des Comètes que nous aborderons plus en détail dans le **chapitre III**. Après une exposition à différentes concentrations de NTCSW, les auteurs ont observé une augmentation significative des lésions à l'ADN à partir de 24 h pour les concentrations les plus faibles (0,05 mg/L). Le maximum de dommages a toutefois été observé après 96 h d'expositions à 0,3 mg/L (Ali et al., 2014). Au contraire, la présence de NTCSW dans le sédiment à des concentrations allant de 0,003 à 0,03

g/kg n'a montré aucun effet sur le pourcentage d'ADN dans la queue chez le ver de vase *Arenicola marina* (Galloway et al., 2010).

III.2.4.2. peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant mais aussi un relais pour sa propagation. Le mécanisme requiert un acide gras polyinsaturé avec au moins un motif 1,4-cis-pentadiène tel que l'acide arachidonique. Les hydroperoxydes formés à partir de la peroxydation de l'acide arachidonique sont toxiques pour les cellules. Ils sont normalement réduits par une glutathion peroxydase en acides gras mono-hydroxylés. Cependant, l'activité de cette enzyme est diminuée dans certaines conditions de stress et entraine par conséquent un accroissement de la durée de vie de ces hydroperoxydes.

Il existe de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique. Les plus connus restent le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) (Eriyamremu *et al*., 2008; Queisser and Schupp, 2012 ; Bacchetta *et al*., 2014) (**figure I.9**). Ces deux derniers produits peuvent interagir aussi bien avec l'ADN qu'avec les protéines. Une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est plus toxique pour la cellule.

Une étude réalisée sur l'impact cytotoxique des NTCMW sur des cellules HeLa a permis de mettre en évidence une induction de la peroxydation des lipides en présence de nanoparticules de carbone. En effet en absence de NTC, le MDA reste à un niveau très basal. Au contraire, lorsque les cellules sont incubées pendant 2 h dans une solution contenant 100 µg/ml de NTCMW, une forte augmentation du MDA est observée (Zhu et al., 2009b).

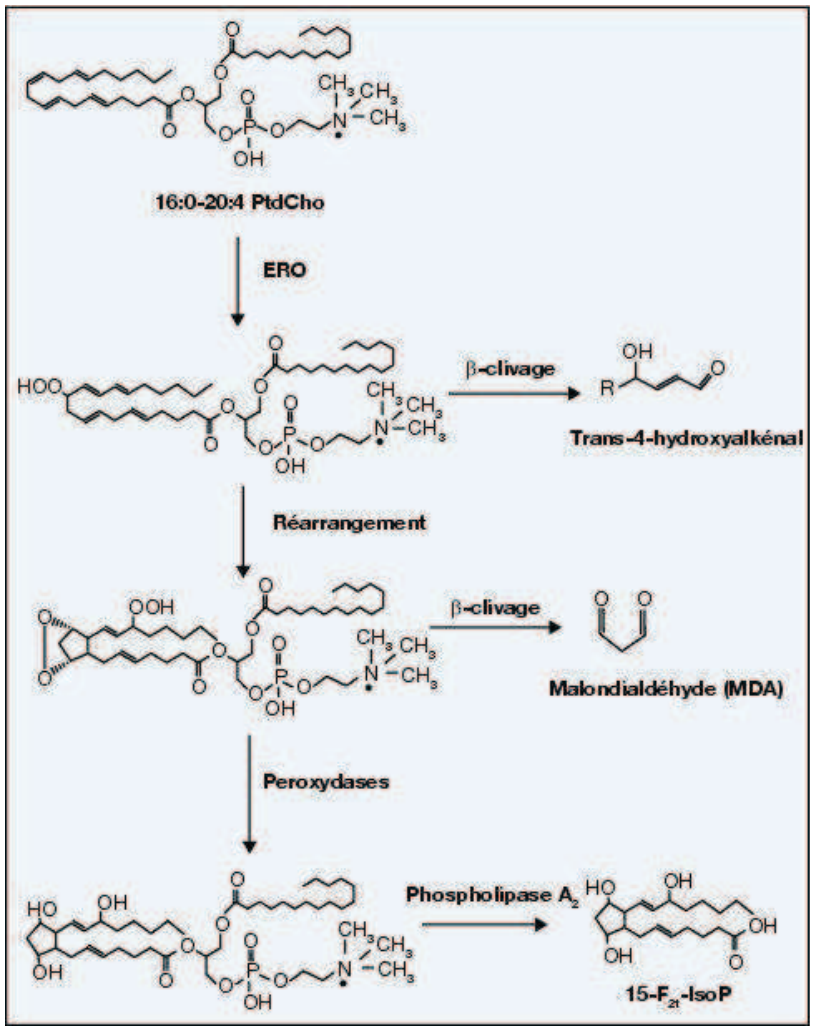

Figure I.9*: Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir de l'acide arachidonique (Guichardant et al., 2006).*

Chez les souris C57BL/6, une exposition à des NTCSW a entrainé une augmentation du niveau de peroxydation lipidique mesuré par le dosage du MDA. En effet la concentration de ce dernier était 21%, 31% et 44% plus importante que le témoin après 1, 7 et 28 jours d'exposition, respectivement (Shvedova et al., 2008). La peroxydation des lipides a également été mise en évidence par ces mêmes auteurs grâce au dosage du 4-HNE. Ce dernier a été induit chez les souris C57BL/6 après seulement 1 jour d'exposition à des NTCSW (10 µg/kg) avec une réponse dose et temps dépendante (Shvedova et al., 2005).

Lorsque des vers de fumier *E. fetida* sont exposés pendant 2 jours à différentes concentrations de NTCW, une augmentation de la concentration su MDA a été observée à partir de 200 mg/L de NTC. Cette concentration augmente ensuite pour atteindre son maximum à 400 mg/L de NTC puis diminue à la plus grande concentration testée (1000 mg/L) (Zhang et al., 2014).

D'autres travaux ont également été réalisés sur des organismes aquatiques tels que *Carassius auratus* chez qui l'exposition à des NTCSW combinés à du cadmium était à l'origine d'une augmentation remarquable du niveau de MDA. Cette augmentation n'a toutefois pas été observée en présence du cadmium seul (Qu et al., 2014.).

Chez les embryons de poisson zèbre, la présence de fullerènes (C60 et C70) à différentes concentrations dans le milieu n'a montré aucune induction du 4-HNE en comparaison avec les contrôles négatifs (Usenko, 2007).

III.2.4.3. Induction de la réponse inflammatoire

La peroxydation lipidique est très souvent associée à une réponse pro-inflammatoire. En effet, il est connu depuis longtemps que les eicosanoïdes tels que les prostaglandines et les leucotriènes sont des médiateurs de la réponse inflammatoire. Or ces eicosanoïdes sont engendrés par les acides gras polyinsaturés à 20 carbones, notamment l'acide arachidonique, libéré des phospholipides membranaires, principalement grâce à l'action de la phospholipase A2 (**figure 1.10**)

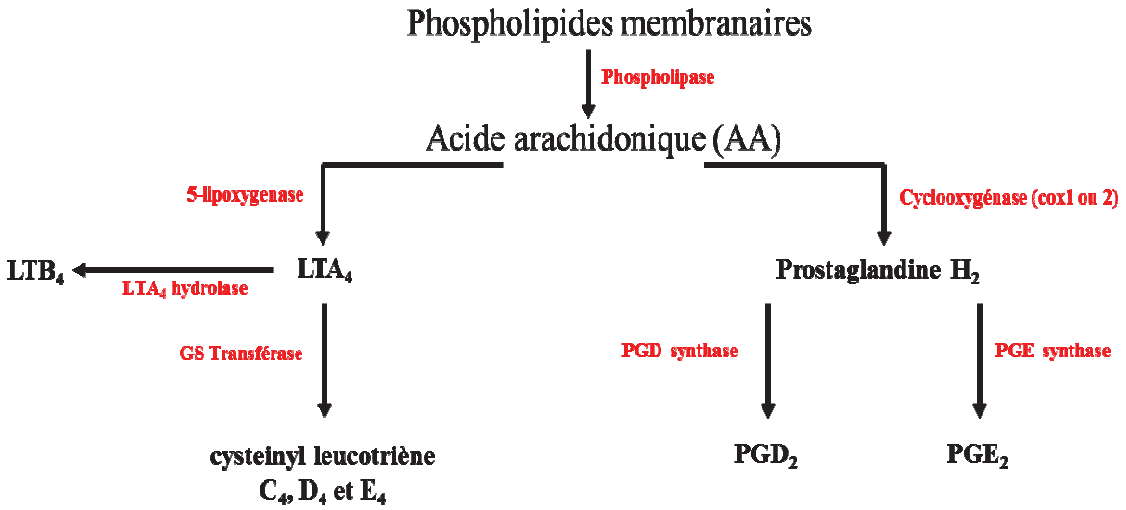

Figure I.10 *: formation de marqueurs pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique (http://www.iamast.com/)*

Les cyclo-oxygénases (COX), ou encore appelées prostaglandines H synthases, sont des enzymes clés de la biosynthèse des prostaglandines (**figure I.10)**. Il existe deux isoformes de la cyclo-oxygénase, COX-1 et COX-2, tous deux capables de métaboliser l'acide arachidonique en prostaglandines (Smith and Langenbach, 2001). COX-1 est constitutivement exprimé dans les tissus alors que COX-2 est plutôt inductible.

L'implication des cyclo-oxygénases (essentiellement COX-2) dans la réponse à une exposition aux NTC a été démontrée dans de nombreux travaux.

Des lignées cellulaires de macrophages mises au contact de 50µg/mL de NTCMW pendant 24 h ont montré une forte expression de COX-2. Les auteurs ont observé que l'induction de COX-2 était corrélée avec une augmentation des prostaglandine E2 (PGE_2) (Lee et al., 2012).

D'autres travaux menés sur des souris ont montré l'importance de COX-2 dans la protection contre l'inflammation induite par des NTCMW. En effet, des souris mutées au niveau du gène *cox-2* ($COX\text{-}2^{-/-}$), ayant reçu une dose de 4 mg/kg délivrée aux poumons par

aspiration oropharyngée ont montré, en comparaison avec souches sauvages, une forte inflammation pulmonaire. Les auteurs ont également observé une augmentation de PGD_2. La concentration des ARNm de COX-1 était, quant à elle, inchangée aussi bien chez les animaux sauvages que chez les souris COX-$2^{-/-}$ (Sayers et al., 2013) .

Les acides gras peroxydés peuvent également être pris en charge par des lipoxygénases et entrainer la formation de leucotriènes. L'implication de ces derniers dans la réponse pro-inflammatoire induite par la présence de NTC, a également été mise en évidence.

L'exposition de hamsters dorés Syriens à différentes concentrations de NTCSW pendant 1 ou 3 jours a montré une augmentation significative des leucotriènes B4 (LTB_4) au niveau des cellules broncho-alvéolaires. La mesure des lipoxygénases (LOX) par immunohistochimie a montré une forte intensité de la 5-LOX au niveau des parois et des macrophages alvéolaires pour tous les temps et toutes les concentrations testés (Sukhija, 2011).

Références bibliographiques

Ali, D., Ahmed, M., Alarifi, S., Ali, H., **2014**. Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail Lymnaea luteola L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environ. Toxicol*. 1522-7278.

Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P., Boczkowski, J., **2009**. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Rev Mal Respir*. 26 (6), 625–637.

Aschberger, K., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Hankin, S.M., Peters, S.A.K., Tran, C.L., Christensen, F.M., **2010**. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure—appraisal of human health risk assessment based on open literature. Crit. *Rev. Toxicol*. 40, 759–790.

Auffan, M., Rose, Jérôme, Bottero, J.-Y., Lowry, Gregory V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., **2009**. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nano*. 4, 634–641.

Bacchetta, R., Moschini, E., Santo, N., Fascio, U., Del Giacco, L., Freddi, S., Camatini, M., Mantecca, P., **2014**. Evidence and uptake routes for Zinc oxide nanoparticles through the gastrointestinal barrier in *Xenopus laevis*. *Nanotoxicology*. 8, 728-744.

Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., Carrière, M., **2010**. Toxicological consequences of TiO2, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an *in vitro* study. *J Nanopart Res*. 12, 61–73.

Barone, P.W., Baik, S., Heller, D.A., Strano, M.S., **2005**. Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes. *Nat Mater*. 4, 86–92.

Béduer, A., Seichepine, F., Flahaut, E, Loubinoux, I., Vaysse, L., Vieu, C., **2012**. Elucidation of the Role of Carbon Nanotube Patterns on the Development of Cultured Neuronal Cells. *Langmuir*. 28, 17363–17371.

Bethune, D.S., Klang, C.H., De Vries, M.S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., Beyers, R., **1993**. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 363, 605–607.

Blaze-Yost, B.L., Banga, A., Amos, A., Chernoff, E., Lai, X., Li, C., Mitra, S., Witzmann, F.A., 2011. Effect of carbon nanoparticles on renal epithelial cell structure, barrier function, and protein expression. *Nanotoxicology*. 5, 354–371.

Bordere, S., J.M. Corpart, NE. El Bounia, P. Gaillar, d, N. Passade-Boupat, P.M. Piccione, D. Plée, **2011**. Industrial production and applications of carbon nanotubes.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., **2013**. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon*. 54, 175–191.

Cañas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, Lenore, Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E.H., Olszyk, D., **2008**. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environ Toxicol Chemi*. 27, 1922–1931.
Cao, A., Dickrell, P.L., Sawyer, W.G., Ghasemi-Nejhad, M.N., Ajayan, Pulickel M., **2005**. Super-Compressible Foamlike Carbon Nanotube Films. *Science*. 310, 1307–1310.

Cele, L.M., Coville, N.J., **2009**. The negative effects of alcohols on carbon nanotube synthesis in a nebulised spray pyrolysis process. *Carbon*. 47, 1824–1832.

Cheng, J., Flahaut, E., Cheng, S.H., **2007**. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem*. 26, 708–716.

Chou, C.-C., Hsiao, H.-Y., Hong, Q.-S., Chen, C.-H., Peng, Y.-W., Chen, H.-W., Yang, P.-C., **2008**. Single-Walled Carbon Nanotubes Can Induce Pulmonary Injury in Mouse Model. *Nano Lett*. 8, 437–445.

D&Consultants, **2012**. Les réalités industrielles dans le domaine des nanomatériaux en France Analyse de la réalité du poids des nanomatériaux dans la filière industrielle concernée.

Dai, H., Rinzler, A.G., Nikolaev, Pasha, Thess, Andreas, Colbert, Daniel T., Smalley, Richard E., **1996**. Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide. *Chemical Physics Letters*. 260, 471–475.

Díaz, G., Benaissa, M., Santiesteban, José G., José-Yacamán, M., **1998**. Carbon Nanotubes Prepared by Catalytic Decomposition of Benzene Over Silica Supported Cobalt Catalysts. *Fullerene Sci Techn*. 6, 853–866.

Dröge, W., **2002**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82, 47–95.

Du, J., Wang, S., You, H., Zhao, X., **2013**. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: A review. *Environ Toxicol Phar*. 36, 451–462.

Ebbesen, T.W., Ajayan, P. M., **1992**. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*. 358, 220–222.

Ebbesen, T.W., Hiura, H., Fujita, J., Ochiai, Y., Matsui, S., Tanigaki, K., **1993**. Patterns in the bulk growth of carbon nanotubes. *Chem Physics Lett*. 209, 83–90.

Edgington, A.J., Roberts, A.P., Taylor, L.M., Alloy, M.M., Reppert, J., Rao, A.M., Mao, J., Klaine, S.J., **2010**. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environ Toxicol Chem*. 29, 2511–2518.

Endo, M., Strano, M., Ajayan, P., **2008**. Potential Applications of Carbon Nanotubes. *Carbon Nanotubes*. 111, 13–62.

Eriyamremu, G.E., Osagie, V.E., Omoregie, S.E., Omofoma, C.O., **2008**. Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotox Environ Safe*. 71, 284–290.

Ferreira, J.L.R., Barros, D.M., Geracitano, L.A., Fillmann, G., Fossa, C.E., De Almeida, E.A., De Castro Prado, M., Neves, B.R.A., Pinheiro, M.V.B., Monserrat, J.M., **2012**. In vitro exposure to fullerene C60 influences redox state and lipid peroxidation in brain and gills from Cyprinus carpio (Cyprinidae). *Environmental Toxicology and Chem*. 31, 961–967.

Fisher, A.B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J.W., Feinstein, S.I., **1999**. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*. 274, 21326–21334.

Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., Møller, P., **2009**. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect*. 117, 703–708.

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 Pollut*. 158, 1748–1755.

Ghafari, P., St-Denis, C.H., Power, M.E., Jin, X., Tsou, V., Mandal, H.S., Bols, N.C., Tang, X., **2008**. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat Nano* 3, 347–351.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., **2009**. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol*. 43, 9216–9222.

Govindaraj, A., Flahaut, E., Laurent, C., Peigney, A., Rousset, A., Rao, C.N.R., **1999**. An investigation of carbon nanotubes obtained from the decomposition of methane over reduced Mg1− xM xAl2O4 spinel catalysts. *J Mater Res*. 14, 2567–2576.

Grüneis, A., Rümmeli, M.H., Kramberger, C., Barreiro, A., Pichler, T., Pfeiffer, R., Kuzmany, H., Gemming, T., Büchner, B., **2006**. High quality double wall carbon nanotubes with a defined diameter distribution by chemical vapor deposition from alcohol. *Carbon*. 44, 3177–3182.

Guichardant, M., Bacot, S., Molière, P., Lagarde, M., **2006**. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *OCL*. 13, 31–34.

Guo, J., Zhang, Xiao, Zhang, S., Zhu, Y., Li, W., **2008**. The Different Bio-Effects of Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes on *tetrahymena pyriformis*. *Curr Nanosci*. 4, 240–245.

Guo, T., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D. T., Smalley, R. E., **1995**. Catalytic growth of single-walled manotubes by laser vaporization. *Chem Phys Lett*. 243, 49–54.

Hafner, J., Bronikowski, M., Azamian, B., Nikolaev, P., Rinzler, A., Colbert, D., Smith, K., Smalley, R., **1998**. Catalytic growth of single-wall carbon nanotubes from metal particles. *Chem Phys Lett*. 296, 195–202.

Hall, A., Karplus, P.A., Poole, L.B., 2009. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J*. 276, 2469–2477.

Hernadi, K., Fonseca, A., Nagy, J.B., Bernaerts, D., Riga, J., Lucas, A., **1996**. Catalytic synthesis and purification of carbon nanotubes. *Synthetic Met*. 77, 31–34.

Hirsch, A., **2002**. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*. 41, 1853–1859.

Hu, C., Cai, Y., Wang, W., Cui, Y., Li, Mei, **2013**. Toxicological effects of multi-walled carbon nanotubes adsorbed with nonylphenol on earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Science: Proc Impa*. 15, 2125-2130.

Huang, L., White, B., Sfeir, M.Y., Huang, M., Huang, H.X., Wind, S., Hone, J., O'Brien, S., **2006**. Cobalt Ultrathin Film Catalyzed Ethanol Chemical Vapor Deposition of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem*. 110, 11103–11109.

Iijima, S., **1991**. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 354, 56–58.

Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A., Bernholc, J., **1996**. Structural flexibility of carbon nanotubes. *J Chem Phys*. 104, 2089–2092.

Iijima, S., Ichihashi, T., **1993**. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*. 363, 603–605.

Janez P., **2011**. Recommandation n° 2011/696/UE du 18/10/11 relative à la définition des nanomatériaux.

Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, Sue Goo, Cho, M.J., Lee, S.Y., **2004**. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*. 117, 625–635.

Jose-Yacaman, M., Miki-Yoshida, M., Rendon, L., Santiesteban, J. G., **1993**. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Appl Phys Lett*. 62, 202–204.

Journet, C., Maser, W.K., Bernier, P., Loiseau, A., De la Chapelle, M.L., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., Fischer, J.E., **1997**. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature*. 388, 756–758.

Jovanović, B., Anastasova, L., Rowe, E.W., Palić, D., **2011**. Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (Pimephales promelas Rafinesque, 1820). *Aquat Toxicol*. 101, 474–482.

Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M., **2009**. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environ Sci Technol*. 43, 2648–2653.

Kennedy, A.J., Hull, M.S., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A., Jr, **2008**. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*. 27, 1932–1941.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A.S., **2009**. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*. 3, 3221–3227.

Kim, K., Kim, I.H., Lee, K.Y., Rhee, S G, Stadtman, E.R., **1988**. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O2 mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*. 263, 4704–4711.

Kim, K.-T., Edgington, A.J., Klaine, S.J., Cho, J.-W., Kim, S.D., **2009**. Influence of multiwalled carbon nanotubes dispersed in natural organic matter on speciation and bioavailability of copper. *Environ Sci Technol*. 43, 8979–8984.

Klaine J.S., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., **2008**. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*.27, 1825–51.

Knoops, B., Loumaye, E., Eecken, V.V.D., **2007**. Evolution of the Peroxiredoxins. *Subcell Biochem*. 44,27–40.

Larue, C., Pinault, M., Czarny, B., Georgin, D., Jaillard, D., Bendiab, N., Mayne-L'Hermite, M., Taran, F., Dive, V., Carrière, Marie, **2012**. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. *J Hazard Mater*. 227-228, 155–163.

Lee, J.K., Sayers, B.C., Chun, K.-S., Lao, H.-C., Shipley-Phillips, J.K., Bonner, J.C., Langenbach, R., **2012**. Multi-walled carbon nanotubes induce COX-2 and iNOS expression via MAP Kinase-dependent and -independent mechanisms in mouse RAW264.7 macrophages. *Part Fibre Toxicol*. 9, 14.

Li, M., Huang, C.P., **2011**. The responses of *Ceriodaphnia dubia* toward multi-walled carbon nanotubes: Effect of physical–chemical treatment. *Carbon*. 49, 1672–1679.

Lim, J.-H., Kim, Sung-Hwan, Lee, I.-C., Moon, C., Kim, Sung-Ho, Shin, D.-H., Kim, H.-C., Kim, J.-C., **2011**. Evaluation of Maternal Toxicity in Rats Exposed to Multi-Wall Carbon Nanotubes during Pregnancy. *Environ Health Toxicol*. 26.

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., Watari, F., **2009a**. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J Hazard Mater*. 170, 578–583.

Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J.S., Reid, M.L., Ratnikova, T.A., Rao, A.M., Luo, H., Ke, P.C., **2009b**. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants. *Small*. 5, 1128–1132.

Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R.H., Rand, D.M., **2009**. Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in Drosophila: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. *Environ Sci Technol*. 43, 6357–6363.

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., **2012**. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. *Environ Sci Technol*. 46, 8458–8466.

Lovern, S.B., Klaper, R., **2006**. Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*. 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). *Environ Sci Technol*. 41, 4465–4470.

Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., **2004**. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 3780–3785.

Masato Naya, N.K., **2012**. In vivo genotoxicity study of single-wall carbon nanotubes using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul toxicol pharm*. 64, 124–9.

McCord, J.M., Fridovich, I., **1969**. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244, 6049–6055.

Miaudet, P., **2007**. Structure et propriétés de fibres de nanotubes de carbone à haute énergie de rupture. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.

Mills, G.C., **1959**. The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. *J Biol Chem*. 234, 502–506.

Mondal, A., Basu, R., Das, S., Nandy, P., **2011**. Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *J Nanopart Res*. 13, 4519–4528.

Moschino, V., Nesto, N., Barison, S., Agresti, F., Colla, L., Fedele, L., Da Ros, L., **2014**. A preliminary investigation on nanohorn toxicity in marine mussels and polychaetes. *Sci Total Environ*. 468-469, 111–119.

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2011**. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environ Toxicol*. 26, 136–145.

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, Emmanuel, Pinelli, E., Gauthier, L., **2007**. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology*. 1, 149–156.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK*. 5, 963–974.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, Emmanuel, Gauthier, L., **2008**. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of doublewall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. *Aquat Toxicol*. 87, 127–137.

Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., **2008**. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*. 29, 427–433.

Muller, J., Delos, M., Panin, N., Rabolli, V., Huaux, F., Lison, D., **2012**. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol Sci*. 128, 553–553.

Mwangi, J.N., Wang, N., Ingersoll, C.G., Hardesty, D.K., Brunson, E.L., Li, H., Deng, B., **2012**. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environ Toxicol Chem*. 31, 1823–1830.

Neves, V., Heister, E., Costa, S., Tîlmaciu, C., Flahaut, E., Soula, B., Coley, H. M., McFadden, J., Silva, S. R. P., **2012**. Design of double-walled carbon nanotubes for biomedical applications. *Nanotechnology*. 23, 365102.

Nieuwkoop, P.D. and Faber, J, **1956**. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) – a sytematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis, North-Holland Publishing Company for the Ubrecht Laboratory Utrecht. ed. Amsterdam.

Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, Jerome, Horne, N., Koelmans, Albert A., Klaine, S.J., **2012**. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. Environ Toxicol Chem. 31, 50–59.

Oberdörster, E., **2004**. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*. 112, 1058–1062.

Oberdörster, E., Zhu, S., Blickley, T.M., McClellan-Green, P., Haasch, M.L., **2006**. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms. *Toxicol Carbon Nanomat*. 44, 1112–1120.

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., **2005**. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*. 2, 8.

Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L., Trottier, M., **2008**. Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules [internet]. Available from: http://www.irsst.qc.ca.

Palomäki, J., Välimäki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H., **2011**. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano*. 5, 6861–6870.

Park, E-J., Zahari, N.E.M., Lee, E.-W., Song, J., Lee, J.-H., Cho, M.-H., Kim, J.-H., **2014**. SWCNTs induced autophagic cell death in human bronchial epithelial cells. *Toxicol in Vitro*. 28, 442–450.

Patel V., **2011**. Global Carbon Nanotubes Market Outlook: Industry Beckons. 2, 31–35. Peigney, A., Laurent, C., Dobigeon, F., Rousset, A., **1997**. Carbon nanotubes grown in situ by a novel catalytic method. *J Mater Res*. 12, 613–615.

Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R.R., Rousset, A., **2001**. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*. 39, 507–514.

Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., **1993**. A comparative study of free radicals in vertebrates, I. Antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol B*.105, 749–755.

Petersen, E.J., Nelson, B.C., **2010**. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem*. 398, 613–650.

Philbrook, N.A., Walker, V.K., Afrooz, M.N., Saleh, N.B., Winn, L.M., **2011**. Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in Drosophila melanogaster and CD-1 mice. *Reprod Toxicol*. 32, 442–448.

Pichardo, S., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Sánchez, E., Grilo, A., Cameán, A.M., Jos, Á., **2012**. Oxidative stress responses to carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol in Vitro*. 26, 672–677.

Qu, R., Wang, X., Wang, Z., Wei, Z., Wang, L., **2014**. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish Carassius auratus in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *J Hazard Mater*. 275, 89-98.

Queisser, N., Schupp, N., **2012**. Aldosterone, oxidative stress, and NF-κB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radical Bio Med*. 53, 314–327.

Ravichandran, P., Baluchamy, S., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Goornavar, V., Thomas, R., Wilson, B.L., Jeffers, R., Hall, J.C., Ramesh, G.T., **2011**. Pulmonary Biocompatibility Assessment of Inhaled Single-wall and Multiwall Carbon Nanotubes in BALB/c Mice. *J Biol Chem*. 286, 29725–29733.

Rhee, Sue Goo, Chae, H.Z., Kim, Kanghwa, **2005**. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Bio Med*. 38, 1543–1552.

Roberts, A.P., Mount, A.S., Seda, B., Souther, J., Qiao, R., Lin, S., Ke, P.C., Rao, A.M., Klaine, S.J., **2007**. In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by Daphnia magna. *Environ Sci Technol*. 41, 3025–3029.

Roy, M., Sonkar, S.K., Tripathi, S., Saxena, M., Sarkar, Sabyasachi, **2012**. Non-toxicity of water soluble multi-walled carbon nanotube on Escherichia-coli colonies. *J Nanosci Nanotechnol*. 12, 1754–1759.

Sanz, V., Tilmacîu, C., Soula, Brigitte, Flahaut, Emmanuel, Coley, Helen M., Silva, S. Ravi P., McFadden, J., **2011**. Chloroquine-enhanced gene delivery mediated by carbon nanotubes. *Carbon*. 49, 5348–5358.

Savas Berber, Y.-K.K., **2000**. Unusually High Thermal Conductivity of Carbon Nanotubes. *Phys Rev Lett*. 84, 4613–4616.

Saxena, S., Gomber, C., Raina, K.K., **2009**. Effect of multi-walled carbon nanotubes on viability and superoxide dismutase expression in human wound pathogens. *Int J Nanosci*. 8, 415–423.

Sayers, B.C., Taylor, A.J., Glista-Baker, E.E., Shipley-Phillips, J.K., Dackor, R.T., Edin, M.L., Lih, F.B., Tomer, K.B., Zeldin, D.C., Langenbach, R., Bonner, J.C., **2013**. Role of Cyclooxygenase-2 in Exacerbation of Allergen-Induced Airway Remodeling by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 49, 525–535.

Schneider, J.J., Czap, N., Hagen, J., Engstler, J., Ensling, J., Gütlich, P., Reinoehl, U., Bertagnolli, H., Luis, F., De Jongh, L.J., Wark, M., Grubert, G., Hornyak, G.L., Zanoni, R., **2000**. Metallorganic Routes to Nanoscale Iron and Titanium Oxide Particles Encapsulated in Mesoporous Alumina: Formation, Physical Properties, and Chemical Reactivity. *Chem*. 6, 4305–4321.

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., **2011**. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration. *Environ Sci Technol*. 45, 6136–6144.

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. *Ecotoxicol Environ Saf*. 71, 616–619.

Seichepine, F., Salomon, S., Collet, M., Guillon, S., Nicu, L., Larrieu, G., Flahaut, Emmanuel, Vieu, C., **2012**. A combination of capillary and dielectrophoresis-driven assembly methods for wafer scale integration of carbon-nanotube-based nanocarpets. *Nanotechnology*. 23, 095303.

Shahid, M., **2010**. Induction de la phytotoxicité du Plomb chez Vicia faba L. : rôles de l'absorption et de la spéciation. [thèse], Toulouse, INPT.

Sharapov, M.G., Novoselov, V.I., Fesenko, E.E., Ravin, V.K., **2011**. Two isoforms of peroxiredoxin 6 of *Xenopus laevis*. *Mol Biol*. 45, 933–940.

Sharma, C.S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B.L., Ramesh, G.T., **2007**. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechno*. 7, 2466–2472.

Shvedova, A A, Kisin, E., Murray, A R, Johnson, V J, Gorelik, O, Arepalli, S, Hubbs, A F, Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, P.A., Kagan, V E, **2008**. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295, 552–565.

Shvedova, A, Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, Valerian E, **2012**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 261, 121–133.

Shvedova, A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I., Tyurina, Y.Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, F., Antonini, J., Evans, D.E., Ku, B.-K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V.E., Castranova, V., Baron, P., **2005**. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol- -Lung C*. 289, 698–708.

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.

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., **2007**. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*. 82, 94–109.

Smith, W.L., Langenbach, R., **2001**. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*. 107, 1491–1495.

Sukhija, H., **2011**. Inhaled Single Walled Carbon Nanotubes induce Pulmonary Inflammation in Hamsters with an Increase in 5-Lipoxygenase and Leukotriene B4 Levels. [these], St John's University (New York), School Of Pharmacy.

Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A., **2012**. Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications.1988, Osaka, Japan.

Templeton, R.C., Ferguson, P.L., Washburn, K.M., Scrivens, W.A., Chandler, G.T., **2006**. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. Environ. *Sci Technol*. 40, 7387–7393.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., **2000**. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279, 1005–1028.

Thess, Lee, Nikolaev, Dai, Petit, Robert, Xu, Lee, Kim, Rinzler, Colbert, Scuseria, Tomanek, Fischer, Smalley, **1996**. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. *Science*. 273, 483–487.

Tinguely C., **2012**. Réalisation d'interconnexions de faible résistivité à base de nanotubes de carbone biparois pour la nano-électronique. [thèse], Université Paul Sabatier, Toulouse.

Usenko, C.Y., 2007. In vivo assessment of nanomaterial-induced toxicity using embryonic zebrafish. [Thèse], Oregon State University.

Usenko, C., Harper, S., Tanguay, R.., **2008**. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 229, 44–55.

Van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., 2011. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng Part B Rev*. 17, 57–69.

Velzeboer, I., Peeters, E.T.H.M., Koelmans, A A., **2013**. Multiwalled carbon nanotubes at environmentally relevant concentrations affect the composition of benthic communities. *Environ. Sci. Technol*. 47, 7475–7482.

Wang, C., Liu, H., Chen, J., Tian, Y., Shi, J., Li, D., Guo, C., Ma, Q., **2014**. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba L*.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. J Hazard Mat. 274, 404–412.

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X., **2010**. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, Dunaliella tertiolecta. *Aquat Toxicol*. 100, 194–201.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., **2006**. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol*. 40, 4336–4345.

Witzmann, F.A., Monteiro-Riviere, N.A., **2006**. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomed-Nanotechnol*. 2, 158–168.

Wood, Z.A., Schröder, E., Robin H., J., Poole, L.B., **2003**. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends in Biochem Sci. 28, 32–40.

Woodrow Wilson International Center for Scholars, Pew Charitable Trusts. The Project of Emer ging Nanotechnologies [Internet]. Available from: www.nanotechproject.org

Yang, K., Jing, Q., Wu, W., Zhu, L., Xing, B., **2010**. Adsorption and conformation of a cationic surfactant on single-walled carbon nanotubes and their influence on naphthalene sorption. *Environ Sci Technol*. 44, 681–687.

Yao, Z., Kane, C., Dekker, C., **2000**. High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Phys Rev Lett*. 84, 2941–2944.

Yuan, J., Gao, H., Ching, C.B., **2011**. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC–MS/MS proteome analysis. *Toxicol Lett*. 207, 213–221.

Zhang, L., Hu, C., Wang, W., Ji, F., Cui, Y., Li, Mei, **2014**. Acute toxicity of multi-walled carbon nanotubes, sodium pentachlorophenate, and their complex on earthworm Eisenia fetida. *Ecotox Environ Safe*. 103, 29–35.

Zheng, L.X., O'Connell, M.J., Doorn, S.K., Liao, X.Z., Zhao, Y.H., Akhadov, E.A., Hoffbauer, M.A., Roop, B.J., Jia, Q.X., Dye, R.C., Peterson, D.E., Huang, S.M., Liu, J., Zhu, Y.T., **2004**. Ultralong single-wall carbon nanotubes. *Nat Mater*. 3, 673–676.

Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., Hong, Y., **2007a**. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Letters*. 7, 3592–3597.

Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M.L., **2006**. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow. *Mar. Environ. Res*. 62 Suppl, 5–9.

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., **2009a**. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna. *J Nanopart Res*. 11, 67–75.

Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., Duan, Z., Chen, W., Alvarez, P.J.J., **2007b**. Developmental toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. *Environ Toxicol Chem*. 26, 976–979.

Zhu, Y., Li, W., Li, Q., Li, Y., Li, Y., Zhang, X., Huang, Q., **2009b**. Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon*. 47, 1351–1358.

Chapitre II : présentation du modèle biologique et des conditions d'exposition aux NTCMW

Ce chapitre est consacré à la présentation de l'espèce modèle *Xenopus laevis* utilisée dans le cadre de ces travaux. Les conditions de reproduction et d'élevage des amphibiens ainsi que les protocoles d'exposition des larves qui ont servi pour nos expériences seront également abordés. Le dernier paragraphe sera consacré à la gestion des déchets contaminés par les NTC.

I. Le modèle biologique : l'amphibien *Xenopus laevis*

Originaire d'Afrique australe, le Xénope commun (*Xenopus laevis*), crapaud à griffe ou encore appelé dactylère du Cap, appartient à la classe des Amphibiens, invertébrés tétrapodes à température variable et à peau nue. Cette espèce appartient plus précisément à l'ordre des anoures regroupant les grenouilles et les crapauds ayant un corps trapu et dépourvu de queue à l'état adulte et à la famille des *pipidae*, amphibiens primitifs dépourvus de langue.

Cette espèce possède un mode de vie essentiellement aquatique, ne remontant à la surface de l'eau que pour respirer. La maturité sexuelle est atteinte un peu avant deux ans. Les femelles adultes mesurent de 9 à 12 cm et les mâles adultes de 7 à 8 cm (**figure II.1.A**).

Xenopus laevis est une espèce ovipare, en effet la femelle expulse des œufs regroupés en grappes (**figure II.1.B**) de plusieurs dizaines d'ovocytes que le mâle va arroser simultanément de sa semence. On parle dans ce cas de fécondation externe.

Le développement du xénope (de l'œuf à l'adulte) est subdivisé en 66 stades (Nieuwkoop and Faber, 1994) qui se caractérisent par des évènements morphologiques, cellulaires et moléculaires. Au terme du développement embryonnaire, intra-ovulaire, un bourgeon caudal éclot et se transforme en larve libre et nageuse, étant chez les anoures appelée têtard (à cause de sa grosse tête fusionnée à un tronc globuleux).

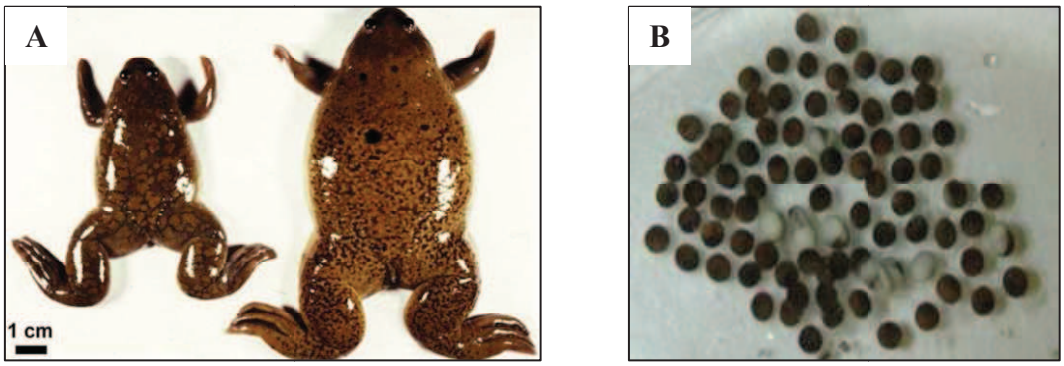

Figure II.1*: Xenopus laevis : (A) couple d'adultes (femelle à droite et mâle à gauche) (Landois, 2008) et (B) œufs (ovocytes fécondés entourés de leur gangue) (Bourdiol, 2013)*

Ainsi débute la pré-métamorphose, qui se caractérise principalement par un accroissement de la taille de la larve au cours duquel les membres postérieurs demeurent de simples bourgeons et les membres antérieurs restent logés dans les cavités branchiales qui recouvrent les replis operculaires. Des modifications morphologiques et anatomiques s'opèrent ensuite durant la métamorphose des larves. Elles conduisent à leur transformation en juvéniles, semblables aux adultes (**figure II.2**).

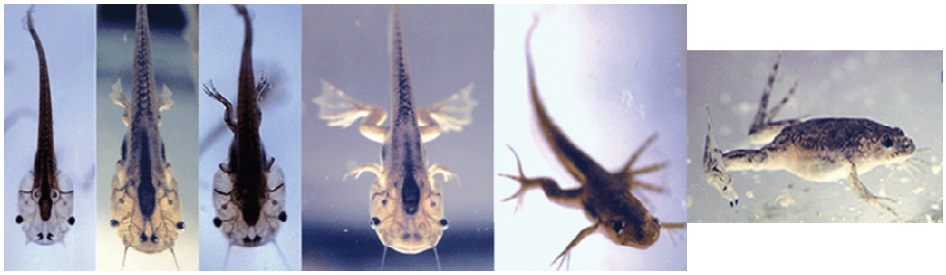

Figure II.2 *: Illustration de la métamorphose des larves de xénope jusqu'à l'obtention du stade juvénile en vue dorsale (Bourdiol, 2013).*

Comme nous le verrons par la suite, nos expérimentations ont été réalisées sur des larves au stade 50 ou 54 (**figure II.3.A, II.3.B et II.4**) selon la classification de Nieuwkoop and Faber (NIEUWKOOP, P.D. & FABER, J, 1956).

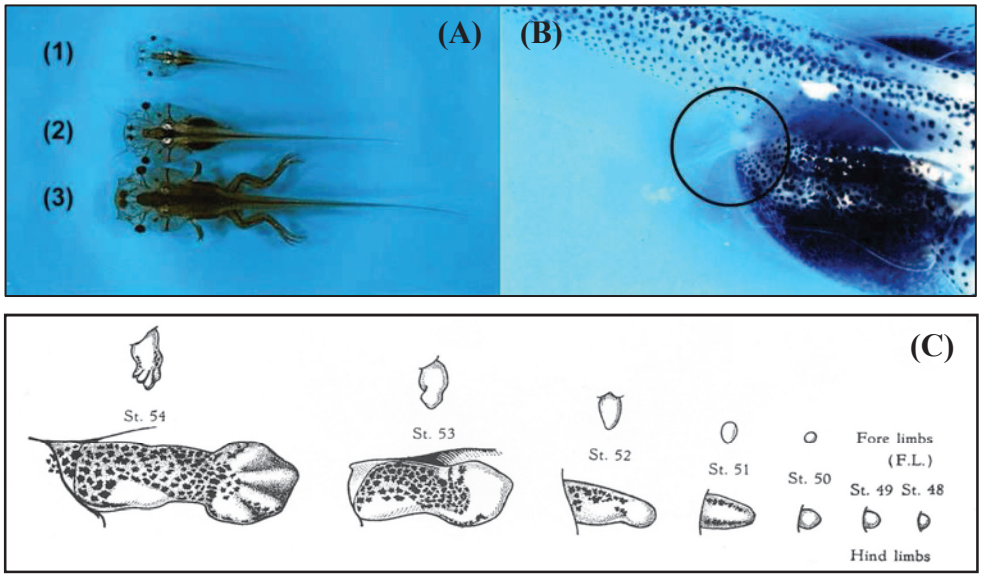

Figure II.3 *: (A) Photographie en vue dorsale de larves de xénope (1) au stade 50, (2) au stade 54 et (3) en début de métamorphose. (B) Détail du membre postérieur d'une larve au stade 50 (Landois, 2008). (C) Schéma du bourgeonnement des membres postérieurs de larves de X. laevis du stade 48 au stade 54 selon la classification de Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956).*

L'anatomie générale d'une larve de *X. laevis* est présentée sur la **figure II.4**. La tête et la queue de la larve sont transparentes et ponctuées de chromatophores, cellules chargées de pigments noirs, qu'il convient de ne pas confondre (à l'œil nu) avec des NTC. Cette pigmentation est plus intense au niveau du cerveau et des organes olfactifs. L'intestin, sous forme hélicoïdale, n'est pas directement visible mais protégé par une membrane argentée.

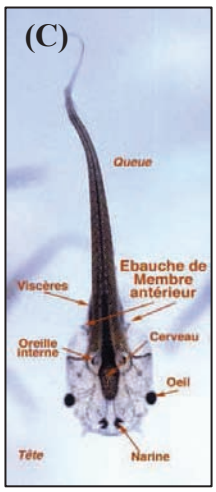

Figure II.4*: Anatomie générale d'une larve de X.laevis (Bourdiol, 2013).*

II. Elevage de l'amphibien *Xenopus laevis*

II.1. Elevage des adultes reproducteurs

Les adultes utilisés pour nos expériences sont maintenus dans une pièce thermostatée permettant de maintenir une température ambiante à 20 ± 2°C et une alternance jour/nuit de l'éclairage assurée par une horloge avec une périodicité de 8h/16h. Au sein de cette pièce les animaux sont maintenus dans des bacs équipés d'un couvercle grillagé pour éviter leur fuite. Chaque bac est rempli au 2/3 avec une eau potable issue de la distribution de la commune d'Auzeville-Tolosane (31320), traitée par ultraviolets et filtrée à travers du charbon actif (Veolia Water, France [E300CA-7003]). L'eau des aquariums est renouvelée une fois par semaine. Les animaux sont nourris deux fois par semaine par des granulés spécialement conçus pour l'élevage du Xénope (TetraPhyll®).

II.2. Reproduction *in vivo* et élevage des larves jusqu'au stade 50 et 54

Après sélection, les adultes reproducteurs sont placés dans un bac rempli d'eau. Les pontes sont obtenues par accouplement naturel après fécondation *in vivo* induite par une injection de

750 UI de gonadotrophine chorionique 1500 [HCG (Hormone Chorionique gonadotrope], Organon, France, [9002–61–3]) pour la femelle et de 50 UI de gonadotrophine sérique équine 500 (PMSG ; Pregnant Mare's Serum Gonadotropin), France, [9002–70–4]) pour le mâle. Ces hormones sont injectées dans les sacs lymphatiques de chaque animal (**figure II.5.B**).

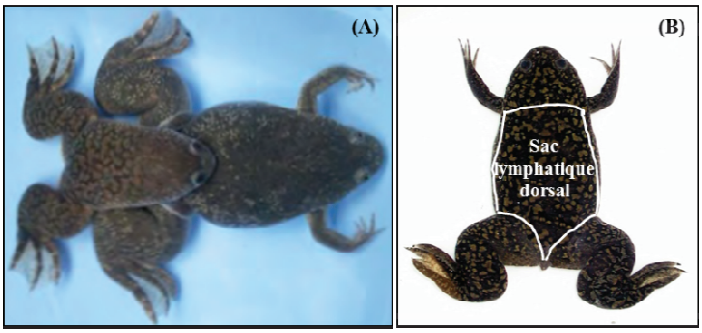

Figure II.5*: (A) Accouplement de xénopes adultes, pendant lequel le mâle (à gauche) est accroché à la femelle (à droite) par la ceinture pelvienne (amplexus) (Bourdiol, 2013). (B) Position des sacs lymphatiques dorsaux d'une femelle Xenopus laevis (Landois, 2008).*

Lors de l'accouplement, le mâle (30% plus petit que la femelle) s'accroche à celle-ci au niveau de la ceinture pelvienne (**figure II.5.A**). Cette position (amplexus) permet aux ovocytes, expulsés périodiquement par la femelle sous forme de grappes, d'être aussitôt fécondés par le mâle (fécondation externe). 12 à 15 h sont nécessaires pour que les premiers ovocytes soient libérés. 48 h après l'injection, les adultes reproducteurs sont séparés et placés à l'extérieur du bac de fécondation. Ils pourront être réutilisés pour une fécondation ultérieure après 3 mois de repos.

Les œufs (mesurant de 1,2 à 1,3 mm de diamètre) fécondés et viables sont transférés dans un aquarium rempli d'eau déminéralisée et enrichie en sels minéraux (**tableau II.1**). L'eau est maintenue à une température de 22 ± 1°C grâce à une résistance chauffante. Une oxygénation du milieu est assurée par un bullage artificiel placé au centre de l'aquarium.

Les larves issues de la fécondation sont microphages. Elles sont nourries quotidiennement avec du tetraphyll® finement moulu. La nourriture qui se dépose au fond de l'aquarium, ainsi que la microfaune qui se développe autour, sont broutées par les larves qui adoptent une position stationnaire oblique (45°, la tête tournée vers le fond). Bien que brouté en permanence par les larves, le fond de l'aquarium est nettoyé régulièrement par aspiration manuelle. Le niveau d'eau est ajusté si nécessaire.

Les larves sont maintenues dans ces conditions jusqu'à atteindre le stade approprié pour nos expérimentations [stade 50 ou 54 selon la table de classification de Nieuwkoop and Faber (NIEUWKOOP, P.D. & FABER, J, 1956)].

III. Evaluation de la toxicité des NTCMW vis-à-vis du model amphibien *X. laevis*

III.1. Protocole d'exposition des larves

Les expositions aux NTCMW sont réalisées sur des larves au stade 50 (bourgeonnement des membres postérieurs, rétrécies à leur base) ou 54 (formation complète des membres inférieurs et apparition des 4 doigts) [**figure II.3**]. Pour chaque expérience, les larves sont sélectionnées à partir d'une seule ponte afin de réduire la variabilité génétique entre les animaux. Des lots de 50 ou de 25 larves sont constitués et placés dans des cristallisoirs de 5 L contenant 2 L de milieux d'exposition.

Les larves sont exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à une gamme de concentration de NTCMW allant de 0,1 à 10 mg/L, avec une exposition de lots dit témoins dans les conditions expérimentales suivantes :

- Conditions témoins négatifs (T-) : ce milieu est préparé à partir d'eau déminéralisée (ER), à laquelle sont rajoutés des sels minéraux en concentrations connues (**tableau II.1**).

- Conditions témoins positifs (T+) : dans ce milieu, les larves sont exposées à une substance organique mutagène de référence : le MMS (méthanesulfonate de méthyle, [66-27-3], Sigma, France; 6,24 mg/L).
- Condition en présence de NTCMW : ces milieux sont constitués d'ER à laquelle sont rajoutés différentes concentrations de NTCMW (0,1; 1 et 10 mg/L).

Tableau II.1: *Composition de l'eau reconstituée.*

Nature des sels	Concentration en mg/L
Chlorure de calcium ($CaCl_2$, $2H_20$)	294
Sulfate de magnesium ($MgSO_4$, $7H_2O$)	123,25
Hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$)	64,75
Chlorure de potassium (KCl)	5,6

Les essais ont lieu dans une pièce thermostatée, de façon à maintenir la température des milieux à 22 ± 0,5 °C et un éclairement selon un cycle nycthéméral (8 h de jour et 16 h de nuit).

L'ensemble des essais sont réalisés sur des temps courts (2, 4, 8, 12 et 24 h) et menés dans des conditions statiques (pas de changement de milieu) avec un apport journalier de nourriture (ISO, 2006, 2006).

III.2. Préparation des milieux d'exposition

Deux types de NTCMW ont été utilisés au cours de ces essais. Les NTC dit bruts (dispersion par bain à ultrason) et les NTC dispersés (dispersion par ajout de matière organique). Les différentes concentrations de NTC (0,1, 1 et 10 mg/L) sont fournies sous forme humide dans un volume total de 20 ml d'ER contenant la quantité appropriée de NTCMW (Graphistrength C100, Arkema France).

III.2.1. Dispersion des NTC par un bain à ultrason (NTC bruts)

Ce mode de dispersion consiste à placer les flacons de NTC contenant 20 mL de suspension dans un bain à ultrasons (Bioblock 89863, type 570 HF Fréquence 35 KHz, I: 0.73, Af: 50/60 HZ) pendant une durée de 5 minutes à puissance maximale. Les flacons sont ensuite récupérés puis leur contenu est transféré dans un cristallisoir de 5 L. Le volume est ajusté à 2 L avec de l'ER afin d'obtenir les concentrations souhaitées de 0,1; 1 ou 10 mg/L de NTCMW (Saria et al., 2014).

III.2.2. Dispersion des NTC par la matière organique « suwannee river » (NTC dispersés)

Ce type de dispersion nécessite l'utilisation d'une sonotrode (modèle vibra cell 75042, 20 kHz, 500 W, tige de 125 mm de diamètre). Cet appareil est équipé d'un générateur ultrasonique relié à un transducteur piézo-électrique. La tension du secteur est ainsi convertie en énergie électrique à haute fréquence, puis en énergie mécanique de même fréquence. Les vibrations mécaniques du convertisseur sont intensifiées par l'immersion de la sonde dans la suspension de NTC, créant des ondes de compression dans le liquide. Cette action génère des millions de bulles microscopiques qui se propagent pendant la phase de pression négative, et qui implosent violemment pendant la phase de pression positive. C'est ce phénomène appelé cavitation acoustique, qui dissipe une énergie considérable au niveau du point d'implosion, permettant ainsi une agitation intense à la pointe de la sonde.

L'agitation moléculaire de l'échantillon provoque généralement une élévation de la température, pouvant réduire la cavitation et induire des phénomènes de ré-agglomération des NTC. Le récipient contenant la suspension est donc immergé dans un bain de glace. Un cycle de pulsation, comprenant une phase de sonication de 5 sec (5 sec ON) suivie d'une phase de relaxation de 2 sec (*i.e.* arrêt de la sonication, 2 sec OFF) est appliqué.

Le protocole de dispersion des NTC par la matière organique nécessite deux étapes importantes :

Une première étape consiste à placer les échantillons de NTCMW (50 mg/L) sous la sonotrode à 35 % de son intensité maximale. Après 1 h de sonication un volume de 40 µL est prélevé puis resuspendus dans 2 L d'ER afin d'obtenir une solution finale à 0,1 mg/L de NTCMW. On parle dans le cadre de cette expérience de NTC bruts. A l'issu de cette étape les NTC occupent un volume plus important et la suspension présente un aspect floconneux.

Au cours de la deuxième étape, les NTCMW issus de la première sonication sont mélangés à la matière organique «suwannee river». Un volume de 40 µL de NTC est additionné à 200 µL de MO (suspension à 1mg/L) puis ajusté avec de l'ER à 20 mL.

Le mélange NTC-ER-MO subit une deuxième sonication de 20 min (5 sec ON, 2 sec OFF, puissance de 35%). Cette solution est ensuite ajustée à 2 L par l'ajout d'ER. La suspension finale obtenue est à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW/MO (v/v). On parle dans le cadre de cette expérience de NTCMW dispersés.

Pour chaque condition expérimentale deux contrôles, représentés par des cristallisoirs contenant 2 L d'ER seule ou additionnée de 200 µl de MO (1 mg/L), sont réalisés.

IV. Gestion des déchets contaminés par les nanotubes de carbone

Il n'existe à ce jour aucune règlementation concernant les déchets de NTC qu'ils soient sous forme brute, en suspension ou inclus dans un matériau. Les laboratoires de recherche et les industriels qui les utilisent ont pris comme habitude de les écarter de la filière des déchets classiques et règlementés, pour les faire incinérer à haute pression.

Au sein de notre laboratoire, le matériel solide à usage unique (eppendorfs, papier absorbant, gants, contenants plastique…) ayant eu un contact avec les NTC a été stocké dans des seaux en polypropylène (PP) règlementaires spécifiques. Chaque contenant a été identifié

et pris en charge par la société spécialisée Labo Service (Teris, Castelsarrasin) de manière à être incinérés. La verrerie et le matériel réutilisables sont, quant à eux, décontaminés par un traitement aux ultrasons.

Les milieux aqueux contaminés par des NTC (milieux d'exposition, eau de nettoyage) sont filtrés afin de réduire le volume à traiter. Les filtres papier (Fisherbrand W5171H- 11832727 ; diamètre de 150 mm, densité de 64g/m^2) ayant permis de récupérer les NTC ont été traités de manière similaire au matériel à usage unique souillé. Dans le cas particulier des suspensions et des milieux d'exposition pour lesquelles les NTC ont été dispersés à l'aide de la matière organique, les solutions sont stockées dans des bidons règlementaires. En effet, ces solutions contiennent des NTC individualisés capables de passer à travers les filtres et ne peuvent donc être traités selon le même protocole que les NTC bruts. Avant leur rejet, les suspensions de NTC dispersés ont été enrichies en ions divalents Ca^{2+}. Cette étape permet de désorber l'agent dispersant et provoquer ainsi la ré-agglomération des NTC (Yang et al., 2011). La filtration a lieu 24 à 48 h après l'ajout de $CaCl_2$ déshydraté (entre 5 et 10 g/L) et l'agitation manuelle de la suspension.

Références bibliographiques

Bourdiol, F., **2013**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

ISO 2006, **2006**. Qualité de l'eau - Evaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux – Partie 1 : Evaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

Landois, P., **2008**. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., **1956**. Normal Table of Xenopus laevis (Daudin) - a sytematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis, North-Holland Publishing Company for the Ubrecht Laboratory Utrecht. ed. Amsterdam.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Yang, S.-T., Wang, H., Wang, Yunxia, Wang, Yanwen, Nie, H., Liu, Y., **2011**. Removal of carbon nanotubes from aqueous environment with filter paper. *Chemosphere*. 82, 621–626.

Chapitre III : mise en évidence de l'effet des NTCMW sur les larves de *Xenopus laevis*

I. Introduction

Au cours de leur cycle de vie, les NTC sont susceptibles d'être rejetés dans l'environnement et d'intégrer notamment le compartiment aquatique, connu pour être le réceptacle majeur des contaminants et d'interagir avec les organismes qui y sont présents.

Plusieurs scénarios de répartition des NTC dans le milieu aquatique sont possibles ils seraient majoritairement localisés au niveau des sédiments sous forme de faisceaux ou d'agglomérats (objets macroscopiques), mais également sous forme plus individualisée et en suspension dans la colonne d'eau notamment après leur interaction avec des composés organiques naturels, présents dans l'eau et agissant comme des agents dispersants.

Au vue de la production mondiale de NTC et les recherches consacrées à leur synthèse qui ne cessent d'augmenter, une meilleure connaissance de l'impact de ces nanoparticules carbonées est devenue indispensable. Nous savons aujourd'hui que les NTC sont capables de conduire à des effets dangereux sur les cellules, les tissus (Van der Zande et al., 2011; Zhao and R. Liu, 2012) ainsi que sur d'autres organismes vivants incluant l'homme (M. Bottini et al., 2006; Monteiro-Riviere et al., 2005), les mammifères (Mitchell et al., 2007; Poland et al., 2008), les plantes (K. Patlolla, 2013) mais également, les organismes aquatiques (Krysanov et al., 2010). Les connaissances sur le devenir des NTC dans l'environnement et leur interaction avec les organismes vivants restent cependant très limitées.

Une étude préliminaire réalisée au sein de notre laboratoire a permis de mettre en évidence des effets de toxicités aigüe (mortalité) sur les larves de *X. laevis* en présence de fortes concentrations de NTCMW bruts. Pour les plus faibles doses, des effets de toxicité chronique (inhibition de croissance, génotoxicité) ont pu être observées sous certaines conditions expérimentales et plus particulièrement lorsque les NTCMW étaient dispersés par des

tensioactifs tels que la gomme arabique, à une concentration de 1 mg/L (Bourdiol et al., 2013).

Parallèlement à ces résultats, des observations macroscopiques ont permis de mettre en évidence une forte présence de nanotubes dans les branchies et dans l'intestin des larves de xénope étudiées. Des travaux réalisés en microcopie électronique à balayage couplée à de la spectroscopie RAMAN n'ont pas permis à ce jour de montrer une pénétration de ces tubes dans les tissus (Bourdiol, 2013). Un effet indirect des NTC sur les organismes a donc été suspecté.

L'objectif de ce travail a donc été de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets chroniques observés et plus particulièrement des effets génétiques. Les travaux présentés dans ce chapitre se concentreront sur l'évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW sur des larves d'amphibien, à l'origine des effets indirects observés.

Deux scénarios d'exposition ont été étudiés, par le biais de l'exposition des larves à des suspensions de NTCMW bruts, s'agglomérant et sédimentant rapidement, ou de NTCMW dispersés à l'aide de matière organique (MO) naturelle provenant de la « Suwannee river », en vue de leur dispersion et de leur stabilisation au sein de la colonne d'eau. Précisons que le choix de l'agent dispersant utilisé n'est pas anodin, puisque la MO «Suwannee river» est largement utilisée depuis quelques années pour la dispersion des NTC (Alpatova et al., 2010; Hyung et al., 2007; Schwyzer et al., 2013)

Dans le cadre d'une démarche prospective menée au laboratoire, la toxicité aiguë des NTCMW a été évaluée sur les larves de *X. laevis* après leur exposition pendant 24, 48, 72 ou 96 h à des concentrations allant de 1 à 500 mg/L de NTCMW bruts. Dans le but de mettre en évidence l'implication des NTCMW dans l'induction potentielle d'un stress oxydant, différents paramètres ont été mesurés. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les larves de xénope a été évaluée grâce au dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un

des marqueurs de la perturbation du statut redox des cellules. Afin de compléter ces résultats, une mesure des activités enzymatiques de réponse à une production d'ERO a été réalisée. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes focalisés sur les trois enzymes clefs du système antioxydant : la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR) et les superoxydes dismutases (SOD). Les mesures de la production du peroxyde d'hydrogène et d'induction des activités enzymatiques ont été réalisées après exposition des larves à trois concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) ou dispersés (0,1 mg/L) pendant une durée de 2, 4, 8, 12 et 24 h.

L'implication potentielle de la peroxydation des lipides en réponse à une exposition à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) a été étudiée par le biais du dosage du malondialdéhyde (MDA), un marqueur issu de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés au cours du stress oxydant. Les dosages ont été réalisés après 2, 4, 8, 12 ou 24 h d'exposition aux NTCMW bruts.

Une étude des effets génétiques des NTCMW sur les érythrocytes de larves de xénope a également été mise au point grâce au test des Comètes. Deux paramètres (Tail DNA et Tail Length) ont été pris en considération dans la mesure des dommages à l'ADN après exposition des larves à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts.

II. Production et caractérisation des NTCMW

Les NTCMWs utilisés pour nos expériences sont produits à l'échelle pré-industrielle par la société ARKEMA. Ils sont commercialisés sous le nom de GRAPHISTRENGTH C100. Ces nanotubes sont synthétisés par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD : Catalytic Chemical Vapor Deposition) dans un lit fluidisé (réacteur vertical) sur un support catalytique constitué d'oxyde d'aluminium (Al2O3, ≤ 7%, [1344-28-1]), d'oxyde de fer (Fe2O3, ≤ 5%, [1309-37-1]) et de molybdène (735 ppm). La source de carbone utilisée est l'éthylène (C_2H_4).

Les suspensions initiales de NTCMW ont été fournies par la société ARKEMA dans 20 ml d'eau désionisée, à des concentrations finales de 0,1 ; 1 et 10 mg/L. Les observations par microscopie électronique à transmission (MET) et les caractéristiques physiques de NTCMW bruts sont représentées respectivement dans la **figure III.1** et le **tableau III.1**.

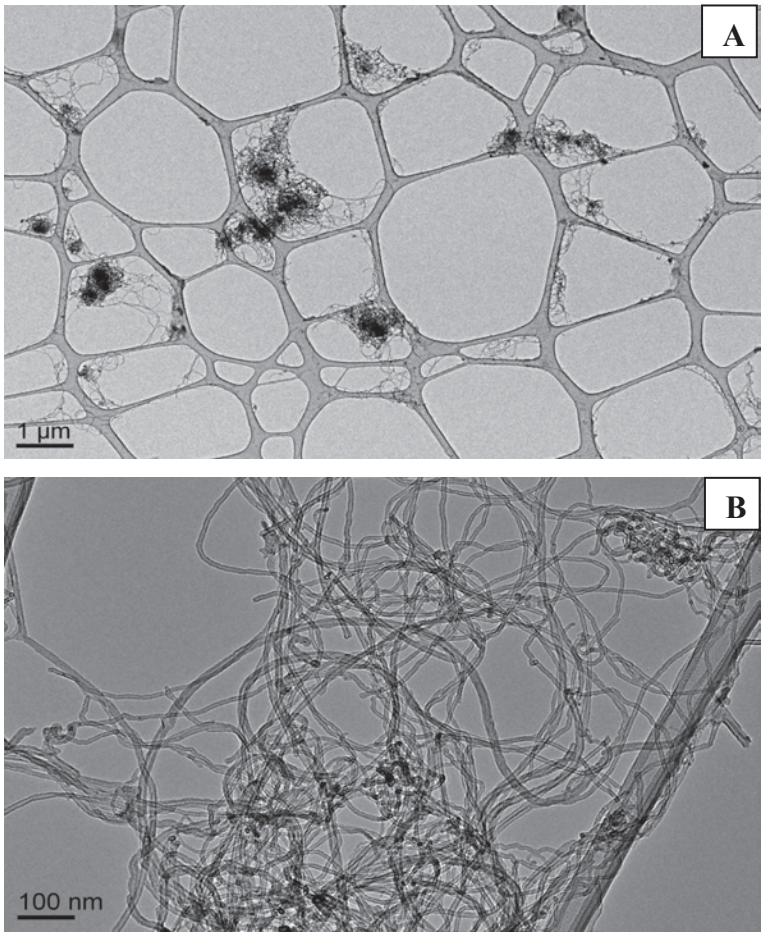

Figure III.1 *: Observation en MET d'échantillons de NTCMW bruts à faible (A) et à fort (B) grossissement (Bourdiol et al., 2013).*

L'analyse élémentaire des NTCMW fournis indique une teneur massique en carbone d'environ 90%. Cette teneur a été déterminée par combustion éclair (Laboratoire de chimie de coordination, CNRS, Toulouse). L'échantillon est introduit dans un four préchauffé à 925 °C,

puis chauffé à 1800 °C durant approximativement une seconde, avant d'être analysé (Perkin Elmer 2400 série II CHNS/O Elemental Analyser System).

La surface spécifique des NTC a été calculée à partir de la quantité d'azote (N_2) adsorbé par l'échantillon et mesurée au cours d'une désorption brusque. Les résultats ont été interprétés selon la théorie de Brunauer, Emmett et Teller qui repose sur la détermination de la surface réelle (accessible au gaz) des grains de poudre à partir de la surface recouverte par chaque molécule de N_2 et du nombre de molécules qui correspond au recouvrement initial de chaque grain (*i.e*. formation d'une monocouche ou couche mono-moléculaire).

La surface spécifique a été mesurée après dégazage de l'échantillon pendant 4 h à 120°C dans du N_2 et l'adsorption de l'azote gazeux à la température de l'azote liquide (Flux Micrométrique Sorb II 2300; précision de mesure ≈ 3%).

Selon le fournisseur, les NTCMW ont entre 5 et 15 parois, leur longueur varie de 0,1 à 10 µm et la taille moyenne des agglomérats se situe entre 200 et 500 µm (Granulométrie à diffraction laser, d (υ ; 0,5)).

Tableau II.1 : *Caractérisation des nanotubes de carbone multi-parois Graphistrength®.*

Synthèse	CCVD
Catalyseurs	Fe/Mo-Al2O3
Pureté (wt %)	> 90
Aspect	Poudre noir solide
Solubilité	Non soluble in water and organic solvent
Nombre de Parois	5 – 15 (100 % MWNT)
Diamètre	10 – 15 nm
Taille	0.1 – 10 µm
Surface spécifique	210 – 260 m2/g

III. Évaluation des mécanismes de toxicité des NTCMW

III.1. protocoles

III.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë des NTCMW

La toxicité aiguë des NTCMW a été évaluée sur des larves de xénope, exposées à des concentrations de 0,1 ; 1, 10, 50, 100 et 500 mg/L pendant 24, 48, 72 et 96 h. La mortalité, le retard de croissance et la diminution d'alimentation ont été évalués selon les recommandations ISO (Mouchet et al., 2008).

III.1.2. Mesure des paramètres du stress oxydant

L'évaluation d'une potentielle induction d'un stress oxydant a été réalisée sur des larves de *X. laevis*, exposées à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts ou dispersés. Notre choix s'est porté sur deux paramètres importants, à savoir, la production d'ERO et l'induction d'enzymes anti-oxydatives. En ce qui concerne les ERO, notre choix s'est porté sur l'H_2O_2, un des produits principaux synthétisé au cours du stress oxydant. L'évaluation de ce stress a également été réalisée par la mesure de trois enzymes clefs, impliquées dans la réponse à un déséquilibre de la balance redox à savoir, la glutathione réductase (GR), la catalase et la superoxyde dismutase (SOD).

III.1.2.1. Mesure de la concentration du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le dosage du peroxyde d'hydrogène a été réalisé sur 5 lots de 10 larves (n=5) exposées à trois concentrations de NTCMW (0,1 ; 1 ou 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 ou 24 h. Avant chaque dosage, les larves sont préalablement broyées à l'aide d'un homogénéisateur (Heidolth, RZR 2021) dans 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 0,1% (W/V) puis centrifugées à 12.000 rpm pendant 20 min. Le dosage du H_2O_2 a été réalisé dans un mélange

réactionnel contenant 250 µL du surnageant, 250 µL de tampon phosphate- potassium à 10 mM (pH 7,0) et de 500 µL d'iodure de potassium 1M.

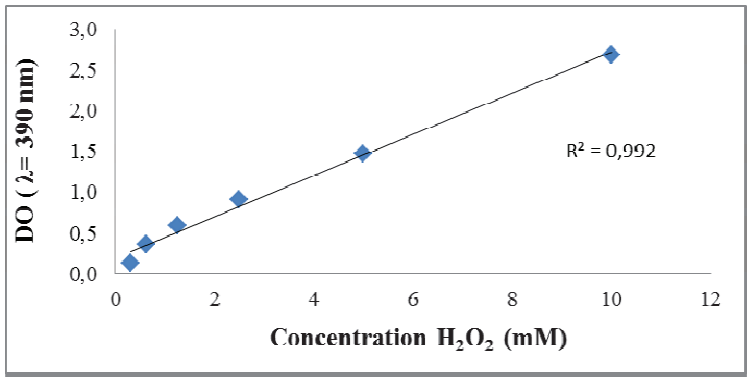

Figure III.2 *: Courbe étalon H_2O_2.*

La mesure de l'absorbance a été réalisée à 390 nm et la composition en H_2O_2 de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons en remplaçant les 250 µL de surnageant par de l'H_2O_2 à 3% (Hydrogen peroxide solution, 323381, Sigma, France). La courbe étalon comprend une gamme de concentration allant de 0,31 à 10 mM d'H_2O_2 (**figure III.2**). La concentration en H_2O_2 de l'échantillon est donnée en milli mole par mg (mmole/mg) de poids frais.

III.1.2.2. Mesure des activités enzymatiques impliquées dans la réponse au stress oxydant

Dans le but de mesurer les activités enzymatiques liées au stress oxydant, une étape d'extraction et de dosage de protéines totales solubles a été réalisée. Pour ce faire, cinq groupes de 10 larves ont été broyés dans 1 mL d'une solution contenant 975 µL de tampon phosphate Na/K à 100 mM (pH 7), 11,5 µL de KCl, 2,5 µL de cocktail inhibiteur de protéase, 10 µL de PMSF et 1µL d'aprotinine. Il est très important que l'étape du broyage se déroule à 4°C afin d'éviter la dégradation des protéines. L'homogénat est ensuite centrifugé à 13.000

rpm pendant 19 min à 4°C. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des protéines totales solubles mais aussi pour la mesure des activités enzymatiques, GR, CAT et SOD.

III.1.2.2.1. Mesure des protéines totales solubles

Le contenu en protéines des larves est déterminé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant un spectrophotomètre (Helios Alfa, Thermo Electron Corporation, USA). Le dosage des protéines a été réalisé à partir du surnageant issu du broyage des larves (**voir paragraphe III.1.2.2**) grâce à la mesure de la densité optique (DO) à 595 nm. Le mélange réactionnel était composé de 20 µL de surnageant et de 980 µL de solution Bradford (B6916, Sigma, France). Les mesures ont été réalisées après une incubation de 20 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La teneur en protéines (mg/mL d'échantillon) est déterminée par référence à une gamme étalon allant de 0,125 à 2 mg/mL (**figure III.3**) de BSA (Bovin Serum Albumin, SIGMA France), réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons.

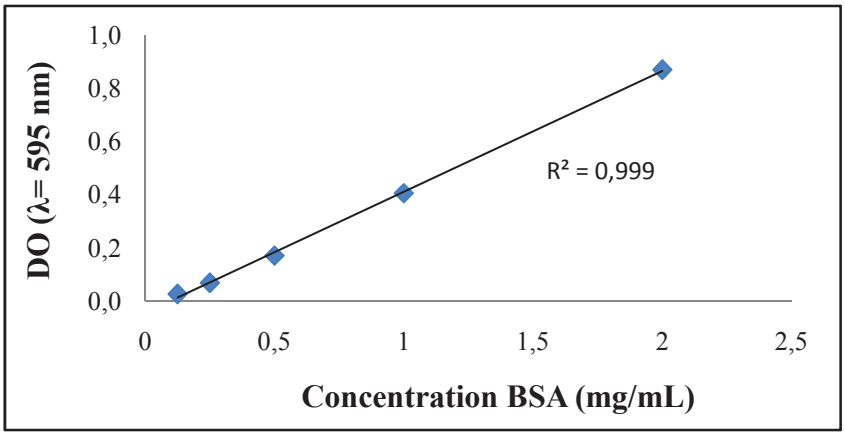

Figure III.3 : *Courbe étalon BSA pour le dosage des protéines.*

III.1.2.2.2. Mesure des activités enzymatiques

La mesure des activités enzymatiques GR, CAT et SOD, impliquées dans la réponse à un stress oxydant a été réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des protéines totales solubles. L'ensemble des mesures a été effectué par des dosages spectro-phométriques.

III.1.2.2.2.1. Glutathion réductase (EC 1.8.1.7)

L'activité GR a été évaluée en utilisant un kit de dosage (Sigma, GRSA-1KT). Le mélange réactionnel était composé de 400 µL de tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 7,5 avec 1 mM EDTA), 500 µL de GSSG à une concentration de 1,42 mg/mL, 50 µL de NADPH à 1,85 mg/mL, auxquels ont été rajoutés 50 µL du surnageant pour permettre le démarrage de la réaction enzymatique. Le principe de la mesure est basé sur le changement de densité optique (DO) à 340 nm sur une durée totale de 2 minutes. Ce changement de DO est induit par la réduction du NADPH et du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) grâce à l'enzyme GR présente dans l'échantillon.

$$\boldsymbol{GSSG + NADPH + H^{+} \rightarrow 2\ GSH + NADP^{+}}$$

L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en µmoles de NADPH oxydé par minute rapporté à la concentration initiale en protéines totales mesurée dans chaque échantillon (µmole. min^{-1}. mg^{-1} protéines ou U. mg^{-1} protéines). L'activité GR a été calculée selon l'équation suivante : $\boldsymbol{GR\ (U/mL) = (A\ blanc - A\ échantillon)/\ \varepsilon^{mM}}$ (A : absorbance, ε^{mM} = 6,22). La valeur obtenue est ensuite divisée par la concentration en protéine obtenue pour le même échantillon.

III.1.2.2.2.2. Catalase (EC 1.11.1.6)

L'activité CAT assurant la décomposition de l'H_2O_2 en eau et en oxygène, a été mesurée à l'aide d'un kit (CAT 100-1KT, Sigma, France). Le dosage a été réalisé dans une solution

contenant 500 µL de peroxyde d'hydrogène à 20 mM, 450 µL de tampon phosphate de potassium à 500 mM (pH 7,0) et 50 µL de surnageant.

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O}$$

La décomposition de l'H_2O_2 est suivie à 240 nm pendant 30 secondes par une diminution de l'absorbance. L'activité de l'enzyme est exprimée en µmole d' H_2O_2 dégradé par minute et par milligramme de protéines. Elle est déterminée grâce à l'équation suivante : ***CAT (U/mL) = (A blanc – A échantillon)/ ε^{mM}*** (^{ou} ε^{mM} = 0,0436). La valeur obtenue a ensuite été divisée par la concentration en protéine obtenue pour chaque échantillon.

III.1.2.2.2.3. Superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1)

Comme pour les autres activités enzymatiques, la SOD a été mesurée grâce à l'utilisation d'un Kit (19160, Sigma, France). Le dosage a été réalisé selon une micro-méthode dans un mélange réactionnel contenant 20 µL de surnageant, 200 µL de solution WST-1 et 20 µL d'enzyme. Le principe de cette mesure est basé sur la réduction du WST-1 en formazan suite à la transformation de l'O_2 en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Le taux de réduction de WST-1 est proportionnel à l'activité xanthine oxydase (XO), enzyme inhibée par la présence de la SOD (**figure III.4**).

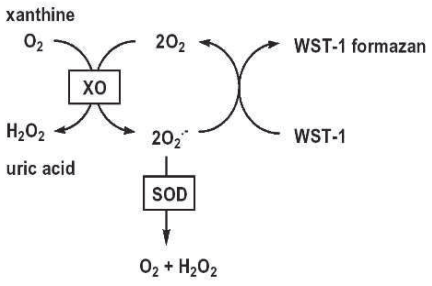

Figure III.4 *: Principe de dosage de la SOD (http://www.sigmaaldrich.com)*

L'inhibition de la xanthine oxydase par la SOD est suivie par une diminution de la densité optique à 450 nm après un temps d'incubation de 20 minutes à 37°C. L'activité SOD est déterminée à l'aide d'une courbe étalon représentant le pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase en fonction de la concentration en SOD. La courbe étalon est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons. Au final l'activité SOD est exprimée en µmole d'$O_2^{\cdot -}$ dégradé par minute et par milligramme de protéines.

III.1.3. Mesure de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est évaluée grâce au dosage du malondialdéhyde (MDA), l'un des sous-produits les plus répandus de la peroxydation lipidique au cours du stress oxydant (Lefèvre et al., 1998).

La concentration du MDA dans les larves entières a été mesurée par le dosage de l'acide thio-barbiturique (TBA) selon la méthode d'Ohkawa *et al*. (H Ohkawa, 1979). La mesure du MDA a été réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des activités enzymatiques. Le mélange réactionnel était composé de 50 µL de surnageant (**voir paragraphe III.1.2.2**), 750 µL d'acide acétique à 20% (pH 3,5), 100 µL de SDS à 8,1%, 350 µL d'eau distillée et de 750 µL de TBA à 0,8 % pour le déclenchement de la réaction. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 95°C pendant 1 h. A l'issu de cette étape, la réaction est stoppée par l'ajout de 2,5 mL de butanol-1. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. L'absorbance de la phase organique (partie supérieure) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 532 nm.

La concentration en MDA a été déterminée grâce à l'utilisation d'une courbe étalon réalisée à partir d'une solution standard de MDA allant de 1 à 40 µM, dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**figure III.5**).

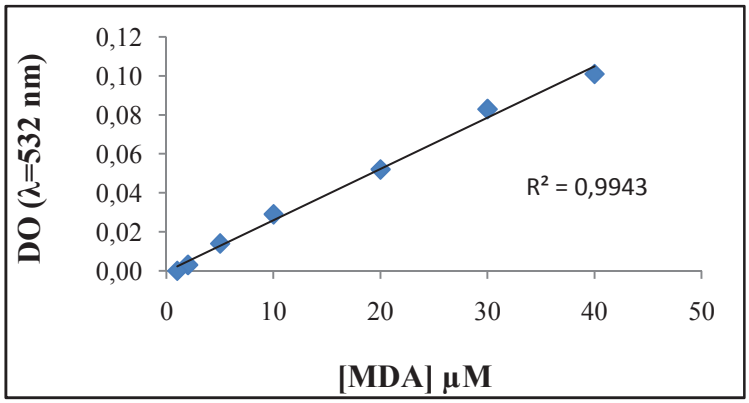

Figure III.5 *: Courbe étalon du malondialdéhyde (MDA)*

III.1.4. Mesure des dommages à l'ADN par le test des Comètes

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur micro-gel d'agarose. Il permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique et indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Les essais Comètes réalisés dans le cadre de ce travail sont basés sur le protocole de Singh *et al*., (Singh et al., 1988) avec une adaptation aux larves de *X. laevis* (Mouchet et al., 2005).

Chaque groupe de larves (n=5) est exposé pendant 2, 4, 8 et 24 h à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts. A la fin de l'exposition, chaque larve est anesthésiée par immersion dans une solution de tricaïne méthane sulfonate (MS222, Sandoz). Un prélèvement de sang est ensuite réalisé par ponction intracardiaque de chaque larve, sous loupe binoculaire. Dès l'obtention de l'échantillon sanguin, les opérations suivantes sont successivement réalisées :

- **Isolement des érythrocytes en gel d'agarose**

La veille de l'expérience, une opération de trempage des lames dans un gel liquéfié d'agarose frais normal à 0,8 % (dissous dans du PBS 1X) est effectuée, constituant ainsi la première couche d'amorce. 65 µL d'un second gel d'agarose liquéfié (préparé ex temporairement) à bas point de fusion (dilué à 1% dans du PBS) sont mélangés à un volume équivalent de cellules en solution PBS et sont déposés sur la première couche. Une lamelle est immédiatement déposée sur cette seconde couche afin d'étendre uniformément le gel. Après 5 minutes de solidification de l'agarose sur un lit de glace, la lamelle est retirée avec précaution. Le dépôt final de 90 µL de gel d'agarose liquéfié à 1% permet de prendre en sandwich la suspension cellulaire et d'éviter sa dessiccation. Après 5 minutes de solidification sur lit de glace, les lames dont la lamelle est ôtée, sont prêtes pour subir les étapes suivantes. Ces dernières se déroulent en chambre noire sous lumière inactinique de façon à limiter les dommages à l'ADN artéfactuels induits par les UV de la lumière naturelle.

- **Lyse des érythrocytes**

Les lames sont recouvertes pendant 1 h d'une solution de lyse composée de sels à forte concentration et de détergent (NaCl à 2,5 M, Na2EDTA à 0,1 M et de Trizma® base à 0,01 M), amenée à pH 10 par addition de NaOH, à laquelle sont ajoutés extemporanément 1% de Triton X-100 et 10 % de DMSO. Cette lyse forte élimine d'une part les membranes plasmiques et nucléaires par action du Na2 EDTA qui déstabilise les membranes en chélatant les ions bivalents ; d'autre part, elle débarrasse la cellule de tout le matériel extranucléaire sans altérer les acides nucléiques.

- **Déroulement de l'ADN et électrophorèse**

Les lames sont transférées dans une cuve d'électrophorèse, recouvertes d'une solution tampon électrophorétique à pH supérieur à 13, composée de NaOH 5N et de Na2 EDTA à 0,2 M. 20 minutes suffisent à dérouler l'ADN et à séparer les deux brins par rupture des liaisons hydrogène sous l'action de la soude. L'électrophorèse, dans ce même tampon, à 20 V et 300 mA, dure 20 minutes pour les cellules issues des larves de Xénope (Mouchet, 2002). Cette électrophorèse provoque la migration de l'ADN, chargé négativement, de la cathode vers l'anode formant ainsi une comète quand l'ADN nucléaire présente des cassures.

- **Neutralisation**

Les lames sont rincées deux fois, durant 5 minutes, par une solution de neutralisation composée de Trizma® Base à 0,4 M amenée à pH 7,5 par de l'acide chlorhydrique concentré. Ainsi, l'excès de détergent et d'alcalinité est éliminé (Tice et al., 1991). Le pH neutre favorise le ré-appariement des brins d'ADN de l'étape suivante.

- **Marquage et observation des lames**

Le bromure d'éthidium (BET), marqueur de fluorescence choisi pour notre étude, s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques. Le traitement alcalin précédent dégradant l'ARN (Singh et al., 1988), seules les paires de base ré-appariées de l'ADN sont marquées. Après dépôt de 50 µL de BET, une lamelle est déposée sur chacune des préparations prêtes à l'observation.

- **Observation**

3 types d'ADN peuvent être différenciés :

- ceux qui apparaissent sous la forme d'une sphère fluorescente bien circonscrite (**figure III.6.A**) correspondant à un noyau exempt de dommages à l'ADN (ADN contrôle négatif),

- ceux qui se présentent sous la forme d'une comète formée d'une tête et d'une queue (**figure III.6.B**) résultant de la migration différentielle de l'ADN d'autant plus importante que sa fragmentation augmente,

- ceux dont la tête est physiquement bien séparée de la queue, qualifiés d'ADN apoptotique et/ou nécrotique (**figure III.6.C**) non pris en compte dans notre étude.

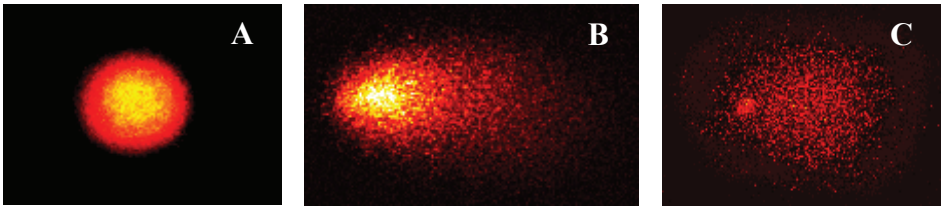

Figure III.6 : *les trois types d'ADN observés par le test des Comètes.*

Cinquante images par lame lues en microscopie à fluorescence (Zeiss LSM 410, Rhodamine 543 laser He/Ne : objectif 40, filtre d'excitation 510 – 550 nm et filtre de barrière 590 nm) sont alors capturées aléatoirement (caméra intégrée au Zeiss LSM 410) et à une épaisseur constante du gel.

- **<u>Evaluation quantitative des comètes</u>**

L'évaluation quantitative des comètes est réalisée en temps réel à partir des images capturées à l'aide du logiciel spécialisé Komet® 5.5 (Andor Technology®). Ce logiciel calcule le profil d'intensité C(x) intégré pour chaque ADN vu comme une matrice I(x, y) (**figure III.7**) et établit une discrimination entre la tête et la queue de la comète. 34 paramètres sont estimés à partir de ce profil :

- 9 paramètres de la comète calculés sur C(x),

- 9 paramètres de la tête calculés sur T(x),

- 9 paramètres de la queue calculés sur Q(x)

- et 7 paramètres, qualifiés de globaux (calculés à partir des 3 types de paramètres précédents).

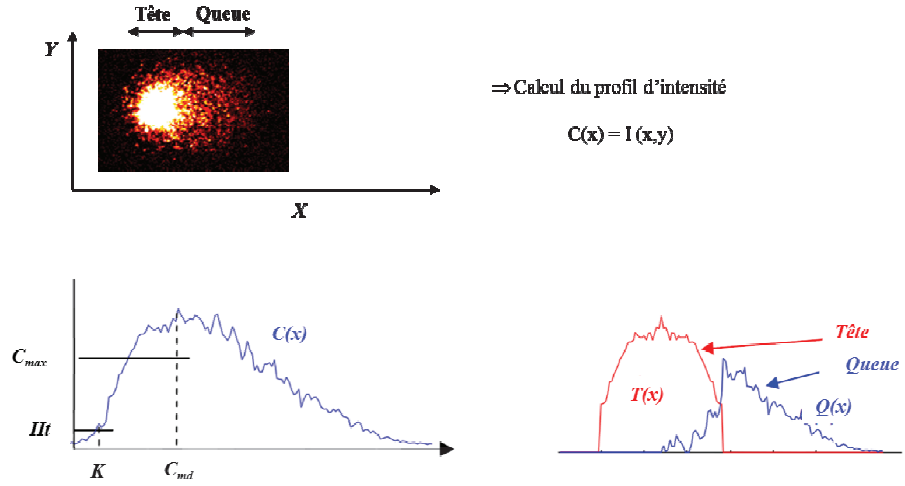

Figure III.7 *: calcul du profil d'intensité de la comète à partir de l'image vue comme une matrice I (x, y) et discrimination entre la tête et la queue.*

Ht : seuil de niveau d'intensité marquant le début de la tête de la comète (10% du niveau maximal ont été sélectionnés au niveau du logiciel)

k : position correspondante à Ht – Cmax : valeur maximale d'intensité de la comète – Cmd : position correspondant à la valeur maximale d'intensité de la comète – a : longueur maximale de la comète.

- Les 9 paramètres (calculés sur C(x), T(x) et Q(x)) sont liés aux caractéristiques statistiques de l'image de la comète. Ils sont calculés selon le mode (position du maximum d'intensité, C*md)*, la moyenne (centre de gravité), la déviation standard (écart-type), l'étendue (dynamique), le moment distribué (moyenne – k), l'inertie

(variance + (moyenne – k)), la symétrie (coefficient d'asymétrie), le coefficient de variation (déviation standard/moyenne) x100) et l'intensité optique (somme du profil *C(x), H(x), T(x)*).

- Les 7 paramètres « globaux » de la comète sont déterminés à partir des 9 paramètres précédents (calculés sur C(x), T(x) et Q(x)) et concernent dans le cadre de cette étude :

  - le pourcentage d'ADN dans la tête (Tail DNA): pourcentage d'intensité optique de la tête par rapport à celle de la comète

  - la longueur de la queue (TL, Tail length) représentée par son étendue.

III.2. Analyses statistiques des données

L'ensemble des données obtenues sont présentées par la moyenne ± écart-type. Les comparaisons entre deux groupes ont été réalisées grâce au test de Student (*t*-test). La normalité et l'homogénéité des variances sont respectivement vérifiées en utilisant les tests Shapiro-Wilk et le F test. La transformation des données est utilisée afin de corriger (si nécessaire) la déviation de la normalité ainsi que dans le but de stabiliser la variance.

Nous avons considéré les transformés les plus puissants comme les meilleurs candidats sur la base de la procédure de transformation Box-Cox. Le niveau de significativité choisi était de 5% (p<0,05). Les calculs statistiques ont été réalisés par le logiciel R® (R Development core Team, 2012)

III.3. Résultats

III.3.1. Evaluation de la toxicité aigüe des NTCMW

Les résultats de mortalité après 24, 48, 72 et 96 h d'exposition des larves de *X. laevis* à différentes concentrations de NTCMW bruts sont représentés sur la **Figure III.8**. Les données mettent en évidence une absence de mortalité quelle que soit la concentration et le temps

d'exposition. Cependant, une mortalité dose-dépendante est observée à 96 h à partir d'une concentration de 50 mg/L de NTCMW (non significative). Le pourcentage de mortalité devient significatif à partir de 100 mg/L.

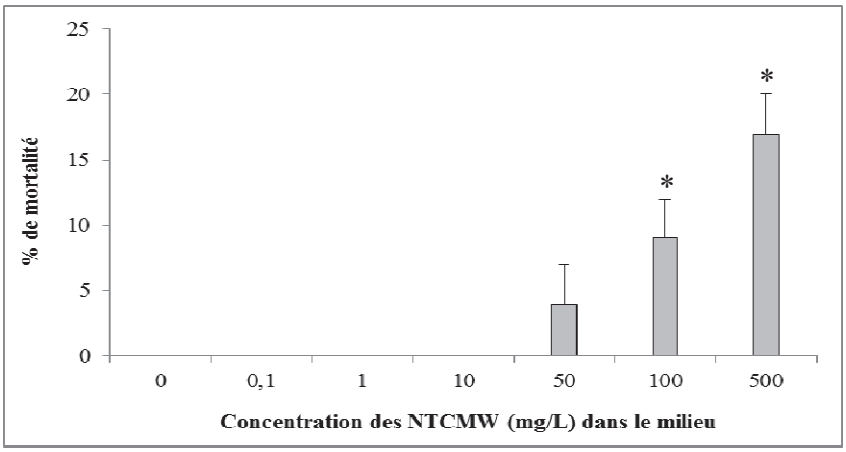

Figure III.8 *: Résultat de toxicité aiguë (mortalité) chez les larves de Xénope après 96 h d'exposition statique aux NTCMW bruts. Les données sont représentées en pourcentage de mortalité moyenne chez les larves.*

III.3.2. Effet des NTCMW sur l'induction du stress oxydant

L'induction d'un stress oxydatif suite à une exposition à des NTCMW a été évaluée par la mesure de paramètres importants, connus pour leur implication dans le statut rédox cellulaire. Dans un premier temps nous avons analysé la cinétique de production d'H_2O_2 en présence de trois concentrations de nanotubes (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant une durée de 2, 4, 8, 12 et 24 h. Dans ces mêmes conditions et dans un deuxième temps, le dosage de l'activité de trois enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (GR, CAT et SOD) a été réalisé.

III.3.2.1. Induction d'ERO par des larves exposées au NTCMW

Les résultats de dosage du peroxyde d'hydrogène sur des larves entières en présence ou en absence (contrôle négatif) de NTCMW bruts dans le milieu d'exposition sont représentés dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 *: Concentration de peroxyde d'hydrogène (mM/mg de poids frais) chez des larves de Xenopus laevis exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à différentes concentrations de NTCMW (0,1, 1 et 10 mg/L). Les valeurs représentent la moyenne de la concentration d'H_2O_2 en mmole par milligramme de poids frais ± écart-type (n=5).*

Les concentrations de la même ligne représentées par des lettres différentes sont significativement différentes (Saria et al, 2014).

Temps	CTRL	MW 0.1	MW 1	MW 10
2	1,2 ± 0,3 [a]	1,9 ± 0,2 [a]	1,3 ± 0,3 [a]	2,6 ± 0,5 [b]
4	1,1 ± 0,1 [a]	0,9 ± 0,1 [a]	3,0 ± 0,3 [b]	1,3 ± 0,1 [c]
8	2,2 ± 0,2 [a]	2,0 ± 0,1 [a]	2,9 ± 0,1 [b]	2,1 ± 0,4 [a]
12	1,9 ± 0,1 [a]	1,7 ± 0,1 [a]	3,2 ± 0,2 [b]	2,2 ± 0,1 [c]
24	1,3 ± 0,1 [a]	1,4 ± 0,1 [a]	1,7 ± 0,1 [b]	1,3 ± 0,1 [a]

On peut observer que les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW ne montrent aucune production significative d'H_2O_2, quel que soit le temps d'exposition. Le taux de production reste en effet constant, de façon identique à celui du contrôle négatif.

En présence d'une concentration de 1 mg/L de NTCMW, une forte production de peroxyde d'hydrogène est observée à partir de 4 h d'exposition (p<0,05). Cette production atteint en

effet une valeur maximale de 3,0 ± 0,3 mmole/mg de poids frais. Au même moment, la production d'H_2O_2 était de seulement 1,1 ± 0,1 mmole/mg de poids frais chez les larves témoins. La concentration d'H_2O_2 produite est restée ensuite constante jusqu'à 12 h puis a diminué à une valeur de 1,7 ± 0,1 mmole/mg de poids frais après 24 h d'exposition (p<0,05). À 10 mg/L de NTCMW bruts, la production d'H_2O_2 était de 2,6 ± 0,5 mmole/mg de poids frais après seulement 2 h d'exposition contre une concentration de 1,2 ± 0,3 mmole/mg de poids frais observée chez les larves témoins. La production d'H_2O_2 diminue ensuite jusqu'à 8 h puis augmente à nouveau jusqu'à une valeur de 2,2 ± 0,1 mmole/mg de poids frais après 12 h d'exposition (p<0,05). Après 24 h, le taux d'H_2O_2 diminue significativement pour atteindre des valeurs similaires à celles du témoin négatif (1,3 ± 0,1 mmole/mg de poids frais).

III.3.2.2. Induction des enzymes du stress oxydant en présence de NTCMW

Les résultats de l'analyse des activités enzymatiques GR, CAT et SOD, mesurées chez des larves exposées à trois concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 ou 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h sont représentés sur la **figure III.9**. Nous pouvons observer que pour des larves placées dans les cristallisoirs contenant 0,1 mg/L de NTCMW, l'induction de l'activité GR (**figure III.9.A**) est significative à partir de 8 h et atteint une valeur de 84,3 ± 2,3 µU/mg de protéines. L'activité GR diminue ensuite progressivement à une valeur de 38,3 ± 1,6 µU/mg de protéines à 24 h. Dans ces conditions d'exposition, la CAT et la SOD ne sont pas induites. Pour les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW, les activités GR et CAT (**figure III.9.A et III.9.B**) sont significativement induites à partir de 4 h d'exposition. Elles atteignent respectivement des valeurs de 123,3 ± 16,8 µU/mg de protéines et de 257,2 ± 27,1 mU/mg de protéines. Après 24 h, ces deux activités diminuent progressivement à des concentrations de 39,7 ± 1,7 µU/mg de protéines et de 73,2 ± 5,5 mU/mg de protéines, respectivement.

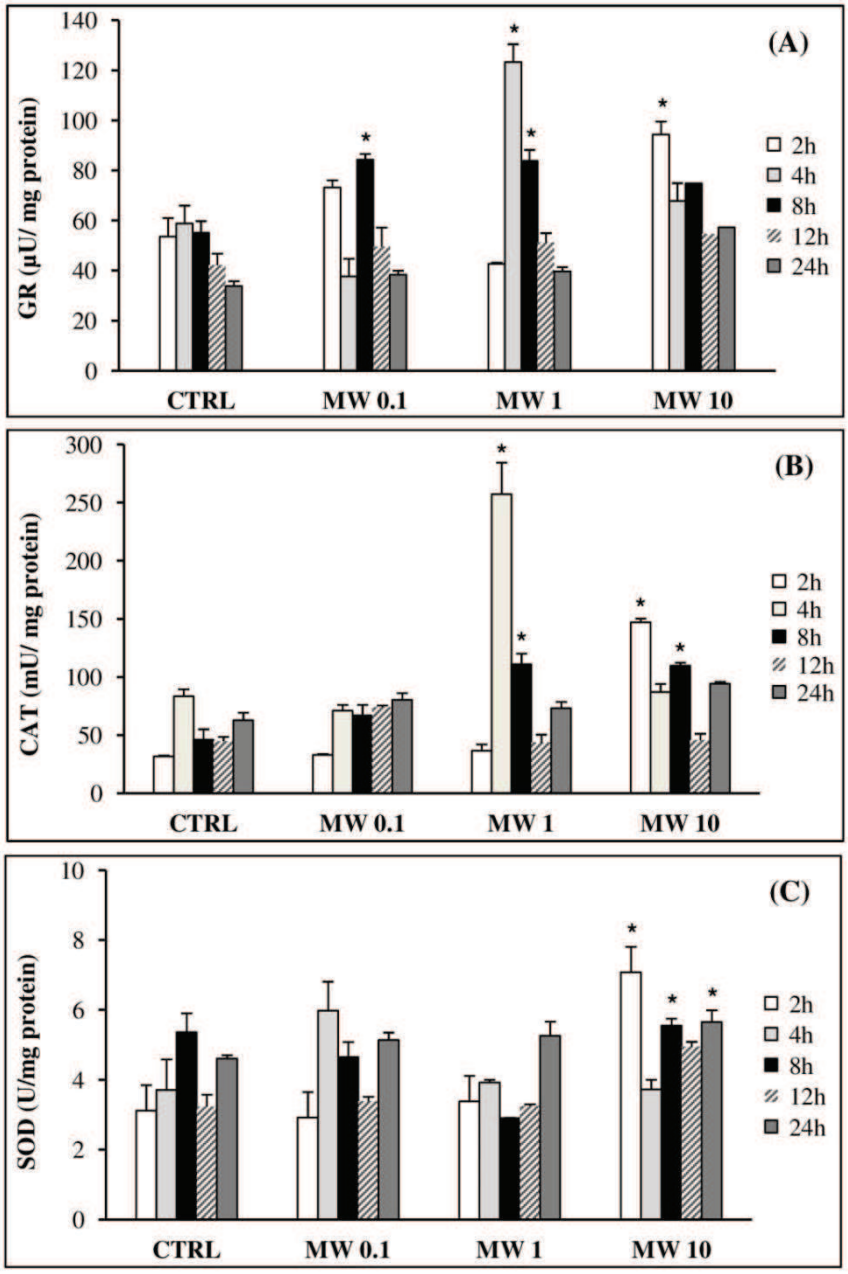

Figure III.9 : *Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant (GR, CAT, SOD) après exposition des larves de X. laevis à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. (A) activité glutathione réductase (GR), (B) activité catalse (CAT), (C) activité superoxyde dismutase (SOD). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. * : indique une induction significative ($p<0.05$) des activités enzymatiques en comparaison avec le control négatif (CTRL).*

Lorsque les larves sont exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW, toutes les activités enzymatiques mesurées (GR, CAT et SOD) sont significativement induites à partir de seulement 2 h. Les activités enzymatiques atteignent en effet des valeurs de 94,3 ± 5,3 µU/mg de protéines pour la GR, de 147,1 ± 3,3 mU/mg de protéines pour la CAT et de 7,1 ± 0,7 U/mg de protéines pour la SOD. Les contrôles négatifs sont quant à eux de 53,6 ± 7,5 µU/mg de protéines, 31,7 ± 0,9 mU/mg de protéines et 3,1 ± 0,3 U/mg de protéines pour les activités GR, CAT et SOD, respectivement. Une légère diminution de l'activité GR est ensuite observée à 24 h. Pour les activités CAT et SOD, les mêmes fluctuations sont observées dans le temps avec une induction significative à 8 h (109,9 ± 2,6 mU/mg de protéines et 5,5 ± 0,2 U/mg de protéines, respectivement) et à 24 h (significative uniquement pour la SOD).

III.3.3. Effets de la dispersion des NTCMW sur les paramètres du stress oxydant

III.3.3.1. Impact des NTCMW dispersés sur la production d'H_2O_2

Les résultats du dosage de l'H_2O_2 chez des larves exposées aux NTCMW dispersés à l'aide de la matière organique «Suwannee river» sont représentés sur le **tableau III.3**.

On peut noter chez les larves témoins une oscillation de la concentration en H_2O_2 dans le temps avec une valeur initiale de 1,4 ± 0,2 mmole/mg de poids frais, observé après 2 h d'exposition.

Lorsque les larves sont exposées à de la matière organique seule, des valeurs très similaires aux témoins sont obtenus avec le même profil de fluctuation dans le temps.

En présence de NTCMW bruts dans le milieu une très légère augmentation de la concentration en H_2O_2 a été observée à 2 h ($p>0,05$). Cette dernière diminue ensuite à partir de 4 h pour atteindre des taux très proches de ceux du témoin négatif.

Tableau III.3 *: Concentration de peroxyde d'hydrogène (mmole/mg de poids frais) chez des larves de Xenopus laevis exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à 0,1 mg/L de NTCMW bruts ou dispersés par la MO. Les valeurs représentent la moyenne de la concentration d'H_2O_2 en mmole par milligramme de poids frais ± écart-type (n=5).*

Les concentrations de la même ligne représentées par les mêmes lettres ne représentent aucune différence significative.

CTRL ER : témoins négatifs exposés dans de l'ER, CTRL MO : témoins négatives exposés dans de l'ER + 0,1 mg/L de matière organique, MW 0,1 : larves exposés à des NTCMW bruts à une concentration de 0,1 mg/L, MW 0,1 + MO : larves exposés à des NTCMW et de la matière organique à une concentration de 0,1 mg/L (v/v).

Temps	CTRL ER	CTRL MO	MW 0,1	MW 0,1 + MO
2 h	1,4 ± 0,2 [a]	1,3 ± 0.1 [a]	1,6 ± 0,03 [a]	1,9 ± 0,1 [a]
4 h	0,9 ± 0,04 [a]	0,9 ± 0,04 [a]	0,9 ± 0,1[a]	0,8 ± 0,01 [a]
8 h	1,9 ± 0,03 [a]	1,9 ± 0,02 [a]	2,0 ± 0,06 [a]	2,0 ± 0,02 [a]
12 h	1,7 ± 0,02 [a]	1,6 ± 0,0 [a]	1,6 ± 0,02 [a]	1,7 ± 0,05 [a]
24 h	1,3 ± 0,0 [a]	1,1 ± 0,03 [a]	1,3 ± 0,1 [a]	1,2 ± 0,1 [a]

La légère augmentation de la concentration en H_2O_2 a également été observée très précocement chez les larves exposées aux NTCMW dispersés par la MO. En effet, une concentration de 1,9 ± 0,1 mmole/mg de poids frais a été mesurée au bout de seulement 2 h (*P>0,05*) alors que la concentration en H_2O_2 du contrôle négatif était de 1,4 ± 0,2 mmole/mg de poids frais. Cette concentration oscille ensuite dans le temps et augmente à 8 h pour atteindre 2 ± 0,02 mmole/mg de poids frais (*P>0,05*) puis re-diminue progressivement à une valeur basale de 1,2 ± 0,1 mmole/mg de poids frais (*P>0,05*) au bout de 24 h d'exposition.

III.3.3.2. Impact des NTCMW dispersés sur les activités enzymatiques GR, CAT et SOD

Les résultats de mesure des activités enzymatiques réalisées sur des larves de xénope, exposées pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à des NTCMW dispersés par la MO sont présentés dans la **figure III.10**.

On peut observer que pour les larves exposées à de la MO seule, aucune des activités enzymatiques mesurées n'a été significativement induite. En effet, quel que soit le temps d'exposition, les mesures des activités GR, CAT et SOD ne montrent aucune différence significative entre les contrôles négatifs et les animaux exposés à la matière organique seule. Il est toutefois important de noter que des variations de l'ensemble des activités enzymatiques ont été observées dans le temps aussi bien chez les larves témoins que ceux exposés à la matière organique. Ces variations étaient toute fois plus prononcées dans le cas de la GR. En effet, après une induction maximale observée à partir de 2 h d'exposition (65,3 ± 4,1 µU/mg de protéine), cette activité diminue pour atteindre un niveau basal de 24,8 ± 3,5 µU/mg de protéine à partir de 8 h. L'activité GR augmente ensuite progressivement pour atteindre une concentration de 52,7 ± 1,8 µU/mg de protéine à la fin du temps d'exposition.

En ce qui concerne les larves exposées aux NTCMW bruts, une variation des activités enzymatiques dans le temps a également été constatée avec une induction maximale observée pour la GR à partir de 4 h (59 ± 5,1 µU/mg de protéine) et pour la CAT à partir de 2 h (336,6 ± 119,4 mU/mg de protéine). Pour l'activité SOD, de légères variations ont été observées dans le temps avec une induction maximale à 12 h (5,3 ± 0,1 U/mg de protéine).

La présence de NTCMW dispersés dans le milieu d'exposition n'a permis d'observer aucune différence significative avec le contrôle négatif et ce, pour toutes les activités enzymatiques mesurées. Seule l'activité GR montre une augmentation importante à 4 et 8 h d'exposition (64,8 ± 11,5 et 60,1 ± 12,5 µU/mg de protéine, respectivement) à la limite de la significativité.

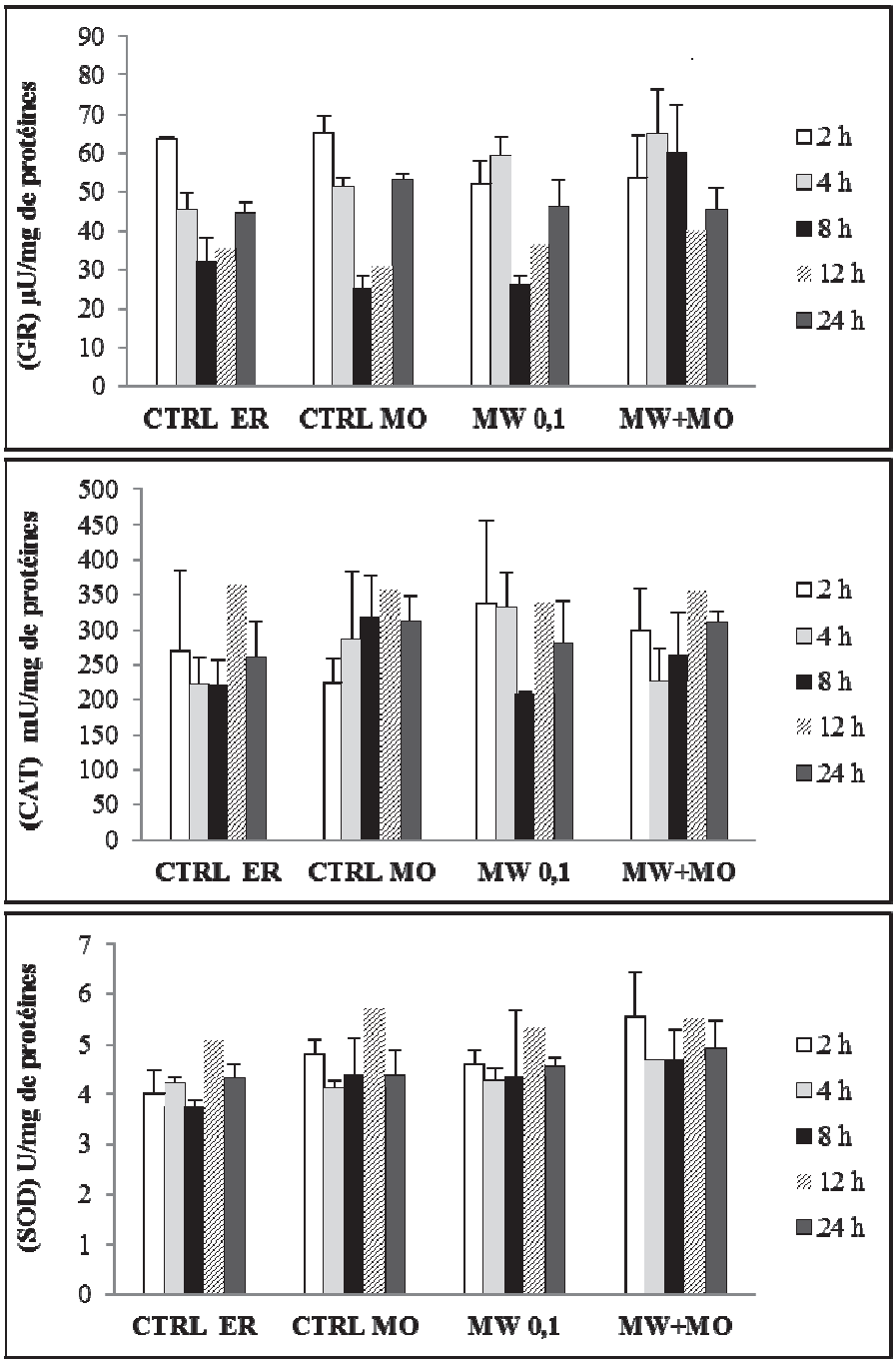

Figure III. 10 *: Induction d'activités enzymatiques du stress oxydant (GR, CAT, SOD) après exposition des larves de X. laevis à des NTCMW (0,1 mg/L) bruts ou dispersés pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. (A) activité glutathion réductase, (B) activité catalase, (C) activité superoxyde dismutase. Les valeurs représentent les moyennes de 5 réplicats ± l'écart-type.*

CTRL ER : contrôle négatif, CTRL MO : contrôle matière organique, MW 0,1 : NTCMW à 0,1 mg/L, MW+MO : NTCMW à 0,1 mg/L dispersés avec la matière organique.

III.3.4. Effet des NTCMW sur la peroxydation des lipides

Comme nous avons pu le voir précédemment, la peroxydation des lipides a été évaluée par la mesure du malondialdéhyde (MDA), issus de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.11**.

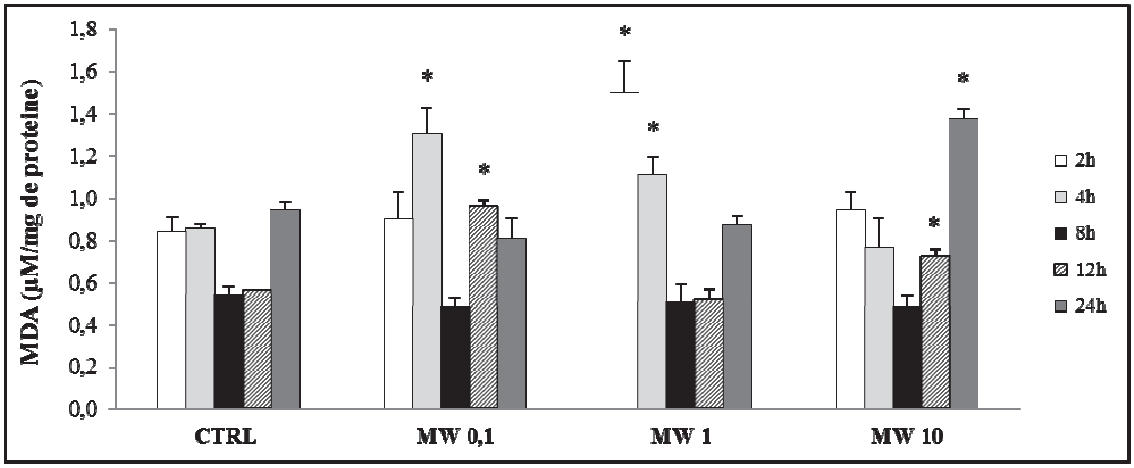

Figure III.11 : *Concentration du MDA chez des larves de X. laevis exposées à des NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type. CTRL : contrôle négatif, MW0,1 ; MW 1 et MW 10 : NTCMW bruts à une concentration de 0,1 ; 1 et 10 mg/L, respectivement.*

** : indique une induction significative (P<0,05) des activités enzymatiques en comparaison avec le contrôle négatif*

L'exposition des larves à une concentration de 0,1 mg/L induit une production significative de MDA à 4 et 12 h qui atteint respectivement des valeurs de 1,3 ± 0,1 et 0,9 ± 0,03 µmole/mg de poids frais. À 2, 8 et 24 h aucune différence significative n'a pu être observée entre les larves témoins et celles exposées aux NTCMW.

La présence de NTCMW à une concentration de 1 mg/L dans le milieu entraine une induction maximale de la production de MDA dès 2 h d'exposition. En effet, la concentration de MDA a atteint la valeur de 1,5 ± 0,2 µmole/mg de poids frais alors que le contrôle négatif était de seulement 0,8 ± 0,1 µmole/mg de poids frais. La production de MDA diminue ensuite progressivement à des valeurs de 0,5 ± 0,01 et de 0,5 ± 0,05 µmole/ mg de poids frais à 8 et 12 h, respectivement ($p>0,05$) pour finir par ré-augmenter à 24 h ($p>0,05$).

À la concentration de 10 mg/L de NTCMW, une production significative de MDA est observée à partir de 12 h avec une valeur de 0,72 ± 0,04 µmole/ mg de poids frais. La concentration en MDA augmente ensuite pour atteindre un taux maximal de 1,4 ± 0,05 µmole/mg de poids frais à la fin du temps d'exposition (*$P<0,05$*).

III.3.5. Evaluation des effets génétiques des NTCMW par le test des Comètes

L'impact des NTCMW sur l'ADN a été évalué grâce au test des Comètes (**paragraphe III.1.3**), réalisé sur des érythrocytes de larves de *X. laevis* exposées pendant 2, 4, 8 et 24 h à des concentration de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.4.**

Les larves ayant été exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW présentaient un pourcentage de viabilité des érythrocytes très inférieur à 90%. En référence aux travaux de Collins *et al*., (Collins, 2002), les essais Comètes n'ont pas été réalisés à cette concentration. Pour la concentration de 0,1 mg/L de NTCMW, les résultats obtenus montrent une induction significative des paramètres mesurés (Tail DNA, TL) avec une oscillation des valeurs au cours du temps d'exposition.

En effet, le Tail DNA et TL atteignent des valeurs respectives de 12,4 ± 0,7 et de 70,7 ± 1,3 après 4 h d'exposition, pour ensuite diminuer au niveau du contrôle à 8 h. Ces deux

paramètres augmentent à nouveau de façon significative à 24 h pour atteindre des valeurs de 14,3 ± 0,7 (Tail DNA) et 44,4 ± 0,8 (TL).

Tableau III.4. : *Résultats des essais comètes sur les érythrocytes des larves de X. laevis exposées à 0,1 (MW 0,1) et 1 mg/L (MW1) de NTCMW bruts pendant 2, 4, 8 et 24 h.*

** : indique une augmentation significative des dommages à l'ADN ($p<0,05$) en comparaison avec le contrôle négatif.*

CP/CN : contrôle positif/ contrôle négatif

Les essais Comètes n'ont pas été réalisés sur les érythrocytes de larves exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW dont la viabilité était inférieure à 90%.

			MW 0,1		MW 1	
Temps (h)	Paramètre mesuré	CP	CN	MW	CN	MW
2	Tail DNA	19,3 ± 0,9*	7,4 ± 0,4	8,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	22,3 ± 1,1*
	TL	46,6 ± 0,9*	30,2 ± 0,6	35,5 ± 0,7	24,2 ± 0,4	50,9 ± 0,9*
4	Tail DNA	26,6 ± 1,1*	5,1 ± 0,2	12,4 ± 0,6*	2,5 ± 0,2	17,5 ± 0,8*
	TL	56,5 ± 1,1*	50,8 ± 1,2	70,7 ± 1,3*	30,8 ± 0,6	48,1 ± 0,9*
8	Tail DNA	23,7 ± 1,0*	5,2 ± 0,3	7,5 ± 0,4	3,1 ± 0,2	14,4 ± 0,8*
	TL	52,7 ± 1,0*	37,3 ± 0,9	35,7 ± 0,7	29,8 ± 0,6	49,1 ± 0,9*
24	Tail DNA	22,1 ± 1,0*	5,0 ± 0,2	14,3 ± 0,7*	3,2 ± 0,2	34,9 ± 1,4*
	TL	43,5 ± 0,9*	40,9 ± 0,9	44,4 ± 0,8*	31,2 ± 0,7	55,8 ± 0,9*

A une concentration de 1 mg/L de NTCMW, une induction significative des dommages de l'ADN est observée à tous les temps d'exposition et pour l'ensemble des paramètres mesurés. Le taux maximal de cassure de l'ADN a été mesuré à 24 h d'exposition avec des valeurs de 34,9 ± 1,4 (Tail DNA) et de 55,8 ± 0,9 (TL). Les résultats ne montrent cependant aucune variation significative des dommages basaux de l'ADN dans le temps pour les contrôles négatifs. Les résultats obtenus avec le MMS (contrôle positif) confirment le bon fonctionnement du test mis en œuvre dans cette étude.

IV. Discussion

L'étude des résultats présentés dans ce chapitre mettent clairement en évidence une induction du stress oxydant chez des larves de *Xenopus laevis* exposées à des NTCMW. Cette induction est illustrée par une augmentation significative de la production de peroxyde d'hydrogène en fonction du temps et de la dose d'exposition. Le stress oxydant s'est également caractérisé par une induction des enzymes impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène tel l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Dans le cadre de nos expérimentations, une augmentation significative de la production d'H_2O_2 a été observée à partir de 4 h, chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L. Cette production est ensuite restée significativement différente du contrôle négatif jusqu'à 12 h puis a diminué à 24 h. Pour la concentration la plus élevée de NTCMW testée (10 mg/L), la production d'H_2O_2 était significative dès 2 h d'exposition puis a diminué rapidement après 8 h. Une production moins importante d'H_2O_2 a été ré-observée à partir de 12 h (p<0,05).

Ces résultats indiquent d'une part, qu'il n y a pas une relation dirrecte entre la production d'H_2O_2 et la concentration en NTCMW dans le milieu d'exposition. D'autre part, nous pouvons constater que le temps de latence entre l'exposition et la réponse diminue avec la concentration de NTCMW (plus la dose augmente plus la réponse est précoce). Il est important de souligner que dans nos conditions expérimentales la production d'H_2O_2 semble décroître après induction, et forme parfois des oscillations. Ces observations permettent de penser qu'il existe une régulation importante du taux d'H_2O_2 chez la larve de xénope.

Les espèces réactives de l'oxygène ont une durée de vie très courte car ils sont chimiquement très réactifs, à cause de la présence d'un électron singulet sur les dernières orbitales. Dans cet état, les électrons ont une forte tendance à former de nouvelles liaisons, conduisant à des réactions chimiques, pouvant entrainer des réactions en chaine et de nouveaux radicaux libres.

La production d'ERO est un paramètre dynamique, ils sont en effet générés et éliminés en permanence au niveau des cellules (Lushchak, 2011). Même si leur production est toxique pour l'organisme, les ERO jouent un rôle important dans la signalisation et la régulation des cellules avec une implication particulière dans les processus de division et d'apoptose. Ce processus est par conséquent d'une importance capitale chez les larves de *X. laevis*, qui au stade 50, sont en état de métamorphose permanente (Menon and Rozman, 2007). Cet élément pourrait justifier les oscillations de la production d'H_2O_2 observée chez les contrôles négatifs ainsi que des niveaux d'activités élevés des enzymes intervenant dans le contrôle du stress oxydant. En outre, la concentration en H_2O_2 produit ne semble pas être corrélée au temps de réponse des larves en fonction de la concentration des NTCMW. En effet, dans le cadre de nos expérimentations la concentration maximale d'H_2O_2 a été obtenue après exposition des larves à la concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts pendant 12 h (3,2 ± 0,2 mmole/mg de poids frais). Lorsque les larves de xénope sont exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW bruts, l'induction maximale de la production d'H_2O_2 est observée après seulement 2 h. Cette production diminue ensuite puis ré-augmente pour atteindre une valeur plus faible (2,1 ± 0,4 mole/mg), ce qui laisse penser que le maximum de production d'H_2O_2 aurait été atteint avant 2 h. Ce phénomène est assez courant dans la cas de contaminations aquatiques et a été décrit par Lushchak (Lushchak, 2011).

Le system antioxydant inclut des composés hydrosolubles tels que le glutathion sous sa forme réduite, l'acide ascorbique ainsi que des molécules liposolubles comme les caroténoïdes, le rétinol et l'α-tocophérol. Ces molécules agissent généralement comme des piégeurs de radicaux libres mais peuvent également servir de cofacteur d'enzymes de réponse au stress oxydant tel que le glutathion. Les voies enzymatiques les plus importantes dans la réponse à une production de ROS sont la SOD, qui permet la conversion de l'$O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et la catalase qui va assurer la transformation de ce dernier en H_2O et O_2 (Donaldson et al., 2006). En plus

de l'action de la CAT, la GPX est impliquée dans la mobilisation de l'H_2O_2 par le biais de l'utilisation du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons et entraine la formation du glutathion oxydé (GSSG) qui va être réduit à son tour par la glutathion réductase.

Lors de cette étude, les résultats obtenus montrent que l'induction des activités enzymatiques anti-oxydantes, ne suit pas une simple relation dose-effet. L'activité GR est en effet induite à partir de 8 h d'exposition à 0,1 mg/L de NTCMW. A la concentration de 1 mg/L de NTC bruts, une induction significative a été observée après 4 h (induction maximale) et 8 h d'exposition, puis a diminué progressivement jusqu'à 24 h. Dans le cas de la plus forte concentration testée (10 mg/L), l'induction est significative seulement à 2 h et est suivie par une rapide diminution.

Pour l'activité catalase, une induction maximale a été observée à partir de 4 h d'exposition à 1 mg/L de NTCMW. A 10 mg/L de NTCMW bruts, l'induction de l'activité CAT était plus précoce, et a atteint son taux maximal d'induction après seulement 2 h d'exposition.

Pour l'activité SOD, une induction significative a été observée seulement dans le cas des expositions aux fortes concentrations. Son taux maximal a été atteint à partir de 2 h de contact avec les NTCMW bruts. L'implication de l'H_2O_2 dans la régulation des enzymes du stress oxydant chez les organismes aquatiques a largement été décrite dans la littérature [168]. Lorsque le niveau de d'anion superoxyde est bas, l'activité des peroxydases est dominante. Ces dernières vont réguler la superoxyde dismutase par l'inhibition du substrat et réduire par conséquent le taux d' H_2O_2 dans les cellules (Gottfredsen et al., 2013). L'absence d'une activation significative de la SOD en présence des faibles concentrations de NTCMW bruts (0,1 et 1 mg/L) suggère aussi la présence d'autres sources de production d'H_2O_2. En effet, plusieurs enzymes telles que la glucose oxydase, l'ureate oxydase et l'aminoacide oxydase sont connues pour leur implication dans la production d'H_2O_2 (Cadenas and Davies, 2000; Szatrowski and Nathan, 1991). Ces enzymes sont généralement localisées au niveau des

organites cellulaires tels que les peroxysomes. D'autres enzymes comme les Monoamines oxydase, que l'on retrouve essentiellement dans les membranes mitochondriales, sont également impliquées dans la production de peroxyde d'hydrogène (Edmondson, 2014; Sandri et al., 1990).

Le stress oxydant est considéré comme une voie importante de la toxicité des nanoparticules et plus particulièrement les nanotubes de carbone chez différents organismes et types cellulaires (Shvedova et al., 2012). Les NTC peuvent activer l'inflammasome par leur interaction avec les phagocytes, et accroitre de façon importante la production des ERO. De la même manière, une altération de la chaine respiratoire mitochondriale peut favoriser une hausse de la production d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi de l'H_2O_2. De plus, il a été rapporté que les NTCMW étaient capables de piéger certains radicaux libres tels que l'$O_2^{\cdot-}$ et $OH^{\cdot}$, indépendamment de la façon dont ils ont été générés (Fenoglio et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère une interaction complexe entre les NTCMW et les larves de *X. laevis*, conduisant à une perturbation du statut redox des cellules de l'organisme, à la fois par l'induction et/ou le piégeage des radicaux libres.

De par leur géométrie et leur surface hydrophobe, les NTC ont tendance à former des agglomérats. Cependant, au sein de l'environnement, les NTC ne vont pas forcement être retrouvés sous leurs formes brutes. En effet, la présence de nombreux composés organiques dans les eaux naturelles va entrainer leur dispersion (Landois, 2008). Il a été rapporté dans la littérature que le type et le degré d'agglomération des NTC pouvait modifier leur toxicité (Wick et al., 2007). Dans le cadre de nos travaux, l'impact de la dispersion des NTC sur l'induction du stress oxydant a été évalué après dispersion de la plus faible concentration de NTCMW (0,1 mg/L) par de la matière organique naturelle extraite de la « Suwannee River ». Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative sur la production d'H_2O_2, en comparaison avec le contrôle négatif mais aussi avec les larves exposées aux NTCMW.

Comme pour le cas du peroxyde d'hydrogène aucune induction des activités enzymatiques, GR, CAT et SOD, n'a pu être mise en évidence après exposition de larves à 0,1 mg/L de NTCMW dispersés. Cette absence d'effets peut être justifiée par une réduction de la taille des agglomérats de NTCMW après leur dispersion par la MO. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication de la dispersion des NTC dans réduction de leur taille et la diminution de leur toxicité, *in vitro* (Davis et al., 1986 ; Kostarelos, 2008). A l'état brut, les interactions de van der Waals entre les particules de NTC, les poussent à former des agrégats dont la taille est supérieure à 100 µm de diamètre (Nativ-Roth et al., 2007). L'administration de ces agrégats semble être associée à une toxicité pulmonaire et une induction d'un stress oxydant, chez des rongeurs (Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004). Par ailleurs Lorsque des nanotubes de carbone sont inhalés sous leur forme initiale, une formation de granulomes, associée à une légère fibrose a été observée chez la souris (Mutlu et al., 2010). Au contraire, l'administration de ces mêmes nanotubes sous une forme dispersée n'a entrainé aucun effet (Mutlu et al., 2010). Bien que les mécanismes biochimiques responsables de la toxicité des NTC ne soient pas encore entièrement connus, l'un des principaux concepts relatifs à cette toxicité serait attribué à leur capacité de générer des ERO (Alarifi et al., 2014; Shvedova et al., 2014; Wang et al., 2014). Ces derniers peuvent avoir des conséquences non négligeables sur différents compartiments cellulaires dont la membrane plasmique. En effet, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires représentent la cible principale des ERO. Il en résulte la formation de peroxydes lipidiques. Ces derniers se décomposent en plusieurs sous-produit tels que le malondialdéhyde (MDA) ou encore le 4-hydroxynonénal (4-HNE).

Dans le but d'évaluer l'impact des ERO induit par une exposition à différentes concentrations de NTCMW, des dosages de MDA ont été réalisés à l'échelle de la larve entière (**figure III.10**). Les résultats obtenus montrent une production significative de MDA à partir de 4 h chez les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW bruts.

Pour les larves placées dans une suspension contenant 1 mg/L de NTCMW, l'induction de MDA est apparue plus précocement. En effet, le maximum de sa production a été observé à partir de 2 et 4 h d'exposition puis a diminué progressivement pour atteindre des valeurs similaires à celles du contrôle négatif à partir de 8 h. En ce qui concerne les animaux exposés aux plus fortes concentrations de NTCMW, une induction significative de la peroxydation des lipides est apparue plus tardivement (après 12 h d'exposition). Ce qui suggère une induction beaucoup plus précoce comme observée dans le cas des enzymes du stress oxydant. Cette induction précoce de la peroxydation des lipides en réponse à une exposition aux NTC a déjà été démontré *in vitro* par Kagan *et al*., (Kagan et al., 2006).

Même si elle ne constitue pas la seule voie génotoxique, le stress oxydant a été décrit comme étant principalement impliquée dans la formation des lésions de l'ADN (Halliwell, 1990; Petersen and Nelson, 2010) en induisant des dommages primaires tels que les bases oxydées, les cross-links, des cassures simples ou doubles brin, des sites alcali-labiles, *etc*. Dans le cadre de cette étude une évaluation de l'impact des NTCMW sur l'ADN a été réalisée par le test des Comètes en milieu alcalin sur des érythrocytes de larves de *X. laevis*. Chez les larves exposées à une concentration de 10 mg/L de NTCMW bruts, une évaluation de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au Bleu de Trypan nous a permis de mettre en évidence une baisse de la viabilité des cellules dès 2 h d'exposition, nous empêchant ainsi de réaliser les essais Comète sur ces échantillons comme recommandé par Collins (Collins, 2002). En comparaison avec le contrôle négatif, un endommagement significatif de l'ADN a été observé après 4 et 24 h d'exposition à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW bruts. Par contre, aucun effet, n'a pu être détecté à 2 et 8 h d'exposition. Par ailleurs, chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts, des dommages significatifs à l'ADN ont été mesurés à tous les temps d'exposition. Les résultats de comparaison des moyennes obtenus avec les deux concentrations de NTCMW sont représentés sur le **tableau III.4**. On peut

observer que le taux de dommages à l'ADN est plus important chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts, suggérant une relation dose-repose indépendamment du paramètre mesuré et du temps d'exposition. Cette induction maximale des dommages à l'ADN, observée à une concentration de 1 mg/L de NTCMW correspond à la plus forte production d'H_2O_2 et d'activités enzymatiques enregistrée. Cependant, les enzymes du stress oxydant et les dommages à l'ADN ne sont pas induits au même moment. Cette différence peut être dûe à la source de l'échantillon dosé. En effet, alors que l'altération de l'ADN a été évaluée au niveau des érythrocytes du sang circulant des larves, l'induction des activités enzymatiques et la production d'H_2O_2 ont été réalisés à l'échelle de la larve entière. Néanmoins, le profil de lésions à l'ADN, la production d'H_2O_2 et du MDA ainsi que l'induction des activités enzymatiques du stress oxydant montrent une fluctuation dans le temps. Ces variations sont une manifestation typique du phénomène de stress oxydant et de l'équilibre du système redox qui se caractérise par une balance continue entre dommages et compensation / réparation. Ceci inclut le système de réparation de l'ADN basé sur des enzymes d'excision/ resynthèse au niveau des sites endommagés qui peuvent également être mesurés par le test des Comète (Petersen and Nelson, 2010). On peut toutefois constater que les dommages à l'ADN mesurés au niveau des érythrocytes ont été détectés plus précocement que les activités enzymatiques. Le test des Comètes peut donc être considéré comme un outil plus sensible pour l'évaluation de l'impact des NTCMW dans le cadre de notre étude.

V. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre montre qu'une exposition des larves de *Xenopus laevis* à des NTCMW bruts entraine une induction du stress oxydant. Ce dernier est caractérisé par une augmentation de la production d'ERO, d'enzymes intervenant dans la régulation du stress oxydatif et de MDA au niveau de la larve entière, et par l'apparition de lésions à l'ADN au niveau des érythrocytes. Cependant le taux d'induction de ces différents dommages semble être étroitement lié à la concentration des NTCMW bruts dans le milieu d'exposition. L'apparition précoce de lésions à l'ADN au niveau des érythrocytes, en comparaison avec les autres paramètres mesurés indique que le test des Comète est la technique la plus sensible pour l'évaluation d'effets pouvant être associés au stress oxydatif.

La présence de NTCMW sous une forme dispersée ne semble pas affecter l'équilibre du système redox des larves. En effet, aucune induction des activités enzymatiques n'a été observée quelle que soit la durée de l'exposition. L'évaluation de l'impact du stress oxydant induit par une exposition à différentes concentrations de NTCMW bruts nous a permis de mettre en évidence une induction de la peroxydation des lipides et de lésions à l'ADN. L'identification de sources potentielles du stress oxydant induit par une exposition à des NTCMW bruts est toutefois essentielle pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces nanoparticules carbonées.

Références bibliographiques

Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Almajhdi, F.N., Al-Qahtani, A.A., **2014**. Single-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and DNA damage via reactive oxygen species in human hepatocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 50, 714-722.

Alpatova, A.L., Shan, W., Babica, P., Upham, B.L., Rogensues, A.R., Masten, S.J., Drown, E., Mohanty, A.K., Alocilja, E.C., Tarabara, V.V., **2010**. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions. *Water Res*. 44, 505-520.

Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., Mustelin, T., **2006**. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett*. 160, 121–126.

Bourdiol, F., **2013a**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., **2013b**. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. *Carbon*. 54, 175–191.

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

Cadenas, E., Davies, K.J., **2000**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29, 222–230.

Collins, A.R., **2002**. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*. 203, 163–177.

Davis, J.M., Addison, J., Bolton, R.E., Donaldson, K., Jones, A.D., Smith, T., **1986**. The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. *Brit J Exp Pathol*. 67, 415–430.

Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., Alexander, A., **2006**. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*. 92, 5–22.

Edmondson, D.E., **2014**. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Curr Pharm Des*. 20, 155–160.

Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., Fubini, B., **2006**. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?. *Free Radic Biol Med*. 40, 1227–1233.

Gottfredsen, R.H., Larsen, U.G., Enghild, J.J., Petersen, S.V., **2013**. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol*. 1, 24–31.

Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Com*. 9, 1–32.

Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.H., **2007**. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. *Environ Sci Technol*. 41, 179–184.

Kagan, V. E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Konduru, N.V., Potapovich, A.I., Osipov, A.N., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., Shvedova, A. A., **2006**. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol Lett*. 165, 88–100.

Kostarelos, K., **2008**. The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat Biotech*. 26, 774–776.

Krysanov, E.Y., Pavlov, D.S., Demidova, T.B., Dgebuadze, Y.Y., **2010**. Effect of nanoparticles on aquatic organisms. *Biology Bull*. 37, 406–412.

Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., **2004**. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 77, 126–134.

Landois, P., **2008**. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Thérond, P., Torreilles, J., **1998**. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin-Paris*. 56, 305-319.

Lushchak, V.I., **2011**. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*. 101, 13–30.

Menon, J., Rozman, R., **2007**. Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis. *Com Bioch Phys C*. 145, 625–631.

Mitchell, L.A., Gao, J., Wal, R.V., Gigliotti, A., Burchiel, S.W., McDonald, J.D., **2007**. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci*. 100, 203–214.

Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., **2005**. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*. 155, 377–384.

Mouchet, F, Gauthier, L, Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., **2005**. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol*. 20, 74–84.

Mouchet, F., Ferrier, V., Devaux, A., **2002**. Validation du test comète sur larves d'amphibiens (*Xenopus laevis* et *Pleurodeles Waltl*) et application du potentiel génotoxique de sols, sédiments et déchets contaminés comparaison avec le test micronoyau amphibien. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2008**. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. *Aquat Toxicol*. 87, 127–137.

Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Green, A.A., Urich, D., Soberanes, S., Chiarella, S.E., Alheid, G.F., McCrimmon, D.R., Szleifer, I., Hersam, M.C., **2010**. Biocompatible Nanoscale Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes Minimizes in vivo Pulmonary Toxicity. *Nano Lett*. 10, 1664–1670.

Nativ-Roth, E., Shvartzman-Cohen, R., Bounioux, C., Florent, M., Zhang, D., Szleifer, I., Yerushalmi-Rozen, R., **2007**. Physical Adsorption of Block Copolymers to SWNT and MWNT: A Nonwrapping Mechanism. *Macromolecules*. 40, 3676–3685.

Ohkawa, N.O., **1979**. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem*. 95, 351–8.

Patlolla, K.A., **2013**. Environmental Toxicity Monitoring of Nanomaterials using Vicia Faba GENE-TOX Assay. *J Nanomed Nanotechnol*. 4, 129.

Petersen, E.J., Nelson, B.C., **2010**. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem*. 398, 613–650.

Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, Ken, **2008**. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnol*.3, 423–428.

R Development Core Team, 2012. R development Core Team. R : A Language and Environment for statistical Computing, 3-900051-07-0R Fondation for Statistical Computing, Vienna, Austria (**2012**).

Sandri, G., Panfili, E., Ernster, L., **1990**. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca2+ efflux. *Biochim Biophys Acta*. 1035, 300–305.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Schwyzer, I., Kaegi, R., Sigg, L., Nowack, B., **2013**. Colloidal stability of suspended and agglomerate structures of settled carbon nanotubes in different aqueous matrices. *Nanotechnol Water Wastewater Treatment*. 47, 3910–3920.

Shvedova, A. A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Mouithys-Mickalad, A., Stadler, K., Mason, R.P., Kadiiska, M., **2014**. ESR evidence for in vivo formation of free radicals in tissue of mice exposed to single-walled carbon nanotubes. *Free Radical Bio Med*. 73, 154–165.

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E, **2012**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 261, 121–133.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., **1988**. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175, 184–191.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., **1991**. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 51, 794–798.

Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O., Singh, N.P., **1991**. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 283, 157–164.

Van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., **2011**. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng Part B Rev*. 17, 57–69.

Wang, C., Liu, H., Chen, J., Tian, Y., Shi, J., Li, D., Guo, C., Ma, Q., **2014**. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (Vicia faba L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. *J Hazard Mater*. 274, 404–412.

Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G. a. M., Webb, T.R., **2004**. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicol. Sci*. 77, 117–125.

Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W.J., Bruinink, A., **2007**. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 168, 121–131.

Zhao, X., Liu, R., **2012**. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int*. 40, 244–255.

Chapitre IV : Mécanisme d'induction du stress oxydant chez les larves de Xenopus laevis exposées aux NTCMW bruts

I. Introduction

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre III, l'exposition des larves de xénope à différentes concentrations de NTCMW a permis de mettre en évidence l'induction d'un stress oxydant. Ce dernier s'est caractérisé par des variations dans le temps de la production d'espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2) et des enzymes de régulation du stress oxydant (GR, CAT, et SOD). Nous avons également pu démontrer que la présence de NTCMW bruts dans les milieux d'exposition pouvait entrainer une peroxydation des lipides et une induction des dommages à l'ADN. Cependant, plusieurs études menées dans notre laboratoire par spectrométrie RAMAN (Nigam and Schewe, 2000) n'ont jamais permis de démontrer que les NTCMW présents dans les villosités intestinales pénétraient dans les cellules et les tissus. De même, des études réalisées avec des nanotubes multi-parois enrichies en ^{13}C n'ont pas permis de conclure clairement quant à leur capacité à entrer et diffuser dans l'organisme (Bourdiol, 2013). En nous basant sur ces résultats, nous avons orienté notre travail sur trois hypothèses susceptibles d'être impliquées dans l'induction du stress oxydant. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux catalyseurs métalliques utilisés pour la synthèse des NTCMW utilisés et potentiellement relargués dans le milieu d'exposition des organismes. Ceux-ci ont été décrits pour être une cause possible d'induction d'ERO chez les organismes exposés aux nanotubes de carbone (Elgrabli and Lacroix, 2009). Dans ce but, nous avons analysé par Spectrométrie de Masse à Plasma couplé par induction (ICP-MS) dans les milieux d'exposition, la présence de métaux constitutifs des NTCMW utilisés (Fe, Al et Mo).

Nos expériences étant réalisé dans des conditions statiques, notre attention s'est portée dans un deuxième temps sur les paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition et plus particulièrement sur la concentration en oxygène. En effet, une carence en oxygène dans

le milieu pourrait être une des origines de l'induction d'un stress oxydant et par conséquent d'une production d'ERO (Blokhina et al., 2003). D'autre part, la présence de nanotubes de carbone dans les milieux pourrait induire des modifications des teneurs en oxygène dissous (Fenoglio et al., 2006). Afin de vérifier cette hypothèse des mesures d'oxygène dissous dans l'eau et de pH ont été réalisées sur une durée totale de 24 h et ce en absence ou en présence de larves dans le milieu.

Par ailleurs, au cours de nos expérimentations, un colmatage des branchies par les NTCMW a souvent été observé. Nous avons ainsi suspecté la présence des NTCMW pour être à l'origine d'une perturbation des échanges gazeux. Comme précédemment démonté chez la truite par Smith *et al*., la présence de NTC dans les branchies peut conduire à un déséquilibre de la balance d'oxydoréduction en entrainant une hypoxie (Smith et al., 2007). Cette dernière est définie comme étant une inadéquation entre les besoins tissulaires en oxygène et les apports. L'implication de l'hypoxie dans l'induction du stress oxydant a largement été démontrée dans la littérature (Malek et al., 2001; Row et al., 2003; Zhang and Piantadosi, 1992). Dans le but de vérifier cette hypothèse des observations macroscopiques ont été réalisées sur les larves de xénope, conjointement aux mesures de différents paramètres sanguins dont : la pression partielle en oxygène et en gaz carbonique, le pH ainsi que la teneur en hémoglobine.

En complément de cette étude et dans le but de vérifier une potentielle induction de l'hypoxie en présence de NTCMW dans le milieu, des dosages de l'expression des gènes *hif1-α*, *vegf*, *epo* et *hba1* par RT-PCR quantitative ont été réalisés. HIF1-α (hypoxia inducible factor-1 alpha) assure la médiation des réponses cellulaires à une hypoxie/ischémie en induisant l'expression des gènes d'adaptation tels que *vegf* (facteur de croissance vasculaire endothéliale) (Lemus-Varela et al., 2010; Liu et al., 1995) et *epo* (érythropoïétine) (Lemus-

Varela et al., 2010). Le gène *hba1* est, quant à lui, impliqué dans le transport de l'O_2 des poumons vers les différents organes (Cox et al., 2006)

D'autre part, une attention particulière a également été accordée aux gènes du stress oxydant, de la réparation de l'ADN, de l'apoptose et de l'inflammation, connus pour leur implication dans le mécanisme de toxicité des NTC (Shvedova et al., 2012).

Pour le stress oxydant, notre choix s'est porté sur quatre enzymes clefs de la régulation du stress oxydant à savoir la GR, la CAT, la SOD et la GPX (**chapitre I, paragraphe III.2.3. Systèmes antioxydants**). En ce qui concerne la réparation de l'ADN, les gènes sélectionnés étaient l'ornithine décarboxylase (*odc*) et *rad51*. Ces deux gènes jouent certes un rôle indirecte mais important dans la réparation des dommages à l'ADN. En effet la décarboxylation de l'ornithine est catalysée par l'enzyme ODC et conduit à la synthèse de différentes polyamines. Ces derniers vont jouer un rôle important dans la stabilisation de la structure de l'ADN et la réparation des cassures doubles brins. La protéine RAD51 est, quant à elle, impliquée dans la recombinaison homologue de l'ADN au cours des cassures doubles brins. La mesure de l'expression de ces deux gènes (*odc* et *rad51*) nous permettra ainsi de vérifier les résultats des tests Comètes. La vérification de l'induction d'une apoptose en réponse à une exposition aux NTCMW a été réalisée par la mesure de l'expression des gènes *bax*, *bcl2*, *bcl-xl*, *p53* et du couple *c-fos*/*c-jun*. La famille Bcl2, gouverne la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Elle englobe les gènes pro (*bax*) et anti-apoptotiques (*bcl2*, *bcl-xl*) et participe donc de très près à la régulation de l'apoptose. La Bcl-2–associated X protein (Bax) entre en compétition avec Bcl-2 dans le but de promouvoir une mort cellulaire. Ainsi, alors que la formation de l'homodimère Bax-Bax agit comme inducteur de l'apoptose, l'hétérodimère Bcl2-Bax évoque un signal de survie pour les cellules (Basu and Haldar, 1998). Par ailleurs, les protéines Bax et BCL2 sont des cibles transcriptionnelles du gène *p53*,

impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN (Basu and Haldar, 1998).

La mise en place d'une réponse inflammatoire après exposition des larves de *X. laevis* aux NTCMW bruts a été évaluée par la quantification de l'expression des gènes *lta4h* (leucotriènes A4 hydrolase), *ppar-γ* (récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes) et les cyclo-oxygénases *cox-1*, *cox-2*. Le gène *cox-1* est constitutivement exprimé au sein des cellules, où il assure des fonctions homéostatiques, telles que le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique, la médiation de la fonction plaquettaire normale, et la régulation du débit sanguin rénal (Lj, 1997). Le gène *cox-2* est, quant à lui, inductible et son expression est très souvent associée à une induction de l'inflammation (Horrillo et al., 2007). Les gènes *ppar-γ* et *lta4h* jouent un rôle important dans la métabolisation des acides gras impliqués dans la réponse pro-inflammatoire. En effet, l'enzyme LTA4H permet la synthèse des LTB4 à partir des LTA4. Les LTB4 à leur tour vont agir, au niveau intracellulaire, sur le facteur de transcription nucléaire ppar-γ pour induire certains gènes cibles, dont ceux impliqués dans le processus de la β-oxydation (Funk, 2001).

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus nous permettra de nous orienter vers les voies possibles de l'induction des ERO chez les larves de X. laevis, en présence de NTCMW bruts dans le milieu. L'identification des sources et des conséquences d'une induction d'un stress oxydant nous permettra également de mieux comprendre les mécanismes régissant la toxicité des NTCMW bruts.

II Matériel et méthodes

II.1. Mesure du relargage des métaux par les NTCMW

La mesure de la concentration des métaux (aluminium, fer et molybdène) dans les milieux d'exposition contenant des NTCMW a été réalisée par ICP-MS. Le choix de ces trois métaux a été basé sur la composition du support catalytique utilisé lors de la synthèse des NTCMW (chapitre III, paragraphe II). Les différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L) ont été placées dans des cristallisoirs contenant 2 L d'eau reconstituée (**chapitre II, tableau II.1**). Avant contamination chaque flacon des NTCMW est soniqué (Bioblock 98863, type 570 HF, fréquence 35 KHz) pendant 5 min.

Après 24 h, l'eau contenue dans chaque cristallisoir est récupérée, filtrée (filtre en polypropylène avec une limite de filtration de 0,2 µm), acidifiée avec 3 gouttes de HNO_3 à 69 % (ref : 309079, Sigma, France) puis stockée à 4 °C. Avant chaque analyse, 10 mL de suspension sont récupérés. Un standard interne comprenant 50 µL d'Indium/Rhenium et 300 µL d'HNO_3 à 69 % sont ensuite rajoutés.

L'analyse des éléments traces métalliques (Al, Fe, Mo) a été réalisée par une ICP-MS quadripolaire Agilent 7500ce muni d'une cellule de collision He. La source d'ionisation de l'appareil est constituée par un plasma à couplage inductif générateur-bobine (générateur de fréquence auto ajusté 27 MHz, 1 550 W). L'analyseur est constitué d'un spectromètre de masse quadripolaire permettant de trier les ions selon le rapport masse/charge électrique (résolution ≈ 1 amu). La partie détection est constituée d'un double mode, comptage d'impulsion et analogique (multiplicateur d'électrons). Le temps de comptage est de 0,1 ms pour les éléments majeurs ; 0,3 ms pour les éléments traces et 1,5 s pour les éléments ultra-traces. La cellule de collision gaz He permet d'éliminer une partie des interférences poly-atomiques par discrimination en énergie cinétique (KED). Afin de minimiser les interférences liés aux ions oxydes doublement chargés, les rapports CeO+/Ce+ et Ce++/Ce+ sont contrôlés

et doivent être respectivement inferieurs à 1% et 3%. Les limites de détection typiques sont comprises entre 0,1 et 100 ng/Kg. L'indium et le rhénium sont utilisés comme standard interne afin de corriger la dérive de l'appareil et les éventuels effets de matrices (Viers et al., 2013).

II.2. Localisation des NTCMW dans les larves de Xenopus laevis

Les observations macroscopiques ont été réalisées sur les larves utilisées pour réaliser les tests de Comètes (**chapitre III**). Après chaque prélèvement sanguin (ponction cardiaque), l'aspect général des larves exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts est visualisé à l'aide d'un microscope (Olympus CX41) à un grandissement X4. Après avoir placé les larves sur le dos, des photographies de la partie supérieure (tête et abdomen) ont été prises à l'aide d'une caméra (Olympus E620, body incl. HDL-5).

L'ensemble des observations macroscopiques a été réalisé sur des larves exposées à des concentrations de 0,1 et 1 mg/L de NTCMW bruts pendant une durée de 2, 4, 8 et 24 h et à une concentration de 10 mg/L pendant 24 h.

II.3 Dosages des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition (O_2, pH)

Les mesures du taux d'oxygène dissous en pourcentage de saturation (% st.) et du pH dans les milieux d'exposition ont été réalisées grâce à des sondes multi-paramètres reliées à un boitier d'enregistrement (ODEON PHOTOPOD, versions 5.0.0, SN-ODEOA-1206, Ponsel, France). Avant chaque utilisation les sondes de pH sont calibrées grâce à des tampons à pH 7,01 (PON-PH-AMP-7, Ponsel, France) et 4,01 (PON-PH-AMP-7, Ponsel, France). Pour les sondes à oxygène la calibration a été faite avec l'apport d'un bullage d'oxygène (100 % d'oxygène) ou d'azote (0 % d'oxygène) dans un récipient d'eau. Le principe de mesure du

capteur pH intègre une électrode de référence, utilisée pour les mesures du pH et du potentiel d'oxydation, de type Ag/AgCl à électrolyte gélifié, saturé en KCl «PLASTOGEL»®. Les électrodes de mesure sont sous forme d'ampoule de verre (**figure IV.I**) sensible au pH et soudées à l'extrémité d'un tube de cristal.

Le capteur d'oxygène dissous OPTOD (**figure IV.I**) utilise la technologie de mesure optique par luminescence approuvée par l'ASTM International Method D888-05. Une couche sensible à l'oxygène est éclairée avec une diode émettant une lumière bleue. Le matériel sensible réagit en émettant une lumière rouge (Fluorescence) dont l'intensité et le délai d'émission dépendent de la concentration en Oxygène.



Figure IV.1. *: Boitier et sondes ODEON Ponsel utilisés pour le dosage des paramètres physico chimiques des milieux d'exposition*

Pour nos expériences, des mesures ont été réalisées toutes les dix minutes sur une durée totale de 24 h et cela en présence ou en absence de larves dans les cristallisoirs. Pour chaque condition nous avons testé deux concentrations de NTCMW bruts (1 et 10 mg/L). Un contrôle négatif contenant uniquement de l'eau reconstituée a également été réalisé. A la fin du temps d'exposition les données sont enregistrées sur un boitier (**figure IV.I**). Chaque condition a été réalisée trois fois de façon indépendante.

L'ensemble des données est récupéré à l'aide du logiciel ODEON Viewer Version 1.0.0.4.

II.4. Dosage des paramètres sanguins chez les larves de X. laevis exposées à des NTCMW bruts

Des larves normalement développées au stade 54 (1994) ont été exposées par lot de 20 (n=3) dans des cristallisoirs contenant 2 L d'ER seule (control négatif) ou contenant différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L).

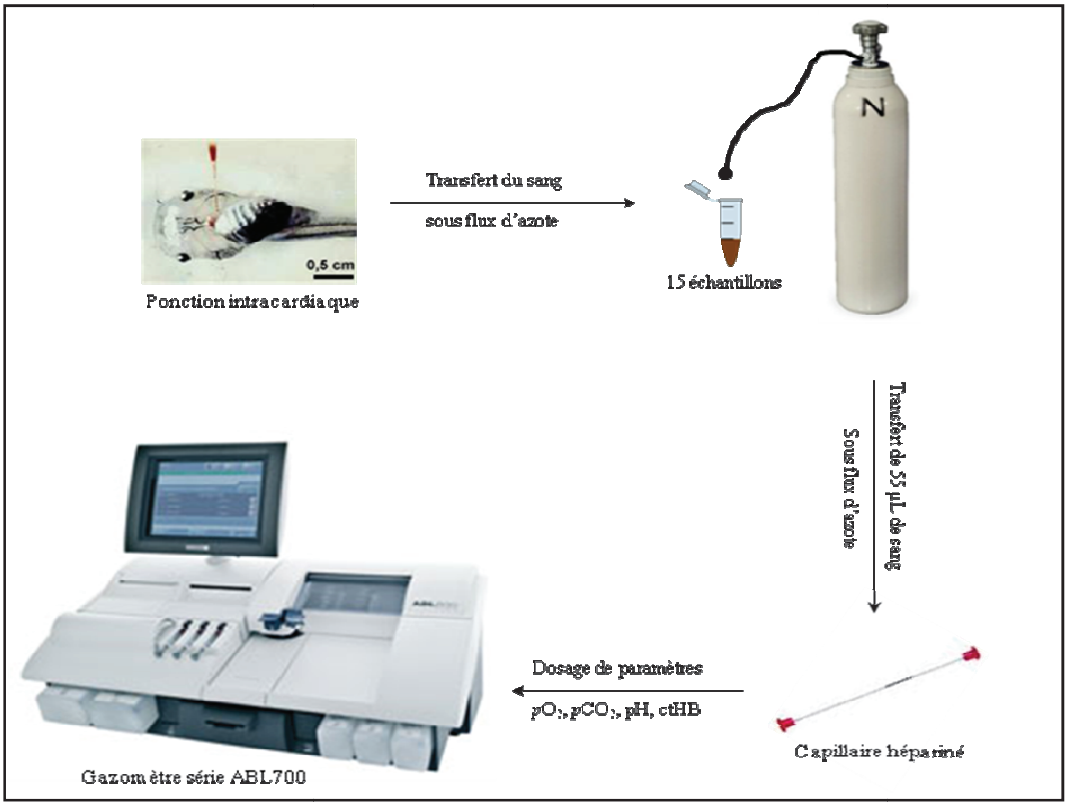

Figure IV.2 *: protocole de mesure des différents paramètres sanguins sur des larves de X. laevis exposées pendant 8 h à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts.*

Après 8 h d'exposition, les larves ont été anesthésiées (sur un lit de glace) puis des ponctions intracardiaques ont été réalisées à l'aide de micropipettes héparinées (solution contenant 10%

d'un extrait à 5000 IU/ml). Afin d'éviter l'oxydation de l'hémoglobine, le sang ponctionné est placé dans un eppendorf stérile sous flux d'azote (**figure IV.2**).

Une fois l'ensemble des animaux ponctionnés, 55 µL de sang sont récupérés dans un micro-capillaire hépariné (clinitubes, D941G-240-55-55µl, RADIOMETER, Danemark). Ces échantillons ont ensuite été utilisés pour la mesure de la pression partielle en oxygène (pO_2), de la pression partielle en gaz carbonique (pCO_2), du pH et de la concentration totale en hémoglobine (*ct*Hb). La mesure de ces différents paramètres sanguins a été réalisée à l'aide d'un gazomètre sanguin (RADIOMETER, série ABL 700) à une température de 37°C avec un temps de lecture de 30 secondes. Ces analyses ont été réalisées au sein du service d'exploration de la fonction respiratoire et médecine du sport (hôpital Larrey, Toulouse).

II.5. Mesure de l'expression de gènes par une technique de RT-PCR quantitative (q RT-PCR) innovante (Fluidigm C1 single cell)

II. 5.1. Principe de mesure

La PCR (réaction en chaine par polymérase) en temps réel, également appelée PCR quantitative, repose sur la détection d'un signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification. La quantification du signal repose sur le concept du « threshold cycle » (Ct), également connu sous le nom de « cycle seuil ». Ce dernier correspond au plus petit nombre de cycles pour lequel l'intensité du signal fluorescent est supérieure au bruit de fond. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (**figure IV.3**):

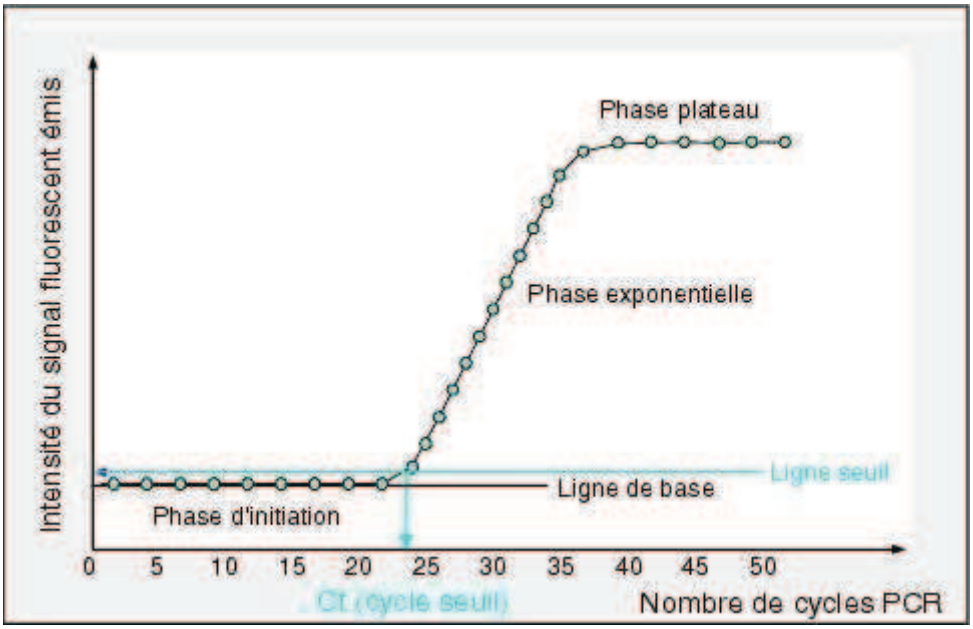

Figure IV.3 *: les phases de la PCR quantitative (http://tpe-therapie-genique.appspot.com)*

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation): certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de l'enzyme Taq polymérase disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

II.5.2. Préparation des échantillons

Vingt larves normalement développées au stade 54 (**chapitre II, figure II.3**) sont exposées pendant une durée de 8 h à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L). À la fin du temps d'exposition, les larves sont anesthésiées puis placées sur un lit de glace. Des ponctions intracardiaques sont ensuite réalisées à l'aide d'une micropipette non héparinée. L'héparine étant un glycosaminoglycane hautement anionique, il pourrait perturber le bon déroulement de la PCR. En effet, les charges négatives de l'héparine pourraient interagir avec les résidus Lysine et Arginine de l'ARN polymérase.

Pour chaque condition d'exposition, 5 larves sont sélectionnées au hasard. L'ensemble du sang ponctionné est transféré dans un seul tube de 1,5 mL (eppendorf) sous un flux d'azote afin d'éviter l'oxydation de l'hémoglobine.

Une fois la totalité du sang ponctionnée, un comptage d'érythrocytes est réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez. En fonction du nombre de cellules obtenues, une dilution à l'aide d'un tampon phosphate (PBS) 10 X est réalisée. La concentration finale obtenue doit contenir entre 500 et 1000 cellules/µL. La solution fille est ensuite placée à 4°C en attendant son utilisation.

II.5.3. Préparation des réactifs

II.5.3.1. Préparation des ARN étalon (ARN spikes)

Les spikes sont des ARN synthétiques utilisé dans le but de vérifier le bon fonctionnement de l'ensemble des étapes de la qPCR.

La solution contenant des ARN spikes est préparée à partir du kit Single-Cell-to-CT (Ambion®, PN 4458237). Trois solutions différentes d'ARN étalon ont été réalisées à partir des tubes 1, 4 et 7 fournis dans le kit. Le contenu de chaque tube est dilué avec un tampon de stockage selon les proportions présentées sur le **tableau IV.1**.

Tableau IV.1 *: Composition de la solution ARN standard*

Tube	A	B	C
Solution de stockage de l'ARN	13,5 µL	12,0 µL	148,5 µl
Etalon ARN	n°7 : 1,5 µL	n°4 : 1,5 µL	n°1 : 1,5 µL

Le contenu du tube A est transféré dans un premier temps dans le tube B. La solution obtenue est ensuite transvasée dans le tube C. Enfin, 1 µL de la solution finale est dilué au centième dans le réactif de dilution C1 DNA.

II.5.3.2. Préparation du pool d'amorces à 500 mM

Après récupération de la séquence de l'ARN messager (ARNm) du gène cible à partir de la base de données Xenbase (www.xenbase.org/entry/), des couples d'amorces sont générés en utilisant le logiciel Primer Blast. Chaque amorce est constitué d'environ 20 bases et est capable de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases sur le brin complémentaire de l'ADN (ADNc) Le pool d'amorces est constitué d'un mélange contenant 2 µL de chaque couple d'amorces (**tableau IV.2**) auxquels sont rajoutés 1 µL de chaque amorce spécifique des ARN spikes et 200 µL du réactif de dilution C1 DNA. Ce mélange est ensuite stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Tableau IV.2 *: Liste des amorces spécifiques des 25 gènes de X. laevis testés (http://www.xenbase.org/entry/)*

Nom du gène	Amorces (5'-3')
bax	CACTGCCTCTCTTGCCATCT[a] CGTTCTCTTGGAGCCTGGT[b]
bcl2	AACCCCATCCACAGTTAGGG[a] GCAACAATCCTTCCCCAGT[b]
bcl-xl	ATGGAGGGCAGCAGTAGAGA[a] ATTGGGTTGGGGATTATTGG[b]
p53	GGTTCGAGTGTGTGCCTG[a] CGCCCCTTAATCCGCAA[b]
c-fos	CTCATGCCGGTGCTGG[a] CTGGGTATGTGAAGACAAATGATGTT[b]
c-jun	TGTGTGCGGGAAGTCCT[a] ACCTAGTGTCTCTAGCAGTTTAACC[b]
gr	GAGGAGAAGGTGGTGGGATT[a] CGGAGGAAGTCGGATGAATA[b]
gpx	CTACCTGACCCTCCCCAAAC[a] TTACCAACACCTGCCCTCA[b]
cat	GAGCAAGCGGAGAGATTCAA[a] AGCACCAGTTTACCCACAGG[b]
sod	ACCCGCAGAACAAGAATCAC[a] TGAACTGAGCAACACCACCT[b]
hba1	CCCTAAGACCAAAACCTACTTTCC[a] GCTTCCAGCAATGTTATCCAA[b]
epo	CACTCCAAACATCCAATACGG[a] TCGTTGACCTCTCTGCTTCC[b]
vegfA	CCACTCCCTGAACCCCTTA[a] GGCTTATGGTCTCCCTCCC[b]
hif 1-alfa	CAGTCTCTTTCGCCATCCAC[a] AACTTGTGCGGCTTCTGTTT[b]
lta4h	TTGTTACCCCAACTGTGCTG[a] GTTTTCCCAGGTTTCATTCG[b]
pparγ	AAAGACGGGGTGCTCGTAG[a] TGAAGTCGGAGAAGGGTTTG[b]
cox1	CCGGAGGAGGTGACCC[a] CTCAGACAATAAAGCCTAGAATCCA[b]
cox2	TCCTGAAAGAGCACACATCC[a] TTATGCCCACCCAGTAATCC[b]
odc	TCAGGAGAGCGGAATGGA[a] GGTCCCAAGGCTAAAGTTGC[b]
rad51	ATTCCTATGCAATGGCCGT GGCGCTTGCCTCCAGTAA[b]
gapdh	ACCCAGAAGACAGTGGATGG[a] CAGTTGAGGCGGGAATAATG[b]

[a] *: amorce anti-sens,* [b] *: amorce sens*

II.5.3.3. Préparation de la solution de lyse (Lysis Mix)

La solution de lyse va permettre la rupture de la paroi cellulaire des érythrocytes et la libération du matériel génétique (ADN). Elle est constituée de 12,75 µL de Single-Cell Lysis Solution (Ambion®), de 4,35 µL de C1 Lysis Plus Reagent (Fluidigm®) et de 0,9 µL de C1 DNA Dilution Reagent (Fluidigm®).

II.5.3.4. Préparation du mix de rétro transcription (RT Final Mix)

Ce mix contient l'ensemble des éléments nécessaires à la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN. Le volume total de cette solution est de 12 µL. Il inclut 1,94 µL de solution stop (Ambion®) composée d'acide sulfurique et utilisé dans le but d'inhiber la réaction entre la peroxydase et le tetramethylbenzidine (TMB). La solution stop permet ainsi le bon déroulement de la rétro-transcription (RT). Le mix RT est également composé de 5,84 µL de tampon d'amplification « Single-Cell VILO RT mix » (Ambion®), de 3,62 µL d'enzyme « Single-Cell SuperScript RT » (Ambion®) et de 0,6 µL de réactif de chargement « C1 Loading Reagent» (Fluidigm®).

II.5.3.5. Préparation de la solution de pré-amplification (PreAmp final mix)

La technologie Fluidigm consiste à travailler sur des cellules uniques. La quantité d'ADNc récupérée est donc très limitée. L'étape de pré-amplification (PreAmp) va par conséquent améliorer la sensibilité de la qRT-PCR en fournissant un nombre plus important d'ADNc. La solution PreAmp contient 12 µL de réactif de pré-amplification « Single-Cell PreAmp Mix » (Ambion®), 42 µL de réactif de dilution « C1 PreAmp » et du pool d'amorces à 500nM (**paragraphe II.5.3.2**)

II.5.3.6. Préparation de la solution de marquage des cellules mortes et vivantes (LIVE/DEAD Cell Staining solution)

Cette solution est utilisée dans le but de marquer les cellules mortes et vivantes et de pouvoir les différencier avec une observation microscopique. Elle est constituée de 625 µL de tampon de lavage C1 Cell (Fluidigm), de 1,25 µL de d'Etidium homodimer-1 (Life Technology) et de 0,63 µL de Calcéine AM (Life Technology). L'Etidium homodimer-1 va permettre la coloration des cellules en rouge si ces dernières sont perméables. La calcéine, quant à elle, va mettre en évidence les cellules vivantes qui seront marquées en vert.

II.5.4. Préparation de la puce C1

Il existe différentes tailles de puces C1 : les « Small » utilisées pour les cellules ayant un diamètre de 5-10 µm, les « Medium » pour les cellules de 10-17 µm et enfin les « Large », utilisées pour les cellules ayant une taille moyenne de 17-25 µm. Le choix de la puce est donc dépendant à la taille des cellules étudiées. Dans le cadre de nos essais, la détermination de la taille des érythrocytes de larves de *X. laevis* par le logiciel « Image J » nous a permis de mettre en évidence des cellules ayant un diamètre moyen d'environ 20 µm. nous avons par conséquent choisit d'utiliser des puce C1 « Large » (Fluidigm, PN 100-5758).

II.5.4.1. Pré-remplissage de la puce

Une étape de préparation de la puce C1 est nécessaire avant le démarrage de chaque expérience. Elle consiste à placer 200 µL de réactif de récolte (C1 Harvest Reagent) dans les accumulateurs marqués avec un cercle rouge et 20 µL dans les puits entourés d'un carré rouge (**figure IV.4**). 20 µL de réactif de pré-chargement et de tampon de lavage sont injectés

respectivement dans le puits #2 et les puits #5 et #6. Enfin 15 µL de réactif de blocage sont placés dans les puits marqués avec un cercle blanc (**figure IV.4**).

Une fois tous les puits remplis, la puce est placée dans l'appareil. Un system de pressurisation/dépressurisation va permettre l'injection des différents réactifs dans les différents canaux qui composent la puce C1. Cette étape dure environs 10 min.

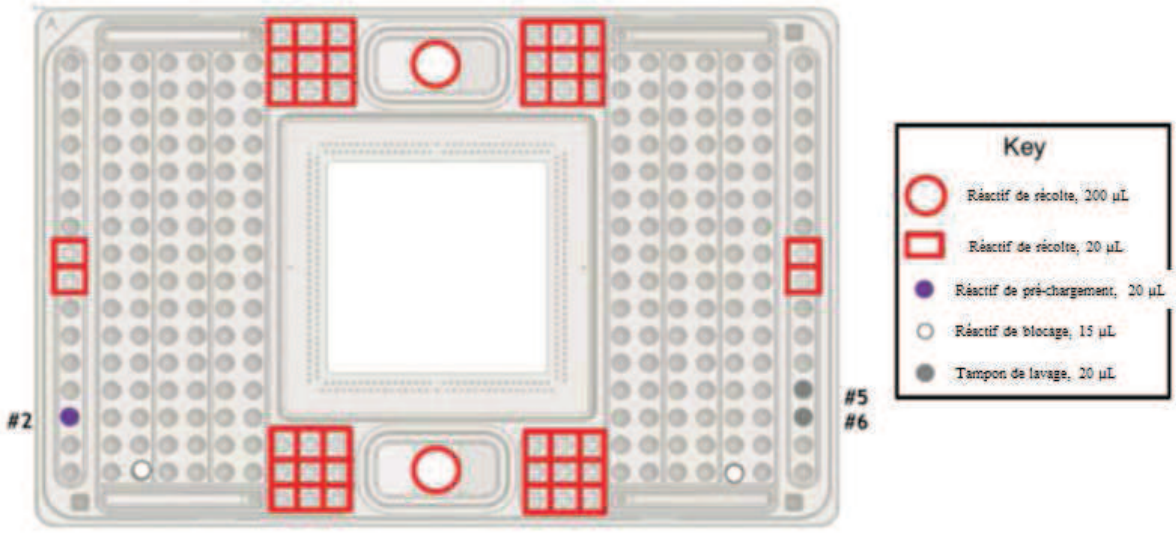

Figure IV.4 *: Représentation schématique de la puce* C_1^{TM} *Single-Cell et des emplacements de pré-remplissage*

II.5.4.2. Préparation des cellules (Cell Mix)

Un volume total de 10 µL est injecté dans chaque puce. Ce dernier inclut 4 µL de réactif de suspension cellulaire et 6 µL d'érythrocytes de larves de *xénopes* exposées pendant 8 h à différentes concentrations de NTCMW bruts (0,1 ; 1 et 10 mg/L). Le nombre de cellules injectées doit être compris entre 500 et 700 cellules. Pour obtenir cette concentration, un comptage d'érythrocytes sur cellule de Malassez est réalisé pour chaque concentration de

NTCMW testée. La concentration cellulaire est ensuite ajustée par dilution des échantillons sanguins avec du PBS 1 X.

II.5.4.3. Chargement des cellules

Cette étape va permettre d'introduire les cellules érythrocytaires au sein de la puce C1. Ces cellules sont ensuite séparées dans les 96 chambres individuelles (**figure IV.5**).

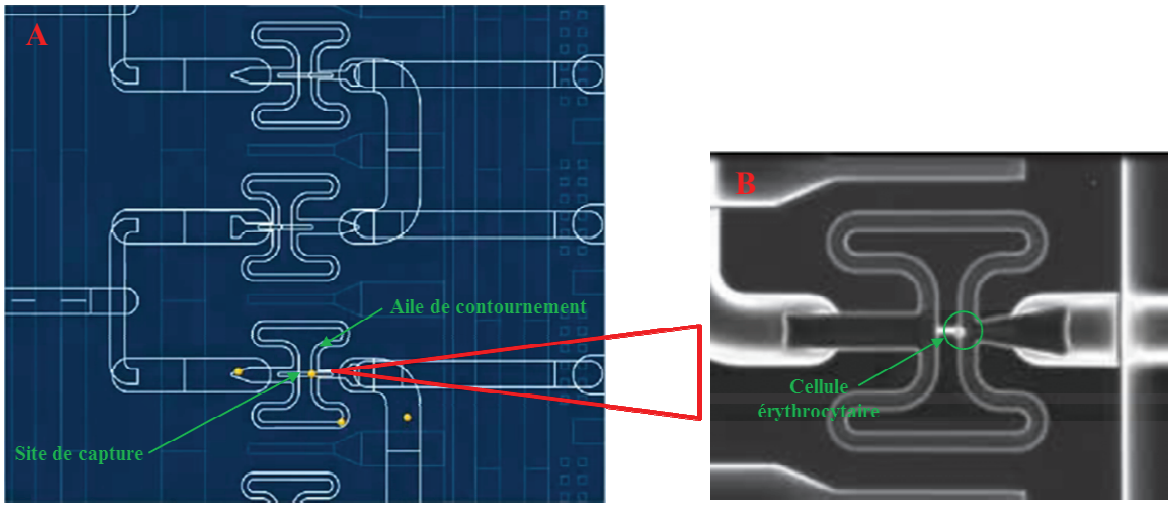

Figure IV.5 : *Représentation schématique de la structure des chambres réactionnelles d'une puce* C_1^{TM}*. (A) vue générale, (B) observation microscopique (x10) d'une chambre réactionnelle contenant une cellule érythrocytaire de X. laevis.*

Sous l'effet d'une pression, les cellules vont se déplacer une par une au sein des canaux selon un motif en serpentin et vont être piégées au niveau des sites de capture (**figure IV.5.A**). Une fois que le site de capture est occupé, les cellules suivantes continuent leur déplacement à travers les ailes de contournement pour se fixer au niveau d'autres sites de capture.

A la fin de cette première étape, des observations microscopiques (Zeiss Axio, Observer. Z1) sont réalisées à un agrandissement X100, afin de vérifier la présence/l'absence de cellules érythrocytaires de *X. laevis* au niveau des 96 emplacements que compte la puce C1. Des prises d'images en phase de fluorescence verte et rouges sont également réalisées afin de vérifier respectivement, la viabilité et l'intégrité membranaire des cellules.

II.5.4.4. Lyse, retro-transcription (RT) et pré-amplification sur puce C1

Après les observations microscopiques, et la localisation des cellules au niveau des chambres réactionnelles, la puce C1 est placée au sein de l'appareil Fluidigm. Une étape de lyse est alors initialisée. Les cellules bloquées au niveau des différents sites de capture vont être mises au contact d'une solution de lyse (**paragraphe II.5.3.3**) pour libérer ainsi leur matériel génétique.

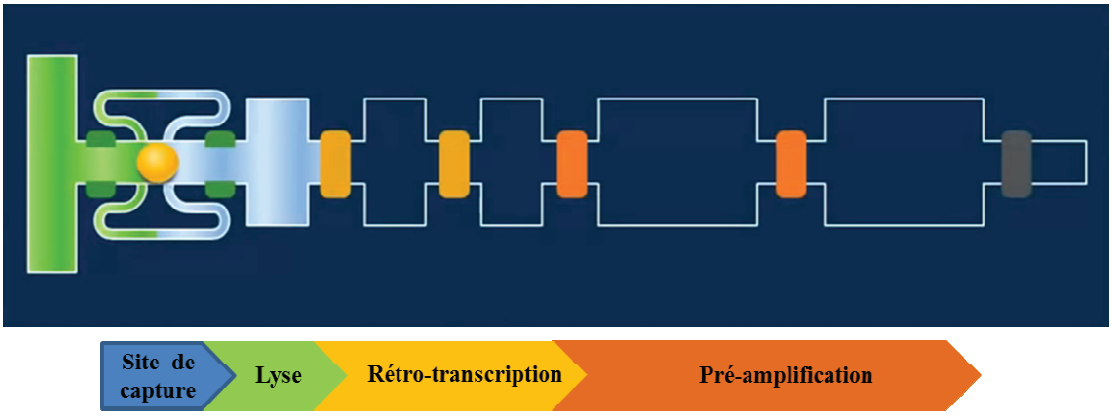

Figure IV.6 : *représentation schématique des différentes chambres réactionnelles de la puce C1 et des étapes successives permettant l'obtention de l'ADNc.*

Le réactif de retro-transcription est ensuite injecté et mélangé avec chaque lysat cellulaire grâce à des pompes péristaltiques. Cette étape va permettre la synthèse d'ADNc à partir des ARNm. Une fois cette étape achevée, une pré-amplification est initialisée afin d'obtenir une quantité initiale suffisante d'ADNc pour la suite de l'expérience. Cette dernière étape est thermo-cyclée. Elle comporte un cycle d'activation de 10 minutes à 95°C suivie par 18 cycles d'amplification à 95°C pendant 15 seconde et à 60°C pendant 4 minutes.

II.5.4.5. Récupération des produits pré-amplifiés

A la fin de chaque amplification, les puces C1 sont récupérées. 3 µL de produits pré-amplifiés sont prélevés dans un volume de 25 µL de réactif de dilution C1 DNA et répartis sur une plaque de 96 puits. Cette dernière est ensuite stockée à -20°C pour une utilisation ultérieure.

II.5.5. Préparation des tubes contrôles

Pour chaque concentration de NTCMW testée une RT-PCR contrôle est parallèlement réalisée en utilisant les ARN spikes (paragraphe 1.5.3.1). Cette dernière va permettre de vérifier le bon fonctionnement de la puce C1. La RT-PCR contrôle est réalisé dans une thermo-cycler et inclut les mêmes étapes que la puce C1, à savoir une lyse, une rétro-transcription et une pré-amplification.

II.5.5.1. Lyse et RT

Une partie des cellules issues du Cell Mix (**voir paragraphe II.5.4.2**) sont récupérées, puis centrifugées à 300 g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite aspiré et le culot est suspendu dans un même volume de tampon de lavage « C1 Cell Wash buffer ». 1 µL de cellules lavées (contrôle positif) ou de tampon de lavage (contrôle négatif) a ensuite été

additionné à 2 µL de solution de Lyse (lysis mix). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 2 µL de RT mix sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermo-cycler (Veriti®Thermal Cycler) où ils vont être incubés pendant 10 minutes à 25°C. Une étape de rétro-transcription de 60 min à 42°C ainsi qu'une inactivation de 5 minutes à 85 °C sont ensuite réalisés.

II.5.5.2. Pré-amplification

Cette étape est réalisée dans une solution contenant 0,35 µL de produit de rétro transcription auxquelles sont rajoutés 3,33 µL de mix de pré-amplification. Ce mélange réactionnel est ensuite placé dans un thermo cycler (Veriti® 96-Well Fast) où il va subir les mêmes étapes de pré-amplification que les échantillons : un cycle d'activation de 10 minutes à 95°C et 18 cycles d'amplification de 15 secondes à 95°C et de 4 minutes à 40°C. Dans l'attente de leur récupération les échantillons sont maintenus à une température de 10°C.

II.5.5.3. Dilution et dénaturation

1 µL de chaque produit de préamplification est dilué dans 99 µL de réactif de dilution « C1 DNA Dilution Reagent ». Cette solution est ensuite incubée pendant 10 min à 95 °C afin de dénaturer l'enzyme de pré-amplification, puis stockée à -20°C jusqu'à son utilisation.

II.5.6. Quantification de l'expression des gènes cibles par le système BioMark

II.5.6.1. Préparation des échantillons (Sample Pre-Mix)

La composition de cette solution est présentée sur le **tableau IV.3**. Le mélange réactionnel inclut une enzyme d'amplification (TaqMan), et un marqueur de l'ADN amplifié (EvaGreen).

80 µL de la solution obtenue sont réparties dans une plaque de 96 puits (Dutsher, 016680) à raison de 6 µL par puits. 2 µL de chaque ADNc dilué au cinquième ont été distribués dans les 96 puits. La plaque est ensuite centrifugée pendant 2 minutes à 2000 rpm.

Tableau IV.3 *: Composition du Pre-Mix Sample pour puce BioMark*

Composition	Volume (µL)
2X TaqMan Gene Expression Master mix (Lifetech, 4369510)	440
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm, 100-0388)	44
20X EvaGreen (Interchim, BI1790)	44
TE low EDTA (10 mM Tris, pH 8 ; 0,1 mM EDTA)	132

II.5.6.2. Préparation des amorces (Primer Pre-Mix)

La solution d'amorces est composée de 440 µL de réactif de chargement (2X Assay Loading Reagent) et de 220 µL de TE low EDTA. Comme dans le cas des échantillons, la solution est répartie dans une plaque de 96 puits à raison de 6 µL par puit. 2 µL d'amorces préalablement préparées (**paragraphe II.5.3.2**) et diluées à 20 µM sont ensuite rajoutées. La préparation des amorces est achevée par une centrifugation de 2 minutes à 2000 rpm.

II.5.6.3. Chargement de la plaque

Le chargement de la plaque s'effectue par le remplissage d'un côté de la plaque (Gene Expression Dynamic Array, Fluidigm, BMK-M-96.96) avec 5 µL du mix cDNA. L'autre côté de la plaque est, quant à lui, chargé avec 5 µL du mix d'amorces.

II.5.7. Exploitation des résultats

L'ensemble des données obtenues ont été analysés grâce au logiciel SINGuLAR TM Analysis Toolset (PN 100-5066 B1). Ce dernier est une source commune, permettant d'analyser les données d'expression génique de cellules individualisées, générées sur la technologie Fluidigm. Il est composé de plusieurs ressources de développement de logiciel, incluant les scripts R. La quantification relative du niveau d'expression de chaque gène a été normalisée par rapport au gène de référence *gapdh* grâce au calcul du delta Ct (Δ Ct) à partir de l'équation suivante :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{control endogène (gapdh)}}$$

Etant donné que nous ne disposons pas d'un même nombre de mesures pour chaque gène, nous avons choisi de représenter nos résultats par des boites à moustaches. Ces dernières incluent une valeur médiane (permettant de séparer l'ensemble des valeurs en deux parties égales), un premier quartile (séparation de 25% des données inferieures) et un troisième quartile (séparation de 25 % des données supérieures). Nous avons également représenté sur les graphiques, les valeurs maximales et minimales obtenues.

II.6. Traitement statistique des données

En ce qui concerne les résultats de l'ICP-MS et du dosage des paramètres sanguins, les données sont représentées par la moyenne ± écart-type. Les données ont été comparées grâce au test de Student (*t*-test) après vérification de la normalité (test Shapiro) et de l'égalité des variances (test Fisher). Une différence supérieure à 5 % (p<0,05) entre deux moyennes est considérée comme étant statistiquement significative.

Pour les données de RT-PCR quantitative, la comparaison entre la population contrôle (témoins négatifs) et la population exposée à différentes concentrations de NTCMW (1 et 10 mg/L) a été réalisée grâce au test de Wilcoxon. La normalité et la distribution avait été

vérifiée grâce au test Shapiro qui a indiqué une distribution anormale des données. Le niveau de significativité choisi était de cinq pour cent ($p < 0,05$).

L'ensemble des calculs statistiques ont été réalisés par le logiciel R® (R Development core Team, 2012).

III. Résultats

III.1. Evaluation du relargage des métaux par les NTCMW dans le milieu d'exposition

Les résultats d'analyse de la concentration en métaux utilisés pour la synthèse des NTCMW (Al, Fe, Mo) et pouvant se retrouver dans le milieu d'exposition sont représentés dans le **tableau IV.4**.

Tableau IV.4*: concentration en métaux dans l'eau reconstituée après 24 h.*

	CTRL	MW 0.1	MW 1	MW 10
Al	30.7 ± 1.2 [a]	32.1 ± 0.3 [a]	32.4 ± 0.4 [a]	31.8 ± 0.7 [a]
Fe	0.6 ± 0.2 [a]	0.6 ± 0.1 [a]	0.6 ± 0.3 [a]	0.6 ± 0.1 [a]
Mo	0.2 ± 0.02 [a]	0.2 ± 0.03 [a]	0.5 ± 0.02 [b]	2.6 ± 0.04 [c]

Concentrations des métaux relargués après 24 h dans de l'eau reconstituée contenant 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts (MW 0,1 ; MW1 et MW10, respectivement) en comparaison avec le contrôle négatif (CTRL), mesurées par ICP-MS. Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types de trois répétitions, les concentrations sont exprimées en µg/L.

Les valeurs d'une même rangée suivies par des lettres différentes, diffèrent de façon significative (P <0,05) par rapport au contrôle négatif.

Les résultats obtenus ne montrent aucun relargage significatif de l'aluminium (Al) et du fer (Fe) dans le milieu d'exposition en comparaison avec le contrôle négatif, et ce pour toute les concentrations de NTCMW testées (p>0,05). Une augmentation significative mais relativement faible de la concentration en Molybdène (Mo) a toutefois été observée dans les milieux contenant 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts (0,5 ± 0,02 et 2,6 ± 0,04 µg/L respectivement), en comparaison avec les contrôles négatifs (0,2 ± 0,02 µg/L).

III.2. Détection de la présence de NTCMW chez les larves de *X. laevis*

Les observations microscopiques de larves exposées à des concentrations de 0,1 ; 1 mg/L de NTCMW bruts pendant 2, 4, 8 et 24 h sont représentées sur les **figures IV.7 et IV.8**.

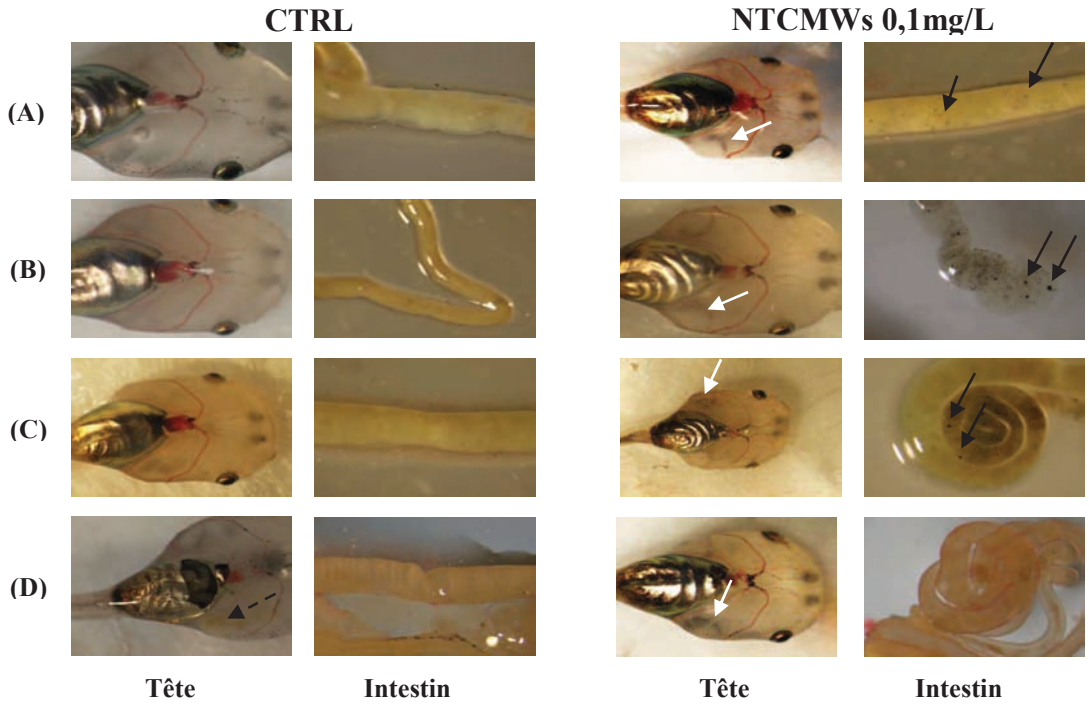

Figure IV.7 : *Observations macroscopiques de la tête et de l'intestin de larves de xénope exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW pendant 2 (A), 4 (B), 8 (C) et 24 h (D) en comparaison avec les témoins négatifs (CTRL). Les flèches noires en pointillés indiquent la présence de masses brunes de nourriture (Tetraphyll réduit en poudre) dans les branchies après 24 h d'exposition. Les flèches blanches indiquent la présence de masses noires suspectées pour être des agglomérats de NTCMW dans les branchies. Les flèches noires indiquent la présence de masses noires suspectées pour être des agglomérats de NTCMW dans l'intestin.*

Sur la **figure IV.7**, on peut observer la présence de masses brunes aussi bien dans les branchies que dans l'intestin après 24 h d'exposition des larves témoins (**figure IV.7.D**). Chez les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW, la présence de masses noires a été observée à partir de 2 h d'exposition dans les branchies et l'intestin. La quantité de ces masses noires suspectées pour être des particules de carbone augmente ensuite dans le temps puis diminue considérablement pour ne plus être visible dans l'intestin au bout de 24 h d'exposition (**figure IV.7.D**). Dans les branchies, une accumulation des masses noires est observée dans le temps et atteint son maximum après 24 h d'exposition. Ces masses noires ne doivent cependant pas être confondues avec la pigmentation naturelle des larves de *X. laevis*.

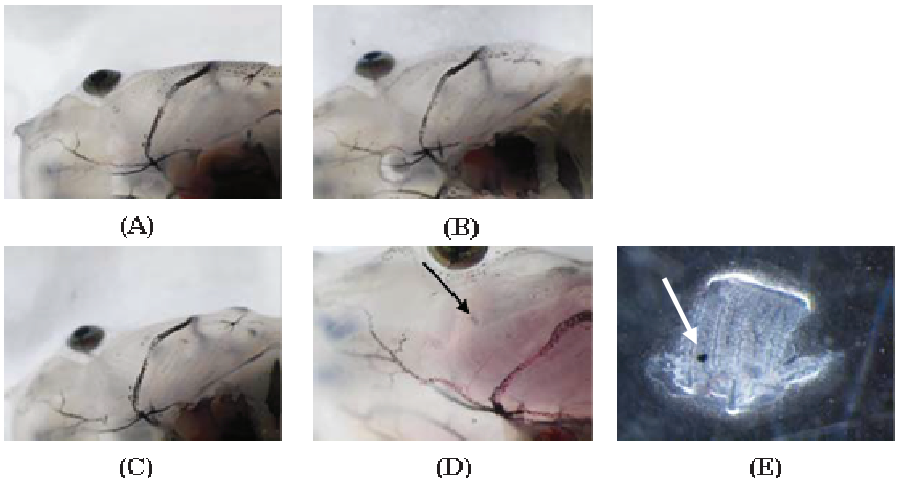

Figure IV.8 : *Observations macroscopiques de la zone branchiale de larves de xénope exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW pendant 2 (A), 4 (B), 8 (C) et 24 h (D). La flèche noire indique la présence probable d'agglomérats de NTCMW dans les branchies après 24 h d'exposition.*

(E) Observation macroscopique de l'arc branchial après sa dissection à partir d'une larve exposée pendant 24 h à une concentration de 1 mg/L de NTCMW. La flèche blanche indique la présence probable d'agglomérats de NTCMW dans le tissu brachial.

La présence de NTCMW a également été constatée grâce à des observations microscopiques réalisées sur des larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW pendant 2, 4, 8 et 24 h (**figure IV.8**). On peut observer chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L de NTCMW pendant 24 h, la présence d'une tache noire au niveau de la zone branchiale suspectée pour être un agglomérat de NTCMW (**figure IV.8.D**). Ces agglomérats étaient également présents lors d'observations microscopiques de l'arc branchial de larves exposées aux NTCMW pendant 24 h (**figure IV.8.E**).

III.3. Impact des NTCMW bruts sur les paramètres sanguins (pO_2, pCO_2, pH et ctHb) des larves de *X. laevis*

Les résultats du dosage des différents paramètres sanguins (pO_2, pCO_2, pH et ctHb) sont présentés dans le **tableau IV.5**.

Les données obtenues montrent une diminution significative de la pression partielle en oxygène (pO_2) en fonction de la concentration des NTCMW. En effet, plus cette dernière est élevée, moins importante est la pO_2 des échantillons sanguins. En ce qui concerne la pression partielle en gaz carbonique, un effet contraire est observé. Ainsi la pCO_2 des larves exposées aux NTC augmente avec la concentration en NTCMW dans le milieu d'exposition. Les pCO_2 étaient de 10,6 ± 0,9 ; 11,6 ± 1,4 et 12,9 ± 0,6 mmHg pour les concentrations respectives de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW. En comparaison avec les contrôles négatifs (9,9 ± 0,6 mmHg), l'augmentation n'était significative que pour la plus forte concentration d'exposition en NTCMW (10 mg/L).

Nous pouvons par ailleurs observer que l'augmentation de la concentration des NTCMW dans les milieux d'exposition est accompagnée d'une légère diminution du pH ($p<0,05$) des échantillons sanguins des larves de *X. laevis*.

Tableau IV.5 : *différents paramètres sanguins chez les larves de de X. laevis exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts.*

Paramètres mesurés	CTRL	MW 0,1	MW 1	MW10
pO_2 (mmHg)	$79,6 \pm 1,4^a$	$76,8 \pm 0,3^a$	$68,1 \pm 3,6^b$	$60,5 \pm 4,1^c$
pCO_2 (mmHg)	$9,9 \pm 0,6^a$	$10,6 \pm 0,9^a$	$11,6 \pm 1,4^a$	$12,9 \pm 0,6^b$
pH	$7,5 \pm 0,03^a$	$7,2 \pm 0,01^a$	$7,0 \pm 0,1^b$	$6,8 \pm 0,1^c$
ctHb (g/dL)	$0,6 \pm 0,1^a$	$0,7 \pm 0,2^a$	$0,9 \pm 0,3^a$	$1,1 \pm 0,4^b$

Variation des paramètres sanguins chez des larves de X. laevis au stade 54, exposées pendant 8 h à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts.

Les valeurs d'une même rangée suivies par des lettres différentes, diffèrent de façon significative (P <0,05) par rapport au contrôle négatif.

pO_2 : pression partielle en oxygène, pCO_2 : pression partielle en gaz carbonique, pH : acidité du sang, ctHb : Concentration total de l'hémoglobine dans le sang.

CTRL : contrôle négatif, MW 0,1, MW 1 et MW 10 : larves exposées à une concentration de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts respectivement.

Comme pour la pCO_2, l'impact des NTCMW ne devient significatif que pour la concentration la plus élevée (10 mg/L) en comparaison avec le contrôle (6,8 ± 0,1 vs. 7,5 ± 0,03).

La mesure de la concentration totale en hémoglobine des échantillons sanguins indique une augmentation significative des valeurs à partir de la concentration de 10 mg/L de NTCMW dans le milieu d'exposition (1,1 ± 0,4 g/dL) en comparaison avec ceux composés d'eau reconstituée seule (0,6 ±0,1 g/dL).

III.4.Détermination des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition

Les résultats du dosage des paramètres physico-chimiques du milieu d'exposition (pourcentage d'oxygène dissous et pH) sont représentés sur la **figure IV.9**.

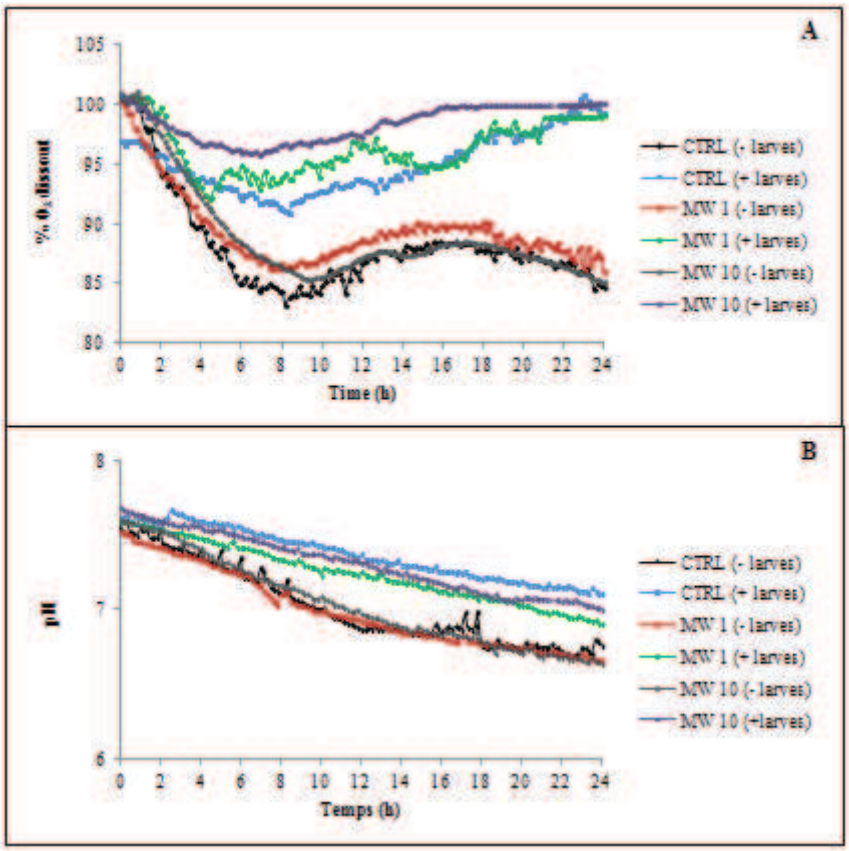

Figure IV.9 : *Variations des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition contenant 1 ou 10 mg/L de NTCMW bruts en comparaison avec le contrôle négatif, en absence ou en présence de larves.(A) pourcentage d'oxygène dissous dans l'eau, (B) potentiel hydrogène du milieu.*

Les mesures ont été réalisées sur une durée totale de 24 h (1440 minutes) avec des enregistrements des différents paramètres toutes les 10 minutes.

CTRL : contrôle negatif, MW 1 : milieu contenant 1 mg/L de NTCMW bruts, MW 10 : milieu contenant 10 mg/L de NTCMW bruts.

« -larves/ +larves» : absence/ présence de larves de xénope dans le milieu d'exposition

La mesure du pourcentage d'oxygène dissous dans les différents milieux d'exposition (**figue IV.9.A**) a permis de mettre en évidence une diminution de la concentration en oxygène au cours du temps aussi bien en absence qu'en présence de larves durant les quatre premières heures d'exposition. La concentration en oxygène se stabilise ensuite vers 8 h pour remonter au niveau initial dans les milieux contenant les larves (99,21 %, 98,99% et 99,97%, pour des concentrations respectives en NTCMW de 0, 1 et 10 mg/L,). En absence de larves, les teneurs en O_2 dissous diminuent jusqu'à 8 h pour atteindre des valeurs basales de 83,7 %, 86,4 % et 86,1 % dans les cristallisoirs contenant 0,1 et 10 mg/L de NTCMW, respectivement. Les valeurs ré-augmentent ensuite pour atteindre un maximum à 17 h autour de valeurs moyennes de 86,9; 87,2 et 88,5 % pour des concentrations respectives en NTCMW de 0, 1 et 10 mg/L.

Les résultats obtenus concernant les mesures du pH sont représentés sur la **figure IV.9.B**. Le pH de départ des solutions est d'environ 7,6 ± 0,05 unités. En absence de larves, les résultats montrent une diminution constante du pH sur une durée de 24 h. En absence en ou présence de NTCMW dans le milieu, une valeur moyenne de 6,8 ± 0,02 unités est atteinte à la fin du temps d'exposition. En présence de larves dans le milieu et quel que soit la concentration en NTCMW testée, la diminution du pH est identique et atteint après 24 h des valeurs de 7,1 ; 6,9 et 7 unités pour des concentrations respectives en NTCMW bruts de 0, 1 et 10 mg/L.

III.5. Analyse de l'expression de gènes dans les érythrocytes de larves de *X. laevis* par qRT-PCR

L'expression de différents gènes obtenus par RT-PCR quantitative, sur des érythrocytes de larves de *X. laevis* isolés, exposées durant 8 h à différentes concentrations de NTCMW bruts (0, 1 et 10 mg/L) sont représentés sur la **figure IV.10**.

Le dosage de l'expression des gènes pro-apoptotiques (*bax, p53, c-fos et c-jun*) montre une surexpression liée à la concentration en NTCMW. A l'exception du gène *c-jun*, seuls les animaux exposés à 10 mg/L de NTCMW ont montré une différence significative avec les contrôles négatifs. Au contraire les gènes anti-apoptotiques (*bcl-2 et bcl-xl*) ont montré une répression significative pour toutes les concentrations testées (**figure IV.10.A**). L'impact des NTCMW sur l'induction des gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant a été évalué par la mesure de l'expression des gènes *gr*, *gpx*, *sod* et *cat*. Les résultats obtenues (**figure IV.10.B**) montrent une expression différente en fonction de la concentration de NTCMW dans le milieu. Ainsi les gènes *gr, gpx* et *cat* sont significativement induits à 1 et 10 mg/L de NTCMW, avec une réponse plus importante à la plus faible concentration en NTCMW (1 mg/L). Le gène *sod* a, quant à lui, montré une surexpression significative à seulement 10 mg/L de NTCMW.

Afin de confirmer les résultats du test Comète (**chapitre III**), nous avons mesuré l'expression des gènes *rad51* et *odc*. Les résultats montrent une induction trois fois plus importante que les contrôles négatifs chez les animaux exposés à 1 mg/L de NTCMW (p<0,05). Aucune différence significative n'a toutefois été observée pour des concentrations en NTCMW de 10 mg/L (**figure IV.10.C**).

L'évaluation d'une probable mise en place d'une réponse inflammatoire suite à une exposition des larves aux NTCMW a été réalisée. L'expression des gènes *cox-1*, *lta4h* et *pparγ* a été mesurée. Les données obtenues indiquent une surexpression dose dépendante des gènes *lta4h* et *pparγ*. Cette dernière n'était toutefois significative que pour des concentrations d'exposition de 10 mg/L de NTCMW. Par ailleurs aucune différence d'expression n'a été observée pour le gène *cox-1* quel que soit la concentration en NTC dans le milieu (**figure IV.10.C**).

L'hypothèse d'une éventuelle perturbation des échanges gazeux par les NTCMW a été vérifiée par la mesure de l'expression des gènes *hif1-α*, *epo*, *vegf* et *hba1*. L'apparition tardive de la courbe de dissociation pour les gènes *vegf* et *hba1* ne nous a pas permis de calculer l'efficacité de la PCR. Ces gènes ont donc été exclus de notre analyse. Pour les gènes *epo* et *hif1-α* impliqués respectivement dans la synthèse de l'hémoglobine et la réponse à l'hypoxie, une surexpression dose dépendante et significative pour la plus forte concentration en NTCMW (10 mg/L) a été mesurée (**figure IV.10.E**).

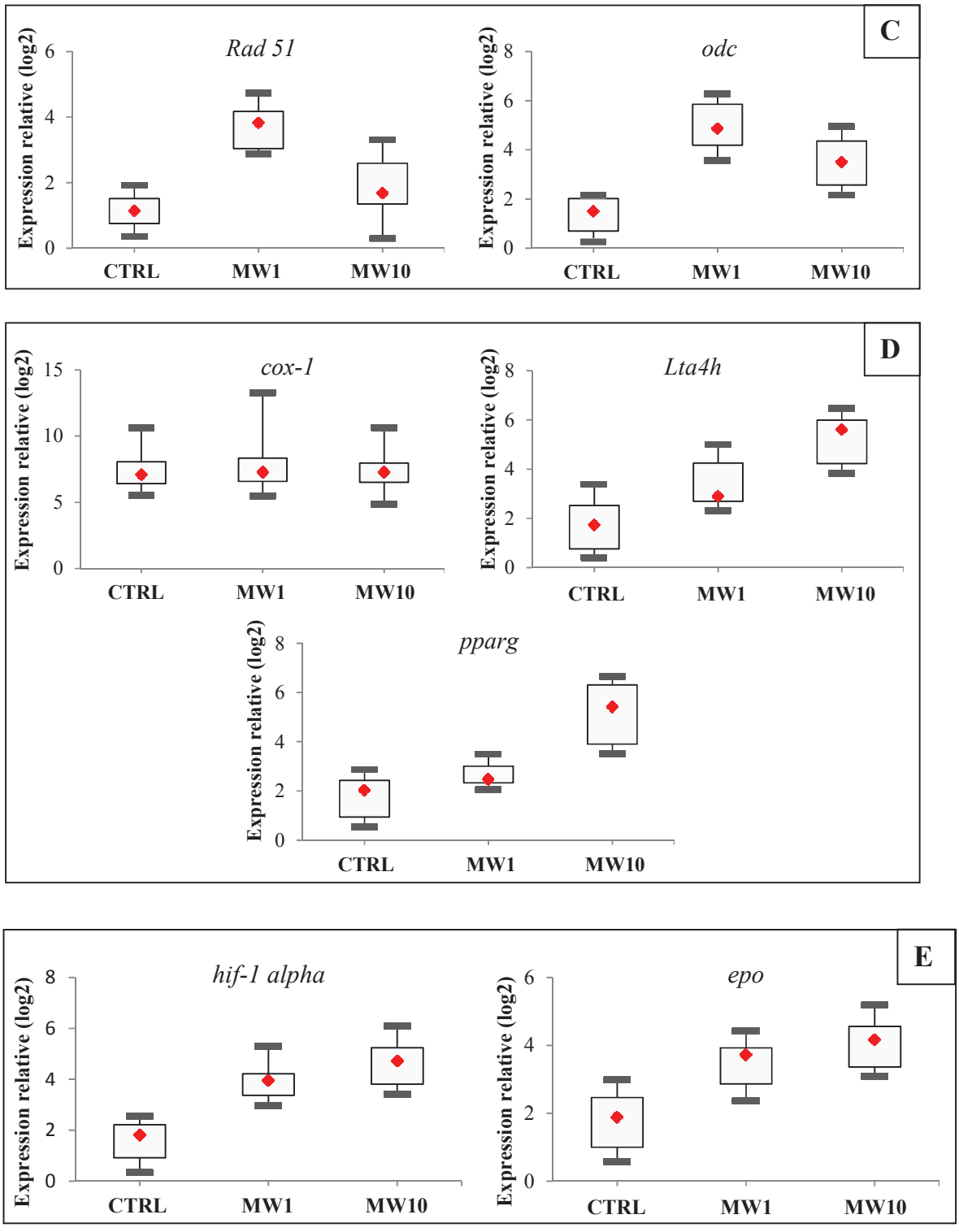

Figure IV.10. *Expression relative de gènes de réponse à l'apoptose (A), au stress oxydant (B), aux dommages à l'ADN (C), à la réponse inflammatoire (D) et à l'hypoxie (E) dans les cellules érythrocytaires de larves de X. laevis, exposées à des concentrations de 1 mg/L (MW1) et 10 mg/L (MW10) de NTCMW bruts.*

IV. Discussion

Dans le chapitre précédent, nous avions démontré qu'une exposition des larves de *X. laevis* à différentes concentrations de NTCMW bruts était à l'origine d'une induction d'un stress oxydant. L'implication des métaux catalytiques utilisés pour la synthèse des NTCMW (Al, Fe, Mo) nous est apparue de prime abord comme une des voies possibles de l'induction d'ERO et par conséquent comme une des causes principales du déséquilibre du système redox dans le cas de nos expérimentations. Plusieurs travaux ont en effet démontré une étroite relation entre la présence de traces métalliques et l'induction d'un stress oxydant (Pulskamp et al., 2007; Shvedova et al., 2012).

Les résultats des dosages de métaux par ICP-MS nous ont permis de mettre en évidence l'absence de relargage significatif d'Aluminium et de Fer dans les milieux d'exposition après une durée de 24 h (**tableau IV.4**). Cependant de très faibles concentrations de Mo (2,6 ± 0,04 µg/L) ont été mesurées dans les milieux contenant 10 mg/L de NTCMW. Ces concentrations ne semblent toutefois pas impliquées dans l'induction des activités enzymatiques observée. En effet, les concentrations présentes dans les milieux sont trop faibles pour avoir un effet significatif. De plus, certains travaux ont même pu démontrer l'action anti-oxydante du Mo (Gatto and Bezjak, 2003; XIAO et al., 2010). Les métaux issus des catalyseurs de synthèse des NTCMW bruts ne semblent donc pas être impliqués dans l'induction d'un stress oxydant dans nos conditions expérimentales. Afin de comléter cette étude, il serait cependant interessant d'évaluer les niveaux de métallothionéines (MT) chez les larves de xénopes exposées aux NTCMW. En effet, les MT sont identifiées comme des antioxydants directs de part leur capacité à capturer les radicaux hydroxyles $OH^{\cdot}$ et peroxydes O_2^{-} (Vioareng, 1989). De plus, le zinc libéré par l'oxydation de la MT est un antioxydant puissant et permetterait de stabiliser les membranes endommagées (Powell, 2000).

Les voies d'entrées des contaminants dans les larves de *X. laevis* sont multiples, nous pouvons citer la voie cutanée et notamment les téguments, les branchies et la voie digestive. En effet, en plus d'être détritivores (Bury and Whelan, 1984), les larves de *X. laevis* ont une respiration branchiale et une alimentation microphagique, conduisant à une forte ingestion de particules en suspension (Wassersug, 1975). Ces derniers englobent essentiellement des particules alimentaires susceptibles de se lier aux NTCMW. Ces particules peuvent également s'associer à des composantes biologiques tel que le mucus, dont elles stimulent la sécrétion (Smith et al., 2007). Les observations macroscopiques des larves de *X. laevis*, exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts semblent indiquer la présence d'agglomérats de nanotubes dans les villosités intestinales et les branchies. Ces masses apparaissent associées aux particules alimentaires présentes à la surface des branchies et dans les intestins (**figure IV.8**). Ces masses sont observables à la binoculaire aux trois concentrations de NTCMW testées. Toutefois les agglomérats observés au niveau de l'intestin des larves de xénopes exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW, visibles à 2, 4, et 8 h (**figure IV.7**), finissent ensuite par être éliminés pour ne plus être observés à la fin du temps d'exposition (24 h). Ces résultats laissent penser que les organismes sont capables d'expulser ces particules. Toutefois, la résolution d'une loupe binoculaire reste limitée et les NTC doivent être suffisamment agglomérés pour être visibles au microscope. Les branchies et l'intestin ont déjà été décrits comme une voie d'entrée des NTC après une exposition des larves de *X. laevis* à des NTCMW sur de longues durées. (Bourdiol et al., 2013; Nigam and Schewe, 2000). Cependant, malgré l'utilisation d'outils spécifiques de microscopie (MET, spectroscopie Raman), il n'a pu être démontré à ce jour aucune présence de NTC dans les anthérocytes, les hépatocytes, les cellules branchiales et sanguine.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les NTC pourraient pénétrer dans les corbeilles branchiales et induire des perturbations des échanges gazeux. Ces perturbations pourraient

être à l'origine d'une hypoxie plus ou moins passagère et par conséquent à l'origine du stress oxydant (Lushchak, 2011; Tiedke et al., 2014) dont l'induction provoquerait des dommages à l'ADN, de la peroxydation des lipides et l'induction des enzymes anti-oxydantes (**voir chapitre III**).

Afin de déterminer si une exposition des larves aux nanotubes de carbone était à l'origine d'un stress hypoxique, nous avons mesurés dans le sang des larves, les variations de la pression partielle en O_2, en CO_2, du pH ainsi que le taux d'hémoglobine dans les érythrocytes. Les observations macroscopiques des larves à la binoculaire avaient montré une accumulation maximale des NTCMW à 8 h. Nous avions donc choisit de mesurer l'ensemble des paramètres sanguins après 8 h d'exposition aux NTCMW bruts.

La mesure des paramètres sanguins a permis de mettre en évidence une perturbation des échanges gazeux chez les larves de *X. laevis* exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts pendant une durée de 8 h. Ainsi une diminution significative de la pression partielle en oxygène (pO_2) observée à partir de 1 mg/L de NTCMW tant à confirmer notre hypothèse. De plus, l'augmentation de la pCO_2 accompagnée d'une baisse significative du pH à 10 mg/L renforce cette hypothèse. Enfin, l'augmentation du taux d'hémoglobine dans le sang des larves exposées à 1mg/L et qui devient significative à 10 mg/L; permet de conclure à l'induction d'une hypoxie, s'aggravant à 10 mg/L. Ce phénomène semble fortement corrélé à la perturbation des échanges gazeux dû au colmatage des branchies par les NTCMW bruts.
Ces résultats semblent également être en accord avec ceux de Smith *et al*., (Smith et al., 2007), qui a pu observer une augmentation de la consommation en oxygène de truites (*Oncorhynchus mykiss)* exposées à des NTC. Cette augmentation du taux d'oxygénation a été attribuée à la présence de NTC associé à une surproduction de mucus au niveau des branchies. Une augmentation de la consommation en oxygène est très souvent associée à l'incapacité de l'organisme à amener suffisamment d'oxygène vers les différents organes. Afin de compenser

la carence en oxygène dans le sang, l'organisme a besoin d'un nombre plus important de globules rouges, pouvant ainsi justifier l'augmentation de la ctHB observée chez les larves de xénope exposées aux NTCMW. L'hémoglobine va donc permettre la fixation du dioxyde d'oxygène et son transport vers l'ensemble des organes, comblant ainsi les carences en O_2 de l'organisme.

En plus de diminuer la pO_2, une carence respiratoire peut être à l'origine d'une incapacité de l'organisme à éliminer efficacement le CO_2 et entraine par conséquent une augmentation de la pCO_2 (El-Minawi et al., 1981). Le gaz carbonique diffusant mieux que l'oxygène à travers les membranes alvéolaires des poumons (Baud, 2003), son épuration est plus facile. Cela entraine un maintien plus long de la pCO_2 à des taux normaux (Bonnaud, 2012). L'absence d'augmentation significative de la pCO_2 chez les larves de *X. laevis*, exposées à des concentrations de 0,1 et 1 mg/L de NTCMW pourrait être expliquée par ce phénomène. Une augmentation non compensée de la pCO_2 va à son tour être à l'origine d'une acidification du sang par un apport important d'ions H^+ qui se traduit par une diminution du pH (Gosselin, 2010). Chez l'ensemble des êtres vivants, le pH est régulé par plusieurs mécanismes qui sont régis par l'équation suivante : $HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2O + CO_2$. En condition normales, les poumons éliminent l'excès d'acides carbonique (HCO_3^-) par hyperventilation, permettant ainsi le rejet de CO_2 et d'eau. Une carence respiratoire entraine, quant à elle, une accumulation de CO_2 dans le sang provocant une acidose. Les résultats que nous avons obtenus aux plus fortes concentrations testées mettent en évidence ce phénomène. Des études antérieures, menées par Mouchet *et al*., (Mouchet et al., 2010) avaient montré qu'une exposition de larves de xénope à des NTCMW n'induisait pas de mortalité significative à 10 mg/L. Cependant, à cette concentration les auteurs avaient observé un effet sur la croissance des animaux après 12 jours d'expositions. L'ensemble de ces résultats tant à montrer la capacité des larves de *X. laevis* à s'adapter aux conditions de stress. Ainsi, même si une forte hypoxie est constatée à 8 h, les

organismes peuvent mettre en place des systèmes d'adaptations permettant de limiter les effets délétères. Il semblerait que ces organismes soient capables par des mouvements branchiaux d'évacuer, à certains moments, tout ou une partie des NTCMW présents dans leurs corbeilles branchiales. Ce phénomène de « chasse » conduirait à passer transitoirement d'un état d'hypoxie à un état d'oxygénation. Ce phénomène pourrait se rapprocher des processus d'ischémie et être à l'origine d'un renforcement du stress oxydatif. En effet, des travaux réalisés sur différentes espèces ont montré que la ré-oxygénation d'un tissu après une période d'anoxie induisait un fort stress oxydant (Hung and Burton, 2006; Lushchak et al., 2001; Vogt et al., 1998).

Il a été reporté dans la littérature que les nanotubes de carbone pouvaient être utilisés comme catalyseurs dans la réduction de l'oxygène (Jukk et al., 2012; Li et al., 2012). Leur présence dans le milieu d'exposition pourrait aussi être à l'origine d'une diminution du taux d'oxygène et par conséquent d'une acidification de ce milieu. Cette perturbation renforcerait le stress hypoxique et obligerait les larves à aller chercher plus souvent l'O_2 à la surface de l'eau (Wassersug and Feder, 1983). Ainsi, l'hypoxie mesurée, pourrait être aussi associée à un appauvrissement du milieu d'exposition en oxygène. Afin de vérifier cette hypothèse, des dosages d'O_2 dissous et de pH ont étés réalisés dans les différents milieux d'exposition en présence ou en absence de NTCMW. Les résultats obtenus montrent une diminution plus au moins importante du pourcentage d'O_2 dissous et du pH en fonction des conditions expérimentales. Toutefois l'absence de différence significative entre les milieux contrôle et ceux contenant des NTCMW ne semble pas confirmer notre hypothèse. Les résultats montrent aussi que la présence de larves, tant à accroitre l'oxygénation du milieu independament de la présence de nanotubes. Les mouvements continus des larves dans la colonne d'eau pourraient ainsi participer à la ré-oxygénation du milieu par un phénomène de brassage.

Rappelons également que la température a un impact direct sur la quantité d'oxygène dissous (loi de Dalton) (Clark et al., 1954). Dans le cadre de nos essais, les cristallisoirs ont été maintenus dans des chambres thermostatées, excluant ainsi toute implication de ce paramètre dans les variations du pourcentage d'oxygène dans les milieux d'exposition.

L'exploration des effets génétiques des NTCMW bruts au niveau des érythrocytes des larves nous a permis de confirmer un certain nombre de résultats concernant l'induction du stress oxydant et des dommages à l'ADN (**chapitre III**) mais aussi de vérifier l'hypothèse du stress hypoxique. En effet, comme pour les dosages biochimiques, l'analyse de l'expression des gènes par qRT-PCR a permis de mettre en évidence une induction dose dépendante des enzymes du stress oxydant (GR, CAT et SOD). De plus, contrairement aux analyses spectrophotomètriques, la quantification des transcrits a montré une augmentation significative de l'expression du gène de la GR (*gr)* chez les animaux exposés à une concentration de 10 mg/L de NTCMW. Comme attendu, un profil d'expression similaire a été observé entre les gènes *gr et gpx*. En effet, ces derniers agissent ensemble pour permettre la détoxification des ERO (Pastore et al., 2003; Saria et al., 2014). Des travaux précédents avaient déjà pu montrer une surexpression du gène codant pour la protéine GPx après une exposition aux NTCMW (Chou et al., 2008).

L'ADN représente une cible privilégiée d'oxydations par les ERO. Les réactions d'oxydation de l'ADN créent un grand nombre de dommages de l'ADN que nous avions pu observer grâce au test des Comètes (**chapitre III**). La mesure de l'expression des gènes *rad51* et *odc* ont permis d'observer une augmentation importante des transcrits chez les larves exposées à la concentration de 1 mg/L. Cette surexpression semble aller dans le sens des résultats du test Comète. En effet, la protéine RAD51 est capable d'interagir avec PALB2 et BRCA2, deux protéines jouant un rôle important dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (Rodrigue, 2011). D'autre part, le gène *odc* joue également un rôle indirect dans la réparation

des cassures à l'ADN par sa capacité à catalyser la décarboxylation de l'ornithine. Cette réaction est la première étape de synthèse des polyamines, nécessaires à la stabilisation des molécules d'ADN. Une carence de la protéine ODC peut en effet provoquer une induction d'apoptose générée par une trop grande induction de dommages à l'ADN (Pendeville et al., 2001). A 10 mg/L de NTCMW, une induction moins importante des gènes *rad51* (p>0,05) et *odc* (p<0,05) a été mesurée. En nous basant sur les résultats précédents nous pouvons émettre l'hypothèse d'une induction plus précoce de ces gènes. En plus des processus de réparation, les dommages à l'ADN peuvent être à l'origine d'une induction d'apoptose (Yuan and Yankner, 2000). Chez les larves de xénopes exposées à 1 mg/L de NTCMW brut une corrélation entre l'expression des gènes de réparation de l'ADN et des gènes impliqués dans la réponse apoptotique (*bax* et *p53*) a été observée. Classiquement, les cellules présentant des dommages à l'ADN bloquent leur différenciation au niveau de la phase G2, également connu sous le nom de point de contrôle (Mouchet et al., 2006). Si les dommages à l'ADN ne sont pas réparés, la cellule initie alors un processus d'apoptose (Cejka et al., 2003). Les gènes *bax* et *p53* jouent un rôle important dans l'activation de cette apoptose. En effet, l'induction du gène *bax* se fait essentiellement *via* le facteur de transcription P53 (Basu and Haldar, 1998). Alors que la formation de l'homodimère Bax-Bax entraine une induction de l'apoptose, l'hétérodimère Bax-Bcl2 indique un signal de survie à la cellule (Basu and Haldar, 1998).

Le gène *c-fos* code pour une protéine capable de former un hétérodimère avec C-JUN. La dimérisation de ces deux protéines forme le complexe transcriptionnel AP-1. Ce dernier permet une régulation positive ou négative de la mort cellulaire programmée (Liebermann et al., 1998). Le facteur de transcription AP-1 est aussi impliqué dans l'activation des gènes contrôlant les processus inflammatoires (Hf et al., 1991). L'activation du complexe AP-1 par des nanotubes de carbones simples et multi-parois a été observée *in vitro* dans des études

réalisées sur des cellules épithéliales pulmonaires de rat (Ravichandran et al., 2010) et des cellules mésothéliales humaines (Pacurari et al., 2008; Ravichandran et al., 2010).

Les observations macroscopiques (**figure IV.7 et IV.8**) et le dosage des paramètres sanguins (**tableau IV.5**) chez les larves de *X. laevis* exposées aux NTCMW semblent clairement indiquer que ces derniers sont à l'origine du colmatage des branchies responsable du stress hypoxique. Afin de confirmer ce processus et notamment conforter l'augmentation d'hémoglobine observée par le dosage direct de cette protéine sanguine, un dosage de l'expression des gènes *vegf*, *hba1*, *hif1-α* et *epo* a été réalisé. Les résultats obtenus semblent être en corrélation avec les données des paramètres sanguins. En effet, une induction dose dépendante a été observée pour les gènes *hif1-α* et *epo*. En absence d'oxygène, la protéine HIF1–α va induire l'expression de gènes d'adaptation tels que *vegf* et *epo* (Lemus-Varela et al., 2010; Y. Liu et al., 1995). L'activation de l'hormone érythropoïétine va permettre, entre autre, une stimulation de l'érythropoïèse et à terme l'augmentation du nombre d'érythrocytes circulants. L'apparition tardive de la courbe de fusion des gènes *hba1* et *vegf* ne nous a pas permis de calculer une efficacité correcte. Ces gènes ont donc étés exclus de notre analyse.

L'induction d'une réponse inflammatoire représente également une des conséquences du stress oxydant. L'impact d'une exposition des larves de xénope aux NTCMW bruts sur l'induction de l'inflammation a été évalué par la mesure de l'expression des gènes *lta4h*, *cox-1*, *cox-2 et pparγ.* Les résultats obtenus montrent, comme dans le cas des enzymes du stress oxydant, une induction dose dépendante des gènes *lta4h* (leucotriènes-A4 hydrolase) et *pparγ* (Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes). Cette expression n'est toutefois significative que pour des concentrations d'exposition en NTCMW de 10 mg/L. Sans surprise, l'analyses de l'expression du gène *cox-1* n'a montré aucune différence significative entre les larves témoins et ceux exposées aux NTCMW (1 et 10 mg/L). L'expression du gène *cox-2* n'a quant à elle pas pu être mesurée.

Dans la littérature, il a largement été reporté que la peroxydation des lipides était à l'origine d'une stimulation de l'enzyme PLA2 (phospholipase A_2) (Nigam and Schewe, 2000). L'activation de cette dernière entraine la libération de l'acide arachidonique qui peut être métabolisé soit en leucotriènes par les lipoxygénases (LOX), ou en prostaglandines par les cyclooxygénases (COX) (Funk, 2001; Jakobsson et al., 1995; Scott et al., 2010; T. Wang et al., 2006). Il existe deux isoformes de COX, de même poids moléculaire et avec environ 60% de similitude. COX-1 est physiologiquement exprimée de façon constitutive. COX-2 est au contraire inductible par des agents pro-inflammatoires (*eg*. Les cytokines) (Lee et al., 1992). Dans le cadre de nos essais seule l'expression du gène *cox-1* a pu être mesurée. L'induction de la synthèse de prostaglandines ne peut donc être confirmée. Au contraire, la surexpression du gène *lta4h* peut indiquer une augmentation de la synthèse de leucotriènes B_4 (LTB4) à partir de leucotriènes A_4 (LTA4) (**figure I.10, Chapitre I**). L'implication des LTB4 dans la réponse à une exposition aux NTC a déjà été mise en évidence *in vivo* chez les souris et les hamsters (Nemmar et al., 2009; Sukhija, 2011). Les LTB4 exercent un puissant chimiotactisme positif pour les neutrophiles, susceptible de provoquer la formation de dérivés réactifs de l'oxygène et la libération de lysosomes par ces cellules. Les leucotriènes B_4 sont également capables d'activer la famille des récepteurs PPAR. En effet, les LTB4 peuvent se fixer sur PPARα, qui va à son tour réguler la dégradation des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés, y compris les LTB4 (Murakami et al., 1999). PPAR-γ, l'autre membre de la famille PPAR est un régulateur important du métabolisme des lipides et du glucose mais aussi un régulateur négatif des gènes liés au processus d'inflammation (Huizar et al., 2013). L'implication des NTC dans l'induction d'une réponse inflammatoire a largement été décrite dans la littérature (Bhattacharya et al., 2013). Le gène *ppar-γ* semble jouer un rôle important dans la régulation des médiateurs de l'inflammation. En effet, la mutation de ce gène chez des souris exposées aux NTCMW est à l'origine d'une forte accumulation de cytokines. Nous

pouvons donc supposer que l'exposition des larves de xénope aux NTCMW bruts peut induire la mise en place d'un système de défense par l'intermédiaire d'un processus inflammatoire. Ce dernier ne se manifeste toutefois de manière importante que sur les larves de xénopes exposées à la plus forte concentration de NTCMW testée (10 mg/L).

V. Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus dans ce chapitre indiquent que les catalyseurs métalliques constitutifs des NTCMW utilisés dans nos essais, ne semblent pas être à l'origine du stress oxydant observé chez les larves de *X. laevis*, ou du moins qu'ils n'y participent pas de manière significative.

De même la mesure des paramètres physico-chimiques des milieux d'exposition a permis d'écarter l'hypothèse d'un stress anoxique issu d'une carence en oxygène des milieux d'exposition. L'observation de masses de NTCMW, agglomerées au niveau des branchies ainsi que la perturbation des paramètres sanguins (diminution de la pO_2 et augmentation de la pCO_2 et augmentation de ctHb) chez les larves de *X. laevis* exposées aux NTCMW indique clairement l'induction d'un état d'hypoxie d'autant plus importante que la concentration en NTCMW est élevée. Ceci a été confirmé grâce à la mesure de l'expression de *hif1-alpha* et *epo*, deux gènes connus pour leur implication dans la réponse à une carence en oxygène induite par l'hypoxie. Le colmatage des branchies apparait donc comme une piste majeure dans la compréhension du mécanisme de toxicité des NTCMW chez les larves de xénope.

L'analyse de l'expression des gènes par qRT-PCR a permis de confirmer les résultats des analyses biochimiques (induction des enzymes du stress oxydant) et du test des Comètes (induction de dommages à l'ADN), raportés dans le chapitre III de cette thèse. En plus de valider les résultats précédents, l'analyse de l'expression génique à l'échelle des érythrocytes

nous a permis d'orienter nos recherches vers d'autres mécanismes de défense mais aussi de toxicité associés à l'exposition des larves à des NTCMW. Les résultats de qRT-PCR montrent d'une part que ces NTCMW affectent les processus inflammatoires impliqués dans la réponse immunitaire, ce qui laisse penser que des animaux ainsi exposés pourraient présenter des réponses perturbées à des agressions par différents types de pathogène. D'autre part, les analyses mettent en évidence une induction de l'apoptose notamment pour la plus forte concentration testée, ce qui confirme aussi la diminution de la viabilité des érythrocytes de xénopes exposés à 10 mg/L (Saria et al., 2014). Enfin, et d'un point de vue technologique, il est important de souligner que la faible quantité de sang nécessaire au dosage de l'expression des gènes et le nombre important de réplicats possibles, fait de la qRT-PCR Fluidigm C1 single cell, une des méthodes les plus appropriées pour l'analyse transcriptomique globale chez les larves de xénope et mérite d'être développée et approfondie.

Références bibliographiques

Basu, A., Haldar, S., **1998**. The relationship between BcI2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. 4, 1099–1109.

Baud L., **2003**. Les échanges gazeux alveolo-capillaires. Faculté de Médecin de Saint-Antoine, Université Pierre et Marie CURIE, Paris.

Bhattacharya, K., Andón, F.T., El-Sayed, R., Fadeel, B., **2013**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliver Rev*. 65, 2087–2097.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., **2003**. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. Ann Bot. 91, 179–194.

Bonnaud, G., **2012**. Pneumocourlancy, maladies respiratoires. Polyclinique de Courlancy, Reims.

Bourdiol, F., **2013a**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., **2013**. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. *Carbon*. 54, 175–191.

Bury, R.B., Whelan, J.A., **1984**. Ecology and management of the bullfrog. Resour. Publ. 155, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. p23.

Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A.M., Heinimann, K., Cannavó, E., Di Pietro, M., Marra, G., Jiricny, J., **2003**. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *Embo J*. 22, 2245–2254.

Chou, C.C., Hsiao, H.Y., Hong, Q.S., Chen, C.H., Peng, Y.W., Chen, H.W., Yang, P.C., **2008**. Single-Walled Carbon Nanotubes Can Induce Pulmonary Injury in Mouse Model. *Nano Lett*. 8, 437–445.

Clark, A.M., Din, F., Robb, J., **1954**. The Liquid-Vapour Equilibrium of the Binary System Argon/Oxygen. Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 221, 517–534.

Cox, L.A., Schlabritz-Loutsevitch, N., Hubbard, G.B., Nijland, M.J., McDonald, T.J., Nathanielsz, P.W., **2006**. Gene expression profile differences in left and right liver lobes from mid-gestation fetal baboons: a cautionary tale. *J Physiol.* 572, 59–66.

Elgrabli, D., Lacroix, G., **2009**. Toxicité des nanoparticules : cas des nanotubes de carbone. Actes du 8e Congrès International Pluridisciplinaire QUALITA 2009.

El-Minawi, M.F., Wahbi, O., El-Bagouri, I.S., Sharawi, M., El-Mallah, S.Y., **1981**. Physiologic changes during CO2 and N2O pneumoperitoneum in diagnostic laparoscopy. A comparative study. *J Reprod Med*. 26, 338–346.

Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., Fubini, B., **2006.** Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?. *Free Radic. Biol Med*. 40, 1227–1233.

Funk, C.D., **2001**. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294, 1871–1875.

Gatto, V.J., Bezjak, Y.L., **2003**. The antioxidant properties of organomolybdenum compounds in engine oils. *Tribol Lubr Technol*. 59, 40–47.

Gosselin, P., **2010**. Les gaz du sang ou l'analyse de l'état acido-basique.

Horrillo, R., Planagumà, A., González-Périz, A., Ferré, N., Titos, E., Miquel, R., López-Parra, M., Masferrer, J.L., Arroyo, V., Clària, J., **2007**. Comparative Protection against Liver Inflammation and Fibrosis by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor and a Nonredox-Type 5-Lipoxygenase Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 323, 778–786.

Huizar, I., Malur, A., Patel, J., McPeek, M., Dobbs, L., Wingard, C., Barna, B.P., Thomassen, M.J., **2013**. The role of PPARγ in carbon nanotube-elicited granulomatous lung inflammation. *Respir Res*. 14, 7.

Hung, T.H., Burton, G.J., **2006**. Hypoxia and Reoxygenation: a Possible Mechanism for Placental Oxidative Stress in Preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gyne*. 45, 189–200.

Jakobsson, P.J., Larsson, P., Feltenmark, S., Odlander, B., Runarsson, G., Björkholm, M., Claesson, H.E., **1995**. The 5-lipoxygenase pathway in normal and malignant human B lymphocytes. *Adv. Prostag Thromb L*. 23, 293–298.

Jukk, K., Alexeyeva, N., Johans, C., Kontturi, K., Tammeveski, K., **2012**. Oxygen reduction on Pd nanoparticle/multi-walled carbon nanotube composites. *J Electroanal Chem*. 666, 67–75.

Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., Hwang, D., **1992**. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 267, 25934–25938.

Lemus-Varela, M.L., Flores-Soto, M.E., Cervantes-Munguía, R., Torres-Mendoza, B.M.G., Gudiño-Cabrera, G., Chaparro-Huerta, V., Ortuño-Sahagún, D., Beas-Zárate, C., **2010**. Expression of HIF-1 alpha, VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hypoxia. *Clin Biochem*. 43, 234–239.

Li, Y., Zhou, W., Wang, H., Xie, L., Liang, Y., Wei, F., Idrobo, J.-C., Pennycook, S.J., Dai, H., **2012**. An oxygen reduction electrocatalyst based on carbon nanotube-graphene complexes. *Nat Nano*. 7, 394–400.

Liebermann, D.A., Gregory, B., Hoffman, B., **1998**. AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *Int J. Oncol*. 12, 685–700.

Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S., **1995**. Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells Identification of a 5′ Enhancer. *Circ Res*. 77, 638–643.

Lj, C., **1997**. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*. 49, 15–19.

Lushchak, V.I., **2011**. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*. 101, 13–30.

Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., **2001**. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish Carassius auratus during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol- Reg I*. 280, R100–R107.

Malek, A., Sager, R., Schneider, H., **2001**. Effect of Hypoxia, Oxidative Stress and Lipopolysaccharides on the Release of Prostaglandins and Cytokines from Human Term Placental Explants. *Placenta*. 22, Supplement A, 45–50.

Mouchet, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Cuenot, Y., Bourdineaud, J.P., Boudou, A., Gauthier, L., **2006**. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in Xenopus laevis larvae. *Aquat Toxicol*. 78, 157–166.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK*. 5, 963–974.

Murakami, K., Ide, T., Suzuki, M., Mochizuki, T., Kadowaki, T., **1999**. Evidence for direct binding of fatty acids and eicosanoids to human peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 260, 609–613.

Nemmar, A., Dhanasekaran, S., Yasin, J., Ba-Omar, H., Fahim, M.A., Kazzam, E.E., Ali, B.H., **2009**. Evaluation of the direct systemic and cardiopulmonary effects of diesel particles in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology*, Annual Congress of The British Toxicology Society. 262, 50–56.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., **1994**. Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Pub, New York.

Nigam, S., Schewe, T., **2000**. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1488, 167–181.

Pacurari, M., Yin, X.J., Zhao, J., Ding, M., Leonard, S.S., Schwegler-Berry, D., Ducatman, B.S., Sbarra, D., Hoover, M.D., Castranova, V., Vallyathan, V., **2008**. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect*. 116, 1211–1217.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., **2003**. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*.333, 19–39.

Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J.C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J.A., Cleveland, J.L., **2001**. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol*. 21, 6549–6558.

Pulskamp, K., Diabaté, S., Krug, H.F., **2007**. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett*. 168, 58–74.

R Development Core Team, 2012. R development Core Team. R : A Language and Environment for statistical Computing, 3-900051-07-0R Fondation for Statistical Computing, Vienna, Austria (**2012**).

Ravichandran, P., Baluchamy, S., Sadanandan, B., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., Hall, J.C., Ramesh, G.T., **2010**. Multiwalled carbon nanotubes activate NF-κB and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis*. 15, 1507–1516.

Rodrigue, A., **2011**. Rôles des paralogues de RAD51 humains dans la recombinaison homologue et le maintien de la stabilité du génome en mitose. [Thèse], Université Laval.

Row, B.W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L., Gozal, D., **2003**. Intermittent Hypoxia Is Associated with Oxidative Stress and Spatial Learning Deficits in the Rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 167, 1548–1553.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Scott, K.F., Sajinovic, M., Hein, J., Nixdorf, S., Galettis, P., Liauw, W., De Souza, P., Dong, Q., Graham, G.G., Russell, P.J., **2010**. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. *Biochimie*. 92, 601–610.

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E., **2012**. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 261, 121–133.

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., **2007**. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*. 82, 94–109.

Sukhija, H., **2011**. Inhaled Single Walled Carbon Nanotubes induce Pulmonary Inflammation in Hamsters with an Increase in 5-Lipoxygenase and Leukotriene B4 Levels. [Thèse], School of pharmacy, St John's University, New York.

Tiedke, J., Thiel, R., Burmester, T., **2014**. Molecular Response of Estuarine Fish to Hypoxia: A Comparative Study with Ruffe and Flounder from Field and Laboratory. PLoS ONE 9, e90778.

Viers, J., Prokushkin, A.S., Pokrovsky, O.S., Auda, Y., Kirdyanov, A.V., Beaulieu, E.,Zouiten, C., Oliva, P., Dupré, B., **2013**. Seasonal and spatial variability of elemental concentrations in boreal forest larch foliage of Central Siberia on continuous permafrost. *Biogeochemistry*. 113, 435–449.

Vogt, M., Bauer, M.K.A., Ferrari, D., Schulze-Osthoff, K., **1998**. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Letters*. 429, 67–72.

Wang, T., Xu, J., Yu, X., Yang, R., Han, Z.C., **2006**. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 58, 1–14.

Wassersug, R. J., Feder, M.E., **1983**. The effects of aquatic oxygen concentration, body size and respiratory behaviour on the stamina of obligate aquatic (Bufo americanus) and facultative air-breathing (Xenopus laevis and Rana berlandieri) anuran larvae. *J Exp Biol*. 105, 173–190.

Wassersug, R.J., **1975**. The Adaptive Significance of the Tadpole Stage with Comments on the Maintenance of Complex Life Cycles in Anurans. *Amer Zool*. 15, 405–417.

Xiao, J., YANG, F., CUI, H., PENG, X., CUI, W., CHENG, A., CHEN, T., BAI, C., **2010**. Effect of High Molybdenum on the Antioxidant′ s Function of Liver and Spleen in Broilers. *Chinese J An Vet Sci*. 7, 018.

Yang-Yen, H.F., Zhang, X.K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M., Pfahl, M., 1991. Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol*. 3, 1206–1219.

Yuan, J., Yankner, B.A., **2000**. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407, 802–809. Zhang, J., Piantadosi, C.A., **1992**. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest*. 90, 1193–1199.

Discussion, conclusion générale et perspectives

La problématique de notre travail s'inscrit dans une thématique générale, développée au sein du laboratoire d'Ecologie fonctionnelle (EcoLab), visant à caractériser la toxicité de nanoparticules produit dans un réacteur pilote industriel.

Ce projet est intégré dans les perspectives de recherche du laboratoire commun NAUTILE (Nanotubes & Ecotoxicologie) qui est un regroupement tripartite de deux laboratoires UMR CNRS, INPT et UPS, EcoLab, CIRIMAT ainsi que le groupe industriel Arkema, France.

L'ensemble des résultats obtenues montrent la réponse d'organismes entiers, après exposition à des Nanotubes de carbones multi-parois, et ceux en fonction de leur concentration mais aussi du temps. Dans un souci de compréhension des mécanismes moléculaires liés à la présence des nanotubes dans le milieu d'exposition, nous avons choisi de travailler à des temps courts d'exposition, allant de 2 à 24 heures.

1. Exposition des larves aux NTCMW et induction de l'hypoxie

Les résultats des observations macro- et microscopiques de larves de *X.laevis* (stade 50), exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts ont indiqués la présence de masses noirâtres au niveau des branchies. Ces masses étaient visibles à partir de 2 h d'expositions aux faibles concentrations (0,1 mg/L) de NTCMW bruts (**figure IV.7**). La quantité de ces masses noires suspectées contenir des nanotubes de carbone a ensuite augmenté dans le temps pour atteindre son maximum après 24 h d'exposition. Pour les concentrations de 1 mg/L de NTCMW, une observation microscopique de l'arc branchial a permis de mettre en évidence la présence de masses noire de taille assez importante à la fin du temps d'exposition (24 h). Par ailleurs, d'autres observations réalisées sur les larves au stade 54, exposées pendant 24 h à des concentrations de 0,1, 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts ont été effectuées (**figure V.1**). Ces observations ont permis de noter la présence dans les branchies d'agglomérats de couleur

noires, dont la quantité augmentait avec la concentration des NTCMW dans le milieu d'exposition.

A l'issu de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse d'un éventuel colmatage des branchies par les NTCMW, pouvant entrainer un phénomène d'hypoxie. En effet, ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature par Smith *et al*., (Smith et al., 2007) et plus récemment par Wang *et al*.,(L.-R. Wang et al., 2014).

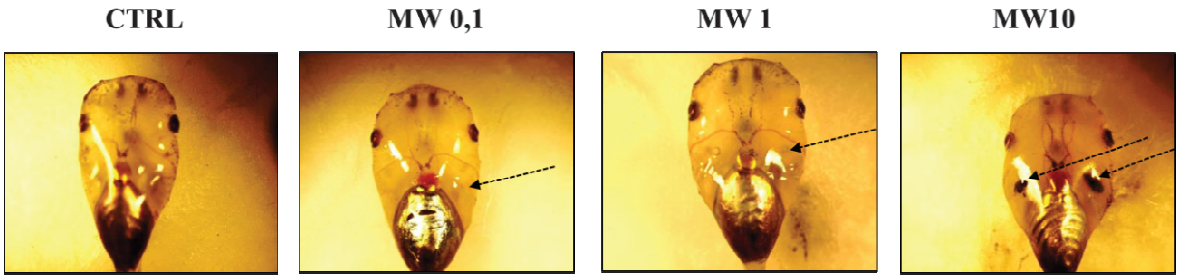

Figure V.1 : *Observations macroscopiques de la tête de larves au stade 54 exposées à des concentrations de 0 (A), 0,1 (B), 1 (C) et 10 mg/L (D) de NTCMW bruts pendant 24 h.*
La flèche noire indique la présence probable d'agglomérats de NTCMW dans les branchies.
CTRL : larves contrôle.

Afin de vérifier cette hypothèse deux approches différentes ont été entreprises. Ainsi, nous avons dans un premier temps réalisé des dosages de paramètres sanguins (pO_2, pCO_2, pH et *ct*HB) chez des larves exposées aux trois concentrations de NTCMW bruts durant 8 h. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence, une diminution significative de la pO_2 et du pH, accompagnée d'une augmentation significative de la pCO_2 et de la *ct*HB chez les animaux exposés à 1 mg/L de NTCMW bruts. L'exposition des larves à une concentration dix

fois plus importante a entrainé un accroissement significatif de ces effets. D'autre part, l'évaluation de différents paramètres physico-chimiques (oxygène dissout et pH) des milieux d'exposition a permis de montrer que l'hypoxie constaté dans le sang des animaux n'était pas lié à une diminution de l'oxygène dissout ou du pH dans les milieux d'exposition. Il a aussi permis de montrer que les larves avaient un effet important sur l'agitation et l'oxygénation du milieu. Par ailleurs, et dans un deuxième temps, des mesures de l'expression de gènes de réponse à l'hypoxie ont été réalisées. Les résultats obtenus ont montré une induction des gènes *hif1-α* et *epo*, codant respectivement pour le facteur de transcription induit par l'hypoxie et l'érythropoïétine. Cette induction a été observée aux concentrations de NTCMW de 1 et 10 mg/L, elle n'était toutefois significative que pour les larves en présence de10 mg/L de ces nanotubes.

Les facteurs HIF-1 sont à l'origine de l'augmentation de plus de 200 gènes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie et/ou l'ischémie (Safran and Kaelin, 2003; Paul T. Schumacker, 2005). La protéine HIF-1 est un hétérodimère de deux sous unités, HIF-α et HIF-β. Ce dernier est exprimé de manière constante et indépendante du taux d'O_2. Au contraire HIF-α est régulé par l'oxygène et est rapidement dégradé en normoxie par des prolyl hydrolases (PHD) (Jaakkola et al., 2001). Lorsque l'apport en oxygène devient insuffisant, l'activité PHD est inhibée entrainant une accumulation de HIF-α. Ce dernier s'accumule, migre vers le noyau cellulaire et s'associe avec HIF-β pour initier la transcription des gènes de réponse à l'hypoxie. Les gènes *epo* et *vegf* jouent un rôle primordial dans cette réponse. En effet, alors que l'activation du gène *epo* permet l'augmentation du nombre d'érythrocytes circulants, l'induction du gène *vegf*, codant pour un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire va entrainer l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins), permettant d'apporter via la circulation sanguine un apport plus important d'oxygène (Dupic et al., 2010). Dans le cadre de ces travaux, les observations macroscopiques complétés par la mesure de

l'expression des gènes *hif1-α* et *epo*, permettent de mettre en évidence un phénomène d'hypoxie en réponse à une exposition des larves aux NTCMW bruts. Ce phénomène ne peut cependant être confirmé que pour les larves exposées aux plus fortes concentrations (10 mg/L). Des expériences complémentaires doivent cependant être encore réalisées afin de comprendre les processus d'adaptation et de régulation de cette hypoxie mis en jeux par les larves au cours du temps. Afin de compléter cette étude il faudrait également envisager la mesure des paramètres sanguins et des gènes de régulation après différents temps d'exposition allant de 24 heures à 12 jours. En effet le dosage de ces paramètres à un seul temps (8 h) ne permet pas de permet pas de tirer des conclusions suffisantes concernant l'impact de l'accumulation branchiale des NTCMW sur la variation des paramètres sanguins sur le long terme.

Tableau V.1 *: Variation de l'ensemble des paramètres impliqués dans l'état d'hypoxie*

Concentration NTCMW (mg/L)	pO_2	pCO_2	pH	*ct*Hb	*epo*	*hif1-α*
0,1	-	-	-	-	ND	ND
1	↓	-	↓	-	-	+
10	↓↓	↑↑	↓↓	↑↑	++	++

- : pas de différence significative avec le contrôle négatif, + : faible induction, ++ : forte induction, ND : non définie. ↓ : faible diminution, ↓↓ : forte diminution, ↑↑ : forte augmentation.

De nombreux travaux dans le laboratoire ont montré que les concentrations testées dans ce travail n'induisent pas de mortalité significative, même après 12 jours d'exposition (Mouchet et al., 2010). Cette adaptation pouvant être liée (i) à une adaptation physiologique couteuse en énergie, qui pourrait en partie expliquer un retard de croissance pour les larves exposés à 10 mg/L de NTCMW, et /ou (ii) au mouvement des larves dans les cristallisoirs permettant

conjointement d'accroitre l'oxygénation du milieu et se débarrasser de l'excédent de NTCMW présent dans les corbeilles branchiales.

2. Induction d'un stress oxydant, une conséquence probable de l'hypoxie

Au cours de la respiration, la chaine mitochondriale, induit en permanence une production d'ERO (Guzy and Paul T. Schumacker, 2006). Ainsi, lors du fonctionnement normal de la chaine respiratoire, 0,4 à 4 % de l'oxygène consommé s'échappe sous forme d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Ce dernier est rapidement pris en charge par des enzymes tels que la SOD, pour être transformé en ERO plus stable mais hautement diffusible comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En conditions hypoxiques, les mitochondries sont incapables de continuer la synthèse d'ATP à un débit suffisant aux besoins de la cellule. Au niveau moléculaire, la déplétion en ATP entraine la diminution de l'activité des calcium-ATPases responsables de l'efflux du calcium hors des cellules, ce qui augmente la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et par conséquent, intra-mitochondrial. Ceci diminue le potentiel membranaire mitochondrial entrainant une retro-activation de la chaine respiratoire et une augmentation de la synthèse d'ERO avec une élévation de la quantité d'$O_2^{\cdot -}$ (N. S. Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998) .

Dans le cadre de cette thèse des mesures de la production d'H_2O_2 et des enzymes impliqués dans sa formation (SOD) et sa détoxification (GR et CAT) ont été réalisées chez des larves exposées à différentes concentrations de NTCMW bruts ou dispersés. Dans les cas des NTCMW bruts, les résultats obtenus ont indiqués une absence de production d'H_2O_2 chez les larves exposées à une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW, en comparaison avec les contrôles négatifs (**tableau.III.2**). Au contraire, une augmentation significative de la concentration en H_2O_2 a été observée à partir de 4 h chez les larves exposées à une concentration de 1 mg/L. Cette augmentation a ensuite été maintenue jusqu'à 12 h (p<0,05)

puis a fini par diminuer au bout de 24 h d'exposition. Pour les plus fortes concentrations de NTCMW testées (10 mg/L), une induction significativement différente du contrôle négatif a été observée plus précocement, après 2 h d'exposition. La concentration en H_2O_2 chez les larves évolue ensuite dans le temps pour finalement diminuer à 24 h d'exposition. Cependant, les résultats obtenus indiquent qu'il n y a pas de corrélation entre la concentration d'H_2O_2 produit et le temps de réponse des larves en fonction de la concentration des NTCMW dans le milieu d'exposition. La concentration maximale en H_2O_2 (3,2 ± 0,2 mmole/mg) a en effet été observé après 12 h d'exposition à une concentration de 1 mg/L de NTCMW bruts. Dans le cas des plus fortes doses de NTCMW (10 mg/L) le maximum d'H_2O_2 produit n'excédait pas les 2,1 ± 0,4 mmole/mg. Ce résultat peut être justifié par une réponse plus précoce (avant 2 h) que le temps d'observation, ainsi qu'à une carence respiratoire engendré par un colmatage plus précoce des branchies. En effet, l'altération du fonctionnement de la chaine mitochondriale survient après seulement 10 à 20 min du déclenchement d'une hypoxie (Rouslin, 1983; Flameng et al., 1991). La variation de la production d'H_2O_2 dans le temps est probablement due à des mécanismes de détoxication permettant de rétablir un équilibre du statut redox. Effectivement, en réponse à un disfonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale et l'induction d'un stress oxydant, l'organisme mets en place une série de défenses enzymatiques et non enzymatiques. Dans le cadre de nos expérimentations, l'induction des enzymes de réponse au stress oxydant a été évaluée par deux approches différentes (biochimiques et génétiques). L'approche biochimique a permis d'observer comme dans le cas du peroxyde d'hydrogène, une oscillation des activités enzymatiques dans le temps quelques soit la concentration de NTCMW testée. Cependant pour une concentration de 0,1 mg/L de NTCMW bruts, seule l'activité GR était induite à partir de 8 h d'exposition. Aucune induction de l'activité catalase n'a par ailleurs pu être mise en évidence. Comme nous avons pu le voir dans le chapitre III, la protection des cellules contre les effets toxiques du

peroxyde d'hydrogène est assurée par deux voies principales : la catalase et la glutathion peroxydase. Cette dernière regroupe l'action combinée de deux enzymes clefs, la GR et la GPx (**figure I.8, chapitre I**). Des travaux réalisé par Pietarinen *et al*.,ont montré que le cycle redox du glutathion est plus important que celui de la catalase dans le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires en réponse à une production de peroxyde d'hydrogène (Pietarinen et al., 1995). Ces résultats peuvent ainsi justifier l'absence d'induction de l'activité CAT chez les animaux exposés à de faibles concentrations de NTCMW bruts. Cependant il a également été démontré que l'activation des voies de la catalase et de la peroxydase était fortement liée à la concentration d'H_2O_2 produit (Costarides et al., 1991). Ainsi, en présence de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène, la voie des peroxydases est dominante. Au contraire lorsque la concentration en H_2O_2 augmente dans la cellules, la voie des CAT prend le relais pour renforcer la détoxification des ERO (Costarides et al., 1991). Ces éléments permettent d'expliquer la forte induction de l'activité CAT en comparaison avec celle de la GR chez les larves, en présence de 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts.

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre III, l'absence d'induction de l'activité SOD chez les larves en présence de 0,1 et 1 mg/L de NTCMW bruts pourrait être liée à la présence de sources secondaires d'H_2O_2, issus de l'activation d'enzymes telles que la glucose oxydase, l'ureate oxydase et l'aminoacide oxydase (Cadenas and Davies, 2000; Szatrowski and Nathan, 1991). Afin de vérifier l'activation de ces enzymes, des dosages biochimiques pourraient être réalisés dans les mêmes conditions expérimentales utilisées pour les activités GR, CAT et SOD. Les résultats obtenus permettraient de valider nos hypothèses et de mieux comprendre les mécanismes d'induction du stress oxydant après exposition des larves aux plus faibles concentrations de NTCMW.

L'activation des enzymes de réponse au stress oxydant a également été vérifiée grâce à la mesure de l'expression des gènes *gpx*, *gr*, *cat* et *sod* par une technique innovante de RT-PCR

quantitative sur des cellules sanguines isolées (**chapitre IV**). En plus de confirmer les résultats des analyses biochimiques, cette technique a permis de mettre en évidence une induction de l'expression du gène *gpx* chez les larves en présence de NTCMW bruts. Les résultats des analyses de qRT-PCR ont également permis de mettre en évidence une induction plus prononcé des gènes *gpx*, *gr* et *cat* à la plus faibles dose d'exposition testée (1 mg/L). Il est important de souligner que les mesures de l'expression de ces gènes ont été réalisées sur les cellules sanguines, alors que les activités enzymatiques ont été réalisées sur des larves entières. Cette différence peut être due à un phénomène de dilution associé à la méthode d'évaluation des activités enzymatiques. En effet dans ce cas, toutes les protéines constitutives du corps de la larve sont extraites pour mesurer l'activité. Afin de compléter ces travaux, il serait intéressant d'évaluer l'activité enzymatique directement dans le sang des animaux mais aussi de tester les effets des plus faibles doses d'exposition (0,1 mg/L) sur l'activité de ces protéines ainsi que sur leur expression. Dans un deuxième temps, une cinétique de l'expression des gènes de réponse au stress oxydant permettrait d'apporter plus de renseignement concernant la perturbation du statut redox à l'échelle moléculaire. Par ailleurs, une mesure de la production d'autres ERO que l'H_2O_2 (*eg*. $O_2^{\cdot-}$, °OH…) donnerais une idée plus précise sur les sources de radicaux libres. Il permettrait aussi de s'intéresser au rôle des nanotubes dans le piégeage ou au contraire la formation d'ERO comme décrit dans la littérature (Saria et al., 2014). En effet Fenoglio *et al*., (Fenoglio et al., 2006) ont rapporté que les NTCMW étaient capables de piéger de façon très efficace les radicaux $O2^{\cdot-}$ et OH°, indépendamment de la façon dont il ont été générés.

3. Effets de la dispersion des NTCMW sur les paramètres du stress oxydant

Dans le cadre de l'évaluation de l'écotoxicité de NTCMW individualisés en suspension dans la colonne d'eau et afin d'étudier leur « effet à l'échelle nanométrique », un agent dispersant

naturel composé de matière organique issus de la rivière « Suwannee » a été incorporé dans les milieux d'exposition. Pour des concentrations de 0,1 mg/L de NTCMW, les résultats de dosage de la production de peroxyde d'hydrogène et de l'induction des enzymes du stress oxydant (GR, CAT et SOD) n'ont montré aucune différence significative entre les larves témoins et ceux exposées aux NTCMW dispersés (**tableau III.3 et figure III.9**). En réalisant ces expériences nous nous attendions à avoir des effets plus prononcé que dans le cas des NTCMW bruts, or les résultats obtenus mettent en avant un effet contraire. Cette absence d'effet pourrait être justifiée par une réduction de la taille des agglomérats de NTCMW après leur dispersion (Bourdiol, 2013; Verneuil et al., 2014) et par conséquent à leur incapacité de colmater les branchies des larves de xénope. Ce résultat conforte en partie l'hypothèse d'un effet plus associé à des phénomènes physiques de ces NTCMW (colmatage des branchies), qu'un effet lié à la pénétration des tubes dans l'organisme. La réalisation d'autres essais avec des NTCMW dispersés à des concentrations de 1 et 10 mg/L sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. De même, un marquage des tubes au ^{14}C par exemple permettrait de confirmer ou nom l'entrée des NTCMW à l'intérieur de l'organisme.

4. Dommages cellulaires, une conséquence de l'induction des ERO

Les ERO générées au cours d'un stress oxydant peuvent être à l'origine de nombreux dégâts cellulaires importants, notamment, des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides (Carrière et al., 2006).

4.1. Peroxydation des lipides et induction d'une réponse inflammatoire

La peroxydation des lipides résulte de l'attaque par des radicaux libres d'acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linolénique, arachidonique). La présence de fer sous sa forme ionique (Fe^{2+}) dans les cellules entraine la formation de radicaux hydroxyles (OH°) selon la

réaction de Haber-Weiss ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH° + OH^- + O_2$). Les radicaux OH° sont à l'origine de nombreuses lésions cellulaires dont la peroxydation des lipides, initié par la formation du le radical peroxyle, ROO°. Ce dernier peut interagir avec un autre acide gras et former un hydroperoxyde (ROOH), qui va à son tour être oxydé et fragmenté pour former des aldéhydes, parmi lesquelles figurent le MDA et le 4-HNE.

Dans le cadre de nos expérimentations, une induction significative de la production de MDA a été observée à toutes les concentrations d'exposition testées. Toutefois cette production n'évolue pas de la même façon en présence des différentes concentrations de NTCMW, et tout comme l'H_2O_2 et les activités enzymatiques, la réponse est d'autant plus précoce et importante que la dose d'exposition est importante. La propagation des dommages lipidiques en réponse à une exposition aux NTC est un phénomène très rapide. Il a en effet été démontré, qu'une exposition de macrophages murins à des NTCSW entrainait une induction de la peroxydation des lipides après seulement 30 min (Kagan et al., 2006). Afin de mieux cerner les effets du stress oxydatif sur les lipides et de voir leurs propagation dans l'organisme, des travaux ont été entrepris en collaboration avec l'université de Bicocca (Milan, Italie). Des mesures de 4-HNE par immuno-histo-chimie dans les tissus sont en cours de réalisation. Ces expérimentations n'étant pas fini au moment de la réalisation de ce manuscrit, ne seront pas présentés. Toutefois, ces résultats nous auraient permis (i) de mettre en évidence la production de ces dérivés lipidiques et (ii) de les localiser au sein des larves de xénope. La continuité de ce projet aidera à mieux comprendre les mécanismes qui régissent la peroxydation des lipides chez les larves de xénope en réponse à une exposition aux NTCMW.

L'oxydation des lipides va engendrer des cascades d'évènements conduisant à l'activation de phospholipases, comme la PLA_2, à l'origine de la cascade de l'acide arachidonique. Cet acide gras sert de substrat aux lipoxygénases (LO) et permet la formation de leucotriènes

(LT). L'acide arachidonique peut également être pris en charge par des cyclooxygénases (COX) pour former des prostaglandines (PG). L'ensemble des dérivées de l'acides arachidonique, appelé eicosanoïdes, sont connus pour être des médiateurs lipidiques de l'inflammation.

L'impact des NTCMW sur la formation d'eicosanoïdes a été évalué par la mesure de l'expression des gènes *cox-1*, *cox-2* et *lta4h*. Comme attendu, aucune variation de l'expression du gène *cox-1* n'a pu être mise en évidence quel que soit la concentration en NTCMW testé (1 ou 10 mg/L). Comme on a pu le voir précédemment, ce gène est constitutivement induit au sein de la plus part des tissus. Il joue une fonction de protection (house-keeping) des muqueuses gastriques et assure une bonne hémodynamique rénale (Lj, 1997). Pour des raisons techniques, l'expression du gène *cox-2*, dont l'induction reflète une mise en place d'une réponse inflammatoire, n'a pas pu être mesurée. Ainsi l'activation de la voie des cyclooxygénases (COX) en réponse à une exposition aux NTCMW n'a pas pu être mise en évidence dans le cadre de ces travaux. D'autre part, une induction dose dépendante du gène *lta4h*, dont la protéine est impliquée dans la formation des LTB_4 (voie des lipoxygénases), a été observée. Cette détection indirecte de la production de LTB4 suite à une exposition à des nanotubes de carbone laisse penser à une probable mise en place d'une réponse inflammatoire. En effet, les leucotriènes et notamment les LTB4 ont longtemps été reconnus comme de puissants médiateurs de l'inflammation, contribuant à la réponse immune et à la défense de l'hôte contre l'infection ("Leukotrienes," n.d.). Ils stimulent un certain nombre de fonction des leucocytes, y compris l'agrégation, la stimulation de flux d'ions, la production d'anion superoxyde et le chimiotactisme ("Leukotrienes," n.d.). Les LTB4 peuvent s'associer au facteur de transcription intranucléaire PPAR-α, entrainant l'activation des gènes qui terminent le processus inflammatoire (Yokomizo et al., 1997). Une mesure de l'expression du gène *ppar-α* pourrait donc compléter ces travaux. Par ailleurs, une mesure de la production

des LTB4 serait nécessaire pour confirmer leur synthèse. Malgré le fait que LTA4H soient largement connus pour leur implication dans la production des LTB4 à partir des LTA4, des travaux récents ont mis en évidence la capacité de l'activité aminopeptidase des LTA4H à exercer un effet anti-inflammatoire en inhibant les LTB4 (Michael and Paige, 2012).

Dans le cadre de la mise en place d'une inflammation, l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE), un dérivée de l'acide arachidonique, peut être induit en réponse à des cytokines pro-inflammatoires TNF-α (Zouboulis, 2004). Les 15-HETE sont connus pour être des ligands naturels des récepteurs PPAR-γ (Shappell et al., 2001). Ces derniers jouent un rôle important dans la modulation inflammatoire des cellules immunitaires (Tontonoz and Spiegelman, 2008). L'activation de PPAR-γ améliore en effet, leur capacité à phagocyter les neutrophiles apoptotiques, facilitant la résolution de l'inflammation (Majai et al., 2007). En outre, l'induction de PPAR-γ peut induire une apoptose dans une variété de types cellulaires (Dekkers et al., 2012). Dans la cadre de nos travaux une induction de l'expression du gène *ppar- γ* a été mise en évidence dans les érythrocytes des larves de xénope, en réponse à une exposition à des NTCMW bruts (**figure IV.10.D**). Cette induction n'était toutefois significative que pour les plus fortes concentrations de NTCMW testées (10 mg/L). Ces résultats semblent indiquer qu'une exposition des larves de *X.laevis* à une concentration de 10 mg/L de NTCMW bruts entraine la mise en place d'une réponse inflammatoire. Des mesures complémentaires de gènes impliqués dans le processus inflammatoire et notamment des cytokines anti (TNF-α, IL-4, IL-10…) et pro-inflammatoires (INF-γ, IL-3), pourraient être réalisé afin de confirmer cette hypothèse.

4.2. Induction de dommages à l'ADN et apoptose

En plus de leur capacité à peroxyder les lipides, les radicaux OH° peuvent également être à l'origine de dommages à l'ADN. En effet, L'OH° est le radical le plus réactif avec l'ADN et

l'ARN. Parallèlement aux ERO, les produits secondaires de la peroxydation des acides gras polyinsaturés tels que le MDA (aldéhyde mutagène) peuvent interagir avec l'ADN et former des adduits (Marnett, 2002). Ces altérations structurales lorsqu'elles sont mal réparées, entrainent à long terme des altérations géniques (Osada and Takahashi, 2002). Chez les larves de xénope exposées aux NTCMW bruts, l'induction des dommages à l'ADN a été évaluée grâce au test des comètes (**chapitre III**). A des concentrations de de 0,1 et 1 mg/L de NTCMW, les résultats obtenus ont montré une variation des dommages à l'ADN dans le temps avec des effets plus prononcé à 1 mg/L. Pour les plus fortes concentrations testées (10 mg/L), une diminution de la viabilité des érythrocytes à partir de 2 h d'exposition, n'a pas permis la réalisation des essais Comète comme recommandé par Collins *et al*., (Collins, 2002). Par ailleurs, la mesure de l'expression de *rad51* et *odc*, deux gènes impliqués de façon indirecte dans la réparation des lésions à l'ADN, a permis de mettre en évidence une induction plus importante de ces gènes chez les larves exposées à 1 mg/L. Les essais ayant été réalisés à un seul temps (8 h d'exposition), l'observation d'une induction moins importante des gènes *rad51* et *odc* chez les animaux exposés à 10 mg/L de NTCMW bruts pourrait s'expliquer par des effets plus précoces, comme ceux observés dans le cadre des essais Comète. L'ensemble des résultats obtenus permet de démontrer la capacité des NTCMW bruts à induire des lésions à l'ADN. L'implication de l'hypoxie dans l'induction de cassures à l'ADN est également à prendre en considération. En effet, plusieurs arguments de la littérature suggèrent que l'hypoxie est impliquée dans l'activation de voies de réponse aux dommages de l'ADN (Bindra and Peter M. Glazer, 2005; Coquelle et al., 2002; Reynolds et al., 1996).

Au sein de l'organisme, une des conséquences de l'altération de l'ADN est la mise en place d'une perturbation du cycle cellulaire, favorisant l'entrée en apoptose des cellules trop endommagés (Flores et al., 2002; Gong et al., 1999). D'autre part, la peroxydation des lipides

peut provoquer une perturbation des interactions hydrophobes, conduisant à l'altération de la structure membranaire des cellules. Ces altérations sont à l'origine d'une modification de la fluidité et de la perméabilité des membranes pouvant porter atteinte à la survie cellulaire (Guillot, 2008). L'induction des gènes qui contrôlent l'apoptose a été mise en évidence par la mesure de l'expression de *bax*, *bcl-2* et *bcl-xl* chez des larves exposées aux NTCMW. Les résultats obtenus indiquent une activation dose dépendante de l'ensemble de ces gènes, ainsi que ceux impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire comme *p53* et les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun*. A l'inverse, une inhibition des gènes anti-apoptotiques (*bcl-2* et *bcl-xl*) a été observée. L'ensemble de ces résultats tant à démontrer la mise en place d'une réponse apoptotique dans les érythrocytes de larves de xénope en présence de NTCMW. Cette induction de l'apoptose semble toutefois être plus importante à la concentration de 10 mg/L. Une augmentation de la mort des cellules sanguines a par ailleurs été observée dans le cadre de la mise en place du test des comètes. En effet la viabilité cellulaire des érythrocytes de larves exposées à 10 mg/L était bien inférieure à 90 % (voir chapitre III). Cette diminution de la viabilité a également été observée au cours des essais de qRT-PCR. Comme nous avons pu le voir dans le chapitre IV, la réalisation de ces expérimentations nécessite une étape préliminaire de comptage d'érythrocytes. Le dénombrement de ces cellules a indiqué une diminution du nombre d'érythrocytes avec l'augmentation de la concentration en NTCMW dans les milieux. En effet, alors que le nombre de cellules par microlitre de sang était de 12400 pour le contrôle négatif, des concentrations de 9000 et 3000 cellules/µL ont été obtenus pour des teneurs respectives de 1 et 10 mg/L de NTCMW bruts. Les résultats obtenus dans cette partie de nos travaux semblent être en accord avec notre hypothèse de départ, à savoir la mise en place d'une hypoxie conduisant à l'induction d'un stress oxydant. En effet, la voie intrinsèque de la mort cellulaire est dépendante de la mitochondrie et est stimulée lors de l'hypoxie. Elle implique une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par la

formation de pores de transition, régulée par des protéines de la famille des BCL2 (Snyder and Navdeep S. Chandel, 2009). Des travaux de la littérature ont montré que certaines ERO, et notamment le radical OH°, peuvent entrainer l'activation du gène *p53* (S. Wang et al., 2000). Des mesures de l'expression des gènes impliqués dans la réponse apoptotiques doivent cependant être réalisées aux différents temps d'expositions (2, 4, 8 12 et 24 h) afin de pouvoir établir une relation entre l'induction de l'apoptose, l'altération de l'ADN, la mise en place d'un stress oxydant et l'hypoxie.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse peuvent être résumés dans schéma suivant :

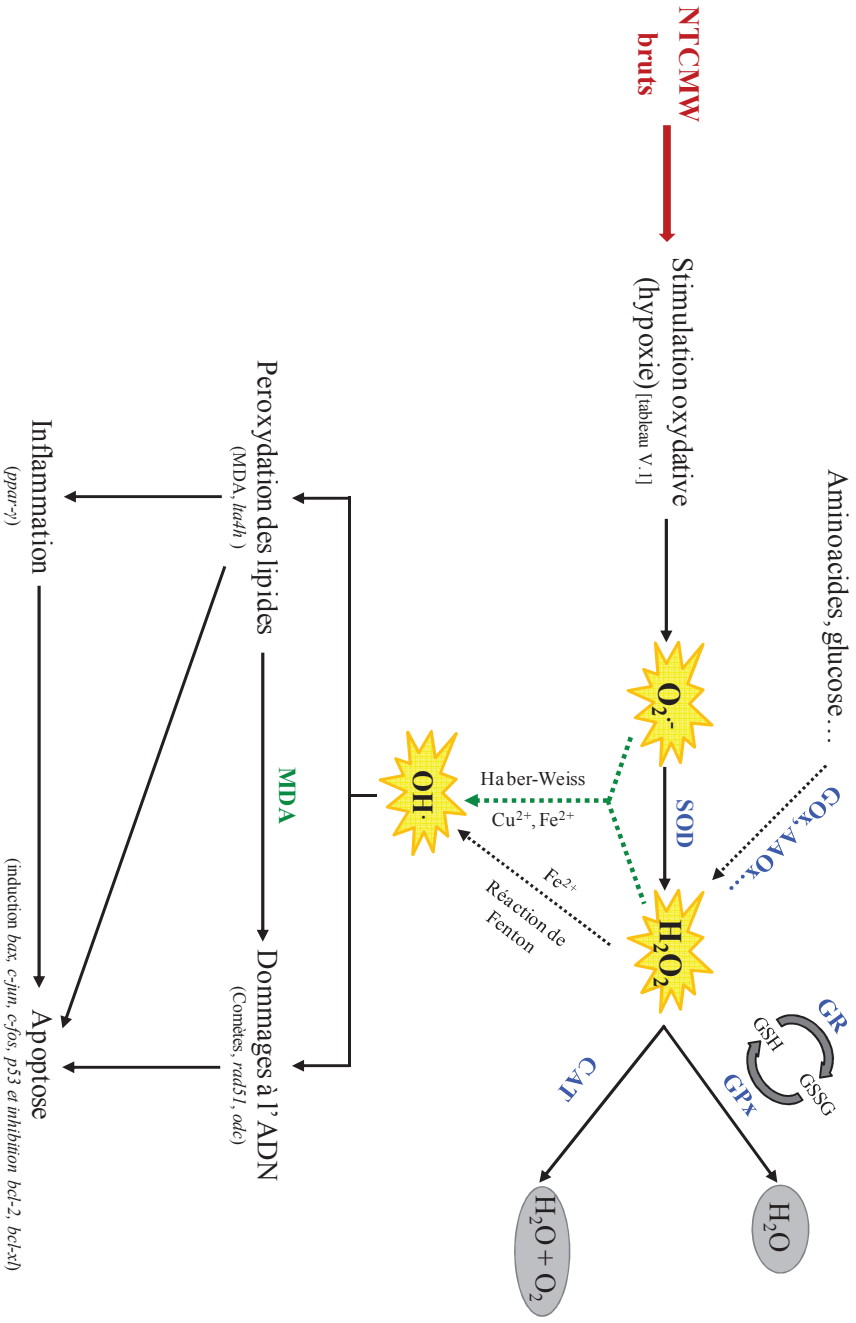

Figure V.2 : *Shéma syntéthique du potentiel mécanisme de toxicité des NTCMW bruts chez les larves Xenopus laevis*

En nous basant sur l'ensemble des résultats obtenus et les travaux de thèse menés par Floriane Bourdiol (Bourdiol, 2013), montrant un retard de croissance et une absence de mortalité chez

les larves de xénope exposés pendant 12 jours à des NTCMW, nous avons émis l'hypothèse d'une probable adaptation physiologique des larves au stress induit par les NTCMW.

La présence d'un stress, quel que soit sa nature, durant la période de développement peut affecter les fonctions physiologiques de l'organisme tels que la croissance, le métabolisme et les réponses inflammatoires et immunitaires (Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), 2007). Une des conséquences de ce processus adaptatif est la mobilisation d'énergie (acides gras libres, glycérol, glucose, acides aminés) nécessaires au bon développement de l'organisme (Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), 2007).

Il serait donc très intéressant de réaliser des travaux similaires à ceux effectués dans le cadre de cette thèse en utilisant des larves de xénope exposées pendant de longues périodes aux NTCMW. Les résultats obtenus permettront de connaitre l'impact, à long terme, des NTCMW sur les larves de *X.laevis*, et d'une façon plus générale sur les organismes du milieu aquatique.

Malgré l'avancé de nos travaux et ceux de la communauté scientifique, relative à l'évaluation des impacts potentiels des NTC dans l'environnement aquatique; nous sommes aujourd'hui toujours pas en mesure de prédire avec précision leur toxicité ni expliquer de manière sûre les mécanismes mis en jeux. Outre la densité intrinsèque des NTC étudiés ou potentiellement retrouvés au sein des milieux aquatiques, nous devons considérer la complexité et la variabilité du milieu lui-même (sels dissous, organismes vivants, contaminants naturels ou d'origine anthropique, *etc*), qui constituent autant de facteurs influençant la réactivité des NTC, vis-à-vis des systèmes vivants. Ceci est autant plus valable que les organismes vivant ne seront pas exposés à un seul type de NTC et que leur devenir et leur répartition dans le milieu aquatique pourrait être influencés par la présence simultanée, en concentrations variables, de composés naturels de nature diverses, tels que les acides aminées, des substances humiques, de divers agents dispersant, de plusieurs types de métaux lourds et de médicaments, *etc*.

Références bibliographiques

Amsalem, S., Carel, J.C., De Roux, N., Issad, T., Maccari, S., Prevot, V., Susane, C., **2007**. Croissance et puberté : Evolutions séculaires, facteurs environnementaux et génétiques. [Rapport], Inserm, Paris

Bindra, R.S., Glazer, P.M., **2005**. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res*. 569, 75–85.

Bourdiol, F., **2013a**. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Cadenas, E., Davies, K.J., **2000**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29, 222–230.

Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.C., Pénicaud, L., Casteilla, L., **2006**. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine sciences*. 22,47–53.

Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P. T., **1998**. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 95, 11715–11720.

Collins, A.R., **2002**. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*. 203, 163–177.

Coquelle, A., Rozier, L., Dutrillaux, B., Debatisse, M., **2002**. Induction of multiple doublestrand breaks within an hsr by meganucleaseI-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements. *Oncogene*. 21, 7671–7679.

Costarides, A.P., Riley, M.V., Green, K., **1991**. Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of anterior-chamber hydrogen peroxide. *Ophthalmic Res*. 23, 284–294.

Crofford, L.j., **1997**. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*. 49, 15–19.

Dekkers, J.F., Van der Ent, C.K., Kalkhoven, E., Beekman, J.M., **2012**. PPARγ as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Trends Mol Med*. 18, 283–291.

Dupic, L., Huet, O., Harrois, A., Duranteau, J., **2010**. Hypoxie et fonction mitochondriale. *Réanimation*. 19, 399–405.

Duranteau, J., Chandel, N. S., Kulisz, A., Shao, Z., Schumacker, P. T., **1998**. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 273, 11619–11624.

Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., Fubini, B., **2006**. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity?. *Free Radic Biol Med*. 40, 1227–1233.

Flameng, W., Sukehiro, S., Möllhoff, T., Van Belle, H., Janssen, P., **1991**. A new concept of long-term donor heart preservation: nucleoside transport inhibition. *J Heart Lung Transplant*. 10, 990–998.

Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., Jacks, T., **2002**. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 416, 560–564.

Gong, J., Costanzo, A., Yang, H.-Q., Melino, G., Kaelin, W.G., Levrero, M., Wang, J.Y.J., **1999**. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 399, 806–809.

Guillot, N., **2008**. Plaquettes Sanguines et megacaryocyte humain : impact de différentes concentrations d'acide docosahexaenoïque sur leur activation et leur état redox. [Thèse], Université Claude Bernard, Lyon.

Guzy, R.D., Schumacker, P.T., **2006**. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 91, 807–819.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, ‡ Christopher W., Ratcliffe, ‡ Peter J., **2001**. Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O2-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*. 292, 468–472.

Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Konduru, N.V., Potapovich, A.I., Osipov, A.N., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., Shvedova, A.A., **2006**. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol Lett*. 165, 88–100.

Majai, G., Sarang, Z., Csomós, K., Zahuczky, G., Fésüs, L., **2007**. PPARgamma-dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells. *Eur J Immunol*. 37, 1343–1354.

Marnett, L.J., **2002**. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 181–182, 219–222.

May, O., **2009**. Leukotrienes: Inflammatory mediators through G protein-coupled receptors and beyond. [Internet] URL https://www.caymanchem.com

Michael, Y., Paige, M., **2012**. Leukotriene A4 Hydrolase – An Evolving Therapeutic Target. [Livre], Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., **2010**. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine-UK*. 5, 963–974.

Osada, H., Takahashi, T., **2002**. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*. 21, 7421–7434.

Pietarinen, P., Raivio, K., Devlin, R.B., Crapo, J.D., Chang, L.Y., Kinnula, V.L., **1995**. Catalase and glutathione reductase protection of human alveolar macrophages during oxidant exposure in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 13, 434–441.

Reynolds, T.Y., Rockwell, S., Glazer, P. M., **1996**. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 56, 5754–5757.

Rouslin, W., **1983**. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol*. 244, 743–748.

Safran, M., Kaelin, W.G., **2003**. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest*. 111, 779–783.

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., **2014**. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotox Environ Safe*. 107, 22–29.

Schumacker, P.T., **2005**. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit Care Med*. 33, 423–425.

Shappell, S.B., Gupta, R.A., Manning, S., Whitehead, R., Boeglin, W.E., Schneider, C., Case, T., Price, J., Jack, G.S., Wheeler, T.M., Matusik, R.J., Brash, A.R., Dubois, R.N., **2001**. 15SHydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. 61, 497–503.

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., **2007**. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*. 82, 94–109.

Snyder, C.M., Chandel, N.S., **2009**. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions. *Antioxid Redox Sign*. 11, 2673–2683.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., **1991**. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 51, 794–798.

Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., **2008**. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*. 77, 289–312.

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., **2014**. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: “A sticky story”. *Nanotoxicology*. 1–11.

Wang, L.R., Xue, X., Hu, X.M., Wei, M.Y., Zhang, C.Q., Ge, G.L., Liang, X.J., **2014**. Structure-dependent mitochondrial dysfunction and hypoxia induced with single-walled carbon nanotubes. *Small*. 10, 2859–2869.

Wang, S., Leonard, S.S., Ye, J., Ding, M., Shi, X., **2000**. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol-Cell Ph*. 279, C868–C875.

Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., Shimizu, T., **1997**. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. 387, 620–624.

Zouboulis, C.C., **2004**. The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones (Athens)*. 3, 9–26.

Résumé

L'impact potentiel des nanotubes de carbone multi-parois (NTCMW) a été évalué sur des larves de *Xenopus laevis*, exposées à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 mg/L, sur une durée allant de 2 à 24 h. Des mesures biochimiques réalisées à l'échelle des larves entières ont permis de mettre en évidence une induction d'un stress oxydant caractérisé par une production de peroxyde d'hydrogène et une induction des enzymes de lutte contre le stress oxydant : glutathion réductase, catalase et superoxyde dismutase, de façon dépendante de la concentration en NTCMW. Une production significative de malondialdéhyde, un marqueur important de la peroxydation des lipides, a été mesurée chez les larves en présence de NTCMW bruts. Les résultats de mesure des dommages à l'ADN ont indiqué une altération du matériel génétique de façon dose-dépendante. Des observations macroscopiques des larves, ont montré une accumulation, dose- et temps-dépendante, de masses noires suspectées d'être des agglomérats de NTC, au niveau des branchies, laissant penser à un probable colmatage de ces dernières. Cette hypothèse a été vérifiée par la mesure de différents paramètres sanguins. Une diminution de la pression partielle en O_2 (pO_2) et du pH ont été observées à partir de 1 mg/L de NTCMW dans le milieu. À 10 mg/L, une augmentation significative de la pCO_2 et de la concentration en hémoglobine, accompagnée d'une diminution du pH et de la pO_2 ont été observées. Enfin les analyses de RT-PCR quantitative, réalisées au niveau des érythrocytes, ont permis de confirmer l'induction du stress oxydant, de la peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN et de l'hypoxie. La quantification des transcrits a également mis en avant un processus inflammatoire et apoptotique en réponse à une exposition des larves à des concentrations élevées en NTCMW bruts.

Mots-clefs : *Xenopus laevis*, nanotubes de carbone, stress oxydant, hypoxie, génotoxicité

Abstract

The potential impact of the Multiwalled Carbon Nanotubes, (MWCNT) was investigated on *Xenopus laevis* tadpoles exposed to concentrations of 0.1, 1 and 10 mg/L, on period ranging from 2 to 24 h. Biochemical measurements across whole larvae were allowed to demonstrate induction of oxidative stress, characterized by the production of hydrogen peroxide and induction of anti-oxidantive enzymes: glutathion reductase, catalase and superoxide dismutase, depending of the concentration MWCNT. Significant production of malondialdehyde, a major marker of lipid peroxidation was measured in larvae in presence of Raw MWCNT. The results of DNA damage measurement indicated alterations of the genetic material in a dose-dependent manner. Macroscopic observations of larvae showed a dose-dependent time accumulation of black masses in gills, suspected to be CNT agglomerates, suggest a probable gills clogging. This hypothesis was verified by measuring various blood parameters. A decrease in O_2 partial pressure (pO_2) and pH were observed from 1 mg/L of MWCNT in the exposure medium. At 10 mg/L, a significant increase in the pCO_2 and hemoglobin concentration, accompanied by a decrease in pH and pO_2 were measured. Finally, Quantitative RT-PCR analysis performed on tadpoles erythrocytes, have confirmed the induction of oxidative stress, lipid peroxidation, DNA damage and hypoxia. Quantification of transcripts also helped to highlight an inflammatory and apoptotic process in response to larvae exposure to high concentrations of raw MWCNT.

Key words: *Xenopus laevis*, carbon nanotubes, oxidative stress, hypoxia, genotoxicity

Ecotoxicology and Environmental Safety 107 (2014) 22–29

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles

Rayenne Saria [a,b], Florence Mouchet [a,b,c,*], Annie Perrault [a,b], Emmanuel Flahaut [c,d,e], Christophe Laplanche [a,b], Jean-Charles Boutonnet [c,f], Eric Pinelli [a,b,c], Laury Gauthier [a,b,c]

[a] Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France
[b] CNRS; EcoLab; F-31326 Castanet Tolosan, France
[c] Laboratoire Commun NAUTILE (CNRS-UPS-INPT-ARKEMA France), laboratoires EcoLab/CIRIMAT/GRL CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France
[d] Université de Toulouse; INP, UPS; EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement); ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, F-31326 Castanet Tolosan, France
[e] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France
[f] Toxicology & Environment Department, 420 rue d'Estienne d'Orves, F-92705 Colombes Cedex, Arkema, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 February 2014
Received in revised form
5 May 2014
Accepted 8 May 2014

Keywords:
Amphibian
Glutathione reductase
Superoxide dismutase
Catalase
Nanoparticles
Comet assay

ABSTRACT

The potential impact of Multiwalled Carbon NanoTubes (MWCNTs) was investigated on *Xenopus laevis* tadpoles exposed to 0.1, 1 and 10 mg/L. Oxidative stress was measured in entire larvae exposed and DNA damage (Comet assay) was carried out in erythrocytes of circulating blood from 2 h to 24 h according to standardized recommendations. Results showed significant H_2O_2 production when larvae were exposed to 1 mg/L and 10 mg/L of MWCNTs after 4 h and 2 h of exposure, respectively. Antioxidant enzyme activities showed significant induction of catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) from only 2 h of exposure to 10 mg/L of MWCNTs. In presence of 1 mg/L of MWCNTs, only GR and CAT activities were significantly induced at 4 h. Enzyme activities do not follow a simple dose-effect relation, but the time of induction is shortened in relation with the tested concentration. The Comet assay results showed significant DNA damages with a dose dependent response. The profiles of DNA damages show fluctuations, in course of time, which are characteristics of oxidative stress response in relation with the continuous balance between damage and compensation process.
© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Due to their massive production in relation with their number of potential applications, the impact of carbon nanotubes (CNTs) on the environment must be taken into consideration, especially in aquatic ecosystems which are one of the major potential receptacle compartments of pollutants. Previous work indicates that CNTs may lead to hazardous effects on cells, tissues, and organisms (van der Zande et al., 2011; Zhao and Liu, 2012), including plants (Patlolla, 2013), human (Bottini et al., 2006; Monteiro-Riviere et al., 2005), mammals (Mitchell et al., 2007; Poland et al., 2008) but also aquatic organisms (Krysanov et al., 2010). It has been reported a growth inhibition of the green alga *Chlorella* sp. after 96 h of exposure to 100 mg/L of MWCNTs (Long et al., 2012). A reduced survival and growth were observed on chironomid larvae (*Chironomus dilutus*) after 12 h of exposure to MWCNTs (Mwangi et al., 2012). MWCNTs can also cause developmental toxicity, gill, liver, brain, intestine pathologies (edema, altered mucocytes, hyperplasia), respiratory toxicity and oxidative stress in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Zebrafish (*Danio rerio*) according to different exposure conditions (Du et al., 2013).

Moreover, there is evidence suggesting that oxidative stress may occur in presence of CNTs, at the origin of reactive oxygen species (ROS) production (Chen and Jafvert, 2010; Petersen and Nelson, 2010; Thurnherr et al., 2011). Oxidative stress corresponds to a disturbance of the redox status of the cells and is related to an increase of ROS such as superoxide anions (O_2^{-}), hydroxyl radical (.OH) and hydrogen peroxide (H_2O_2). To prevent ROS injuries, organisms have developed various defense mechanisms in order to transform ROS into less-toxic products. The majority of these mechanisms depend on metabolic mediation of natural compounds and enzymatic antioxidant systems, among them catalase

* Corresponding author at: Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France.
E-mail address: florence.mouchet@ensat.fr (F. Mouchet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.010
0147-6513/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

(CAT and EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD and EC 1.15.1.1), glutathione peroxidase (GPX and EC 1.11.1.19) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2). The increased levels of these metabolic intermediary compounds, and of antioxidant enzymes, lead to increased stress tolerance against ROS (Matés, 2000).

Over-production of ROS can lead to membrane alteration, biological macromolecule deterioration, ion leakage, lipid peroxidation and DNA-strand cleavages (Halliwell and Aruoma, 1991; Hensley et al., 2000; Nel, 2006). The DNA breaks are often measured by the Comet assay. The single cell gel electrophoresis (Comet assay) in alkaline conditions is a highly sensitive biomarker. It detects and quantifies DNA damage, such as single- and double-strand breakage and alkali-labile sites (Tice et al., 2000). These types of damage can be induced directly by the contaminant, or indirectly via oxidative stress and/or the repair processes (Tice et al., 2000).

In this study, we have focused our attention on the impact of MWCNTs using the amphibian model *Xenopus leavis*, well-known to be an environmental health warning organism due to their biphasic life cycle, their permeable eggs, skin and gills (Mouchet and Gauthier, 2013).

Preliminary studies with MWCNTs helped us to highlight the effects of chronic toxicity (growth inhibition) at low concentrations under certain experimental conditions (Mouchet et al., 2010). To better understand the mechanism of toxicity of these tiny particles and whether they are able to induce an early response, amphibian larvae were exposed for short times (2, 4, 8, 12 and 24 h) to three different concentrations of MWCNTs (0.1, 1 and 10 mg/L) to evaluate their potential toxicity in term of oxidative stress and DNA damages induction.

2. Material and methods

2.1. MWCNTs, production and characterization

MWCNTs (Graphistrength C100, Arkema France) were produced by Catalytic Chemical Vapor Deposition (CCVD) by Arkema facility (Lacq, France) on a Fe–Al_2O_3-based supported catalyst using a fluidized bed process. Composition is graphite (>90 percent, [7782-42-5]), Aluminum oxide (Al_2O_3, ≤ 7 percent, [1344-28-1]) and Iron oxide (Fe_2O_3, ≤ 5 percent, [1309-37-1]). The carbon content of the MWCNTs sample was ca. 90 wt%, as obtained by elemental analysis. The physical characteristics and Transmission Electron Microscopy (TEM) observation of the MWCNTs used in this study were previously described by Mouchet et al. (2010). According to the theory of Brunauer, Emmett and Teller (BET), the specific surface area was measured after degassing the sample in N_2 for 4 h at 120 °C and the adsorption of nitrogen gas at the temperature of liquid nitrogen (Micrometrics Flow Sorb II 2300; measurement accuracy $\approx \pm 3\%$). MWCNTs had 5 to 15 walls, their length ranged from 0.1 μm to 10 μm, and their mean agglomerate size is between 200 μm and 500 μm (laser scattering granulometer, d (v: 0.5)). Each suspension of 0.1, 1 and 10 mg/L of MWCNTs were purchased in 20 ml of deionized water.

2.2. Animals, breeding and housing

Xenopus males were injected with 50 IU of Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin (PMSG 500; Intervet, France, [9002-70-4]) and the females with 750 IU of Human Chorionic Gonadotropin (HCG; Organon, France, [9002-61-3]) to induce spawning. Each pair was then placed together in normal tap water filtered through active charcoal at 22 ± 2 °C. After 48 h, the pairs were separated and viable eggs were maintained in an aquarium containing normal tap water filtered through active charcoal (Veolia Water, France [E300CA-7003]) at 21 ± 1 °C supplemented with nutritive salt (294 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 123.25 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64.75 mg/L $NaHCO_3$, 5.75 mg/L KCl) (ISO, 2006), until they reached a development stage appropriate for experimentation, i.e. stage 50, (Nieuwkoop and Faber, 1956). The larvae were fed every day on dehydrated aquarium fish food (TetraPhyll®).

2.3. Exposure conditions

Exposure began on larvae at stage 50 of the Xenopus development table (Nieuwkoop and Faber, 1956) characterized by the hind lim bud, constricted at the base. For each exposure time, larvae were chosen from the same hatch to reduce inter-animal variability and were placed in Pyrex crystallizing dishes containing 2 L of either reconstituted water (RW: normal tap water filtered through active charcoal, to which were added nutritive salts (ISO, 2006) corresponding to negative control, or RW supplemented with carbon nanotubes (0.1, 1 and 10 mg/L). Before tadpoles' exposure, each CNT vial was sonicated (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) for 5 min. The larvae were submitted to a natural light–dark cycle at 22.0 ± 0.5 °C during exposure.

For enzymatic assays and biochemical assays, 50 tadpoles were exposed in the same dish for each exposure condition and time: 0.1, 1 and 10 mg/L of MWCNTs at 2, 4, 8, 12 and 24 h of exposure (15 dishes). For each exposure time, a common control was carried out (5 dishes). All along the experiments, dishes were dark covered to prevent external disturbance. At the end of each exposure time, the larvae were frozen into liquid nitrogen and stored at -80 °C. Finally, five groups of ten tadpoles were taken from each dish and analyzed separately.

For Comet assays, larvae were exposed in groups of 25 animals in 5 L glass flasks containing 2 min L of RW (negative control), methyl methanesulfonate (MMS, [66-27-3], purity ~99%, Sigma France) at 6.24 mg/L (positive control), or different concentrations of MWCNTs (0.1, 1, 10 mg/L). To avoid possible artefact due to separate migration (eight different run), a negative control was realized for each MWCNTs exposure conditions. A positive control (PC) has been performed in order to check the sensitivity of the amphibian larvae and to validate the experiments. For the Comet assays, the concentrations of MWCNTs tested were 0.1, 1 and 10 mg/L during 2, 4, 8 and 24 h. At the end of each exposure time, 5 tadpoles were randomly sampled (including controls).

2.4. Acute toxicity

Acute toxicity to the larvae exposed to 0.1, 1 and 10 mg/L of MWCNTs was examined for 2, 4, 8, 12 and 24 h by visual inspection: death, no growth (severe toxicity) and abnormal behavior/reduced size/diminished food intake (weak toxicity), according the ISO recommendations (ISO, 2006). Recording the toxicity at each experimental time in treated larvae ensured that both biochemical and Comet assays were performed under conditions that were not acutely toxic.

2.5. Biochemical assays

2.5.1. H_2O_2 evaluation

Hydrogen peroxide was measured according to Islam et al. (2008). Tadpoles were homogenized in trichloroacetic acid (TCA) 0.1% (W/V) and centrifuged at 13,500*g* for 20 min. The mixture assay contained 25% of the supernatant added to 25% of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0, Sigma) and 50% of 1 M KI (Sigma, France). Absorbance was determined at 390 nm and the content of H_2O_2 was evaluated using a standard curve under the same conditions.

2.5.2. Enzyme activities assay

Tadpoles were homogenized in ice-cold 50 mM phosphate buffer Na/K (pH 7) containing 1.15% KCl, 0.25% protease inhibitor cocktail, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and 0.1 mM aprotinin. The homogenate was centrifuged at 15,800*g* for 20 min at 4 °C. The protein contents were determined spectrophotometrically (Helios Alfa, Thermo Electron Corporation, USA) according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA, Sigma, France) as standard. The supernatant was also used for antioxidant enzyme activity. GR activity was assayed according to Dringen and Gutterer (2002), using Glutathione Reductase Assay Kit (GRSA-1KT, Sigma, France). The reaction was monitored by following the change in at 340 nm as oxidized glutathione-dependent oxidation of NADPH for 1 min. CAT activity was estimated spectrophotometrically using Aebi method (Aebi, 1984). The decomposition of H_2O_2 was followed at 240 nm (extinction coefficient of 39.4 M^{-1} cm^{-1}) for 1 min at 25 °C. SOD activity was measured using a SOD assay kit (19160-1KT-F, Sigma, France) according to Mockett et al. (2002), based on the production of O_2^{-} by xanthine–xanthine oxidase, which reduces nitroblue tetrazolium (NBT) to blue formazan. Inhibition of the reaction by SOD was monitored spectrophotometrically at 560 nm for 6 min.

2.6. Comet assay

The Comet assay, also known as the single-cell gel test (SCGE), was performed according to alkaline procedure described by Singh et al. (1988), with adaptation to *Xenopus laevis* larvae (Mouchet et al., 2005). After cardiac puncture on larvae exposed to MWCNTs (0.1, 1 and 10 mg/L) at 2, 4, 8 and 24 h, an aliquot of heparinised blood cell suspension was immediately diluted 50-fold in Phosphate buffered saline (PBS). The slides were then treated according to Mouchet et al. (2005). The electrophoresis was carried out in alkaline buffer [4 °C; 0.3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA (pH > 13)] for 20 min by applying and electric field of 20 V and adjusting the current to 30 mA. Five larvae were used for NC (negative control), PC (positive control) and MWCNTs conditions. Slide analysis was performed using an epi-fluorescence microscope (LSM 410 ZEISS microscope) at 400× magnification, after staining the slides with a 0.05 mM ethidium bromide solution. DNA

strand breakage was quantified as the tail DNA percentage and tail length (TL: distance between the head and the last DNA fragment) using an image-analysis system (Komet 5.5; Andor Technology®). For each individual, two slides were coded and 50 cells were randomly analyzed in each slide. The data obtained from two slides per animal were pooled for the final processing. Comets with completely fragmented DNA (hedgehog-like figures with no apparent head) that could not be measured by the image analysis system were not taken into account (Hartmann et al., 2003).

For this experiment, erythrocyte viability was determined using the Trypan blue exclusion test, with samples showing $<90\%$ viability discarded (Collins, 2002). In this way, Comet assay has not been carried out in erythrocytes of larvae exposed to 10 mg/L of MWCNTs.

2.7. ICP-MS analysis

MWCNTs (0.1, 1 and or 10 mg/L) were placed in pyrex crystallizing dishes containing 2 L of RW. Before contamination, each CNT vial was sonicated (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 KHz) for 5 min. No CNT was added for the negative control.

After 24 h, water was recovered, filtered through 0.2 μm filters (514-0061, VWR, France), acidified with 3 drops of 69% HNO_3 (309079, Sigma, France) and stored at 4 °C. Before analysis 0.05% of In/Re and 0.3% of HNO_3 at 69% were added to 10 ml of samples. Analysis of metallic trace elements (Al, Fe and MO) was performed by ICP-MS Agilent 7500ce quadruple equipped with a collision cell He. The ionization source device consists of an inductively coupled plasma generator coil (auto frequency generator adjusted 27 MHz 1550 W). The analyzer comprises a quadruple mass spectrometer for sorting ions by mass / electrical load (about 1 amu resolution). The detector is comprised of a dual mode analog and pulse counting (electron multiplier) with counting time of 0.1 ms for major elements, 0.3 ms for trace elements and 1.5 s for the ultra-trace elements. The collision cell gas (He) eliminates some of the polyatomic interference by kinetic energy discrimination (KED). To minimize interference related to oxide ions and charged doubling the reports CeO+/Ce+ and Ce++/Ce+is controlled and was, respectively, <1percent and <3percent. Typical detection limits were between 0.1 ng/kg and 100 ng/kg. Indium and rhenium were used as internal standards to correct for instrumental drift and matrix effects.

2.8. Larvae macro-observations

Macro observations of larvae have been realized on larvae used for the Comet assay (after blood sampling preventing stress on animals for comet analysis). The general aspect of the larvae exposed to MWCNTs was visually compared to that of negative control group under microscope (Olympus CX41) at X4 magnification.

2.9. Statistical analysis

Results (enzymatic, biochemical, ICP-MS, and COMET) are all presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Comparison between group pairs is achieved with Student *t*-test. Normality and homogeneity of variances are checked by using Shapiro–Wilk and *F* tests, respectively. Data transformation is used to correct (when required) deviation from normality and to stabilize the variance. We considered power transforms which best candidates were chosen as guided by the Box–Cox transformation procedure. The significance level is 5percent ($p<0.05$). Statistical computations were achieved using R Development Core Team (2012).

3. Results

3.1. Acute toxicity

No signs of acute toxicity were observed for *Xenopus* tadpoles exposed to MWCNTs to 0.1–1 and 10 mg/L, whatever the exposure time (2, 4, 8, 12 and 24 h).

3.2. H_2O_2 production

Results obtained are represented in Table 1. Compared to the control, tadpoles exposed to 0.1 mg/L of MWCNTs showed no significant H_2O_2 production. At 1 mg/L of MWCNTs, high H_2O_2 production was observed from 4 h of exposure ($p<0.05$). This treatment showed H_2O_2 production of 3 ± 0.3 mmole/mg of fresh weight (FW), while control was 1.1 ± 0.1 mmole/mg of FW. This production remained constant until 12 h, then decreased to 1.7 ± 0.1 mmole/mg of FW at 24 h ($p<0.05$). With 10 mg/L of MWCNTs, H_2O_2 production was 2.6 ± 0.5 mmole/mg of FW after only 2 h of exposure whit control concentrations at 1.2 ± 0.3 mmole/mg of FW. The H_2O_2 production decreased until 8 h, and then rose 2.2 ± 0.1 mmole/mg of FW at 12 h to ($p<0.05$). After 24 h, H_2O_2 production diminished significantly to production very near the negative control (1.3 ± 0.1 mmole/mg of fresh weight vs. 1.3 ± 0.1 mmole/mg of fresh weight).

Table 1
Hydrogen peroxide production in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to three different concentrations of MWCNTs.

Time	CTRL	MW 0.1	MW 1	MW 10
2	1.2 ± 0.3^a	1.9 ± 0.2^a	1.3 ± 0.3^a	2.6 ± 0.5^b
4	1.1 ± 0.1^a	0.9 ± 0.1^a	3.0 ± 0.3^b	1.3 ± 0.1^c
8	2.2 ± 0.2^a	2.0 ± 0.1^a	2.9 ± 0.1^b	2.1 ± 0.4^a
12	1.9 ± 0.1^a	1.7 ± 0.1^a	3.2 ± 0.2^b	2.2 ± 0.1^c
24	1.3 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^a	1.7 ± 0.1^b	1.3 ± 0.1^a

Hydrogen peroxide production in *Xenopus leavis* tadpoles exposed during 2, 4, 8, 12 and 24 h to 0.1, 1 and 10 mg/L of MWCNTs compared to negative control condition (CTRL).
Values expressed as mean ± SEM. Concentrations are in millimole/mg of fresh weight ($n=5$).
Means of the same row followed by different letters differ significantly ($P<0.05$).

3.3. Enzyme activities

Changes in the activity levels of antioxidant enzymes in *X. laevis* tadpoles in the presence of MWCNTs are shown in Fig. 1. At 0.1 mg/L of MWCNT, induction of GR activities started significantly after 8 h ($p<0.05$) of exposure to MWCNTs to reach 84.3 ± 2.3 μU/mg protein, then gradually decreases to 38.3 ± 1.6 μU/mg protein at 24 h. With 1 mg/L of MWCNTs, both GR and CAT activities were significantly induced at 4 h of exposure to MWCNTs to reach 123.3 ± 16.8 μU/mg of protein and 257.2 ± 27.1 mU/mg of protein, respectively. After 24 h, the GR and CAT activities decreased to 39.7 ± 1.7 μU/mg of protein and 73.2 ± 5.5 mU/mg of protein, respectively. When larvae were exposed to 10 mg/L of MWCNTs, all antioxidant enzyme activities (CAT, GR and SOD) were significantly induced after only 2 h of exposure to MWCNTs. In presence of carbon nanotubes in the exposure media, GR was 94.3 ± 5.3 μU/mg of protein, CAT was 147.1 ± 3.3 mU/mg of protein and SOD was 7.1 ± 0.7 U/mg of protein. The controls were 53.6 ± 7.5 μU/mg of protein, 31.7 ± 0.9 mU/mg of protein and 3.1 ± 0.3 U/mg of protein, respectively. A slow decreased was observed for all GR activities until 24 h. For CAT and SOD activities, the same fluctuations in time was observed with a significant enhancement of values at 8 h (109.9 ± 2.6 mU/mg of protein and 5.5 ± 0.2 U/mg of protein respectively) and 24 h (only significant for SOD activity).

3.4. DNA damage

Significant DNA damages were recorded after 4–24 h in larvae exposed to 0.1 mg/L of MWCNTs (Table 2), compared to the negative control, for all parameters (Tail DNA and TL). Maximum Levels of DNA damage were observed at 24 h of exposure considering Tail DNA (14.3 ± 0.7), and after 4 h considering TL (70.7 ± 1.3). In contrast, no significant DNA damage was measured after 2 and 8 h of exposure to 0.1 mg/L of MWCNTs. At 1 mg/L of MWCNTs, significant DNA damages were recorded for all exposure times and parameters, with maximal DNA damages at 24 h according the Tail DNA (34.9 ± 1.4) and TL (55.8 ± 0.9) values. Results show no significant evolution of basal DNA damage (negative control) between each experimental time exposure, nor evolution of MMS-induced DNA damage

3.5. ICP-MS analysis

The measurement of metal concentrations (Al, Fe, Mo) released in RW containing, 0.1, 1 or 10 mg/L of MWCNTs after 24 h are presented in Table 3. Results show no significant release of Al and Fe compared to the control, for all MWCNTs concentrations in RW. In the case of Mo, a statistically significant, but very low, amount is released by MWNCTs at 1 mg/L (0.5 ± 0.02 μg/L) and 10 mg/L (2.6 ± 0.04 μg/L), compared to the control (0.2 ± 0.02 μg/L).

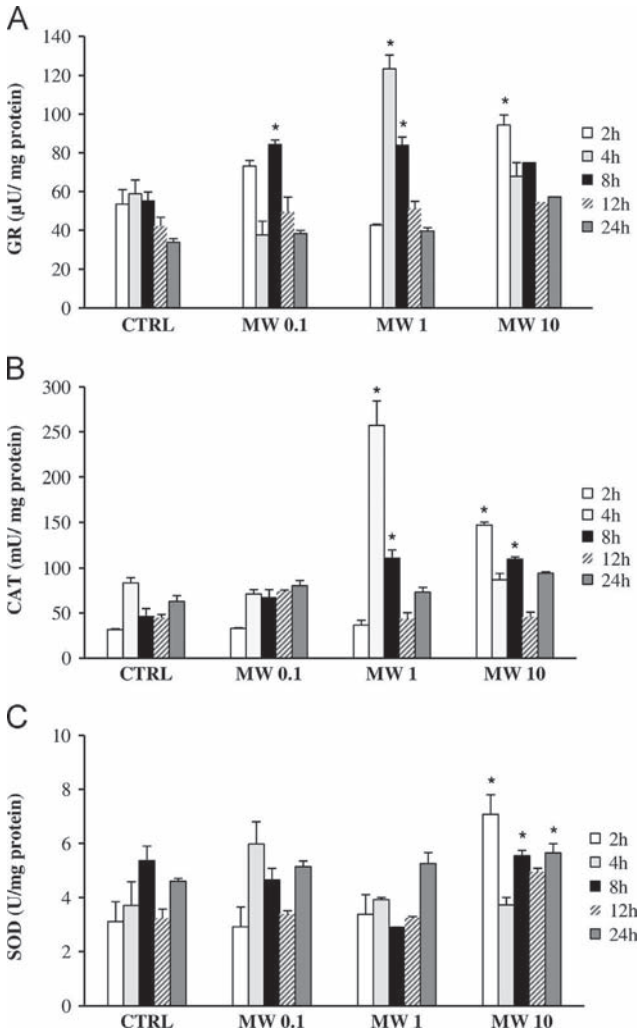

Fig. 1. Antioxidant enzymes activities in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to different concentrations of MWCNTs. Antioxidant enzymes activities in *Xenopus laevis* tadpoles after exposure to 0.1, 1 or 10 mg/L of raw MWCNTs during 2, 4, 8, 12 and 24 h. (A) Glutathion reductase activity, (B) Catalase activity, (C) Superoxyde dismutase activity. Values expressed as mean ± SEM. * indicates a significant induction ($P < 0.05$) of antioxidant enzyme activities compared to the CTRL: Negative control, MW: MWCNTs.

3.6. Macroscopic observations

Macroscopic observations of tadpoles exposed to 0.1 and 1 mg/L during 2, 4, 8 and 24 h are shown in Figs. 2 and 3. Fig. 2 shows presence of brown masses in basket gills and intestine at 24 h of exposure in the control tadpoles. In larvae exposed to MWCNTs, black masses of carbon particles are suspected after 2 h of exposure in basket gills and intestine at 0.1 mg/L and increase with time up to 24 h. However, the agglomerated MWCNTs are not visible any more after 24 h in intestine. Larvae exposed to 1 mg/L of MWCNTs during 24 h showed the presence of agglomerated nanotubes on the surface of gills (Fig. 3D). These black spots are not to be confused with the natural pigmentation of *Xenopus laevis* tadpoles. These agglomerated MWCNTs (as black mass) are also visible under microscope on gill arches after dissection in larvae exposed for 24 h to 1 mg/L (Fig. 3E). Presence of MWNCTs can be suspected as a result of their agglomeration and their increased dimensions in agglomerates size.

4. Discussion

The result of the present study highlight an increase of the oxidative stress in *Xenopus laevis* tadpoles in presence of MWCNTs. Oxidative stress is defined as an unbalance between pro- and anti-oxidant systems. It corresponds to a disturbance of the redox status of the cells, and is related to an increase of reactive oxygen species (ROS) such as O_2^-, singlet oxygen (½O_2), hydroxyl radical. OH and hydrogen peroxide (H_2O_2). Reactive oxygen species are

Table 3
Concentrations of MWCNTs released metals in RW after 24 h.

	CTRL	MW 0.1	MW 1	MW 10
Al	30.7 ± 1.2	32.1 ± 0.3	32.4 ± 0.4	31.8 ± 0.7
Fe	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1
Mo	0.2 ± 0.02^a	0.2 ± 0.03^a	0.5 ± 0.02^b	2.6 ± 0.04^c

Concentrations of released metals after 24 h in water containing 0.1, 1 and 10 mg/L of MWCNTs, compared to negative control condition (CTRL), measured by ICP-MS. Values expressed as mean ± SEM. Concentrations are in μg/L ($n=3$), means of the same row followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).
Al: aluminum, Fe: iron, Mo: molybdenum.

Table 2
Comet assay parameter variation in *Xenopus laevis* blood after exposure to MWCNTs.

Time (hours)	Measured parameter	PC	MW 0.1		MW 1	
			NC	MW	NC	MW
2	Tail DNA	22.3 ± 1.1*	7.4 ± 0.4	8.7 ± 0.5	3.1 ± 0.2	22.3 ± 1.1*
	TL	50.9 ± 0.9*	30.2 ± 0.6	35.5 ± 0.7	24.2 ± 0.4	50.9 ± 0.9*
4	Tail DNA	17.5 ± 0.8*	5.1 ± 0.2	12.4 ± 0.6*	2.5 ± 0.2	17.5 ± 0.8*
	TL	48.1 ± 0.9*	50.8 ± 1.2	70.7 ± 1.3*	30.8 ± 0.6	48.1 ± 0.9*
8	Tail DNA	14.4 ± 0.8*	5.2 ± 0.3	7.5 ± 0.4	3.1 ± 0.2	14.4 ± 0.8*
	TL	49.1 ± 0.9*	37.3 ± 0.9	35.7 ± 0.7	29.8 ± 0.6	49.1 ± 0.9*
24	Tail DNA	34.9 ± 1.4*	5.0 ± 0.2	14.3 ± 0.7*	3.2 ± 0.2	34.9 ± 1.4*
	TL	55.8 ± 1.0*	40.9 ± 0.9	44.4 ± 0.8*	31.2 ± 0.7	55.8 ± 0.9*

Comet assay results in *Xenopus laevis* blood after exposure to MWCNTs. Mean values ± SEM of Tail DNA (percentage of DNA in the tail) and TL (Tail Length) in larvae reared for 2, 4, 8, and 24 h in 0.1 mg/L (A) and 1 mg/L (B) of MWCNTs.

* Indicates increased significant ($p < 0.05$) DNA damage relative to the negative control. NC/PC: negative/positive controls. Comet assay was not carried out on larvae exposed to 10 mg/L which erythrocyte viability was inferior to 90%.

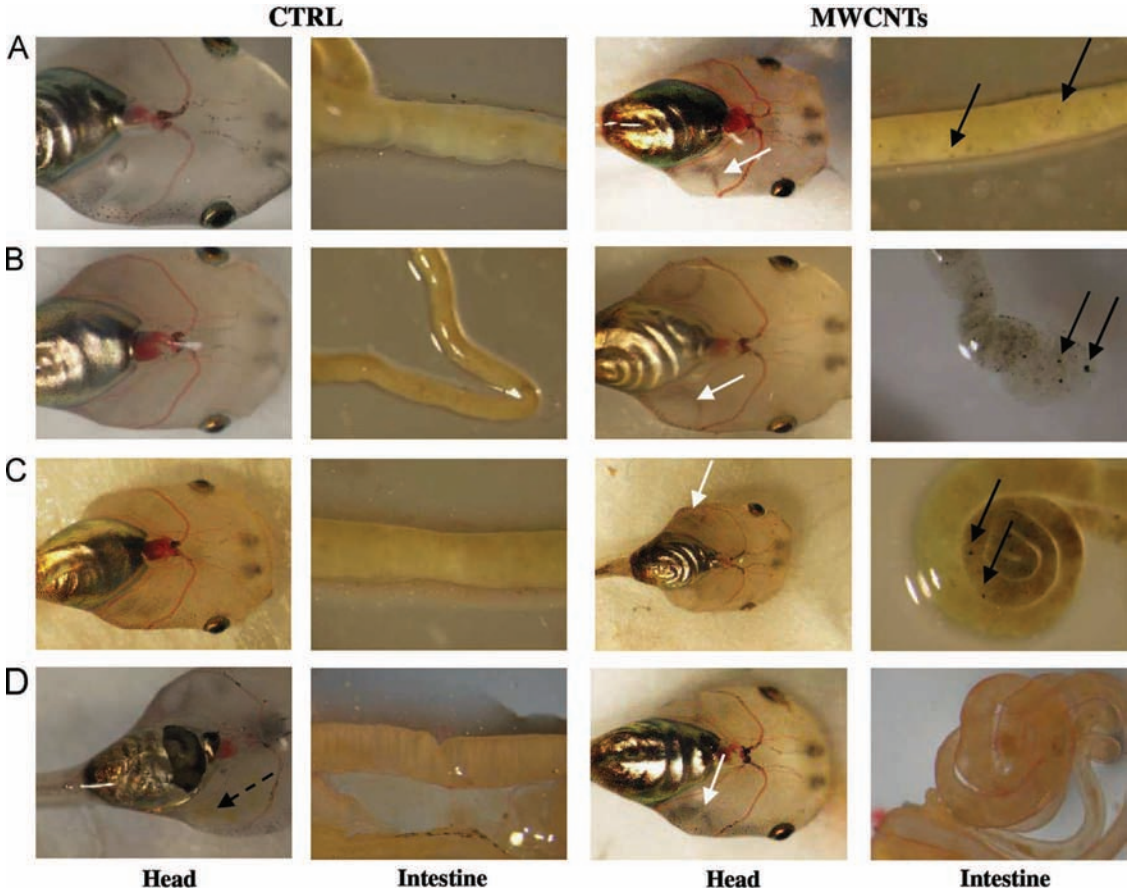

Fig. 2. Head and intestine macroscopic observations of *Xenopus laevis* larvae exposed or no to MWCNTs at 0.1 mg/L. Macroscopic observation of the Head and intestine fragment of *Xenopus* larvae after 2 (A), 4 (B), 8(C) and 24 h (D) of exposure to 0.1 mg/L of MWCNTs (MWCNT) compared to negative control larvae (CTRL). Black dotted arrow indicates the presence of brown mass of food (Tetraphyll reduced into powder) in the gill at the entire larval level in negative control condition after 24 h. White solid arrows indicate presence of dark masses of suspected agglomerated MWCNTs in gill area of MWCNT-exposed larvae. Black solid arrows show suspected agglomerated MWCNTs in the intestine after 2 h of exposure.

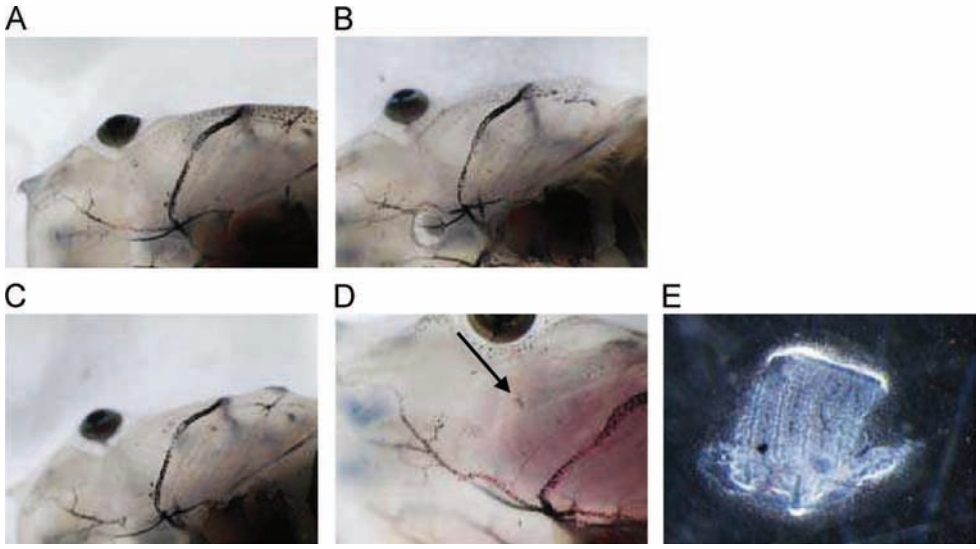

Fig. 3. Bronchial area microscopic observation of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to 1 mg/L of MWCNTs. Macroscopic observations of branchial area of *Xenopus* larvae after 2, 4, 8 and 24 h of exposure to 1 mg/L of MWCNTs. Head macro-observation after 2, 4, 8 and 24 h (A, B, C and D) of exposure to 1 mg/L. Larvae are observed in dorsal view. Eyes are recognized by their black spherical form. Gill areas are encircled by white dots. Presence of MWCNTs on the surface of gills may be suspected at the entire larval level under binocular (black arrows) after 24 h of exposure and must be not confused with natural pigmentation of *Xenopus* larvae. (E) Gill arch macro-observation after its dissection from larvae 24 h-exposed to 1 mg/L of MWCNTs. White arrow indicates agglomerated MWCNTs (as black mass) on dissected gill tissue suggesting presence of MWCNTs in gill arcs.

short lived, unstable, and highly chemically reactive molecules, possessing unpaired valence shell electrons. Although H_2O_2 is not a radical, it is a reactive species because of its higher activity than molecular oxygen. Although all of these oxygen-based toxic species are ROS but all ROS are not oxygen radicals.

In the present experimental conditions, a significant increase of H_2O_2 was observed at 4 h, when tadpoles were exposed to 1 mg/L of MWCNTs and remained significantly different from the control until 12 h. This production decreased after 24 h. For the highest MWCNTs concentration tested (10 mg/L), H_2O_2 production was significantly increased after 2 h and decreased rapidly after 8 h. A second significant, but attenuated, production of H_2O_2 was observed after 12 h. These results indicated that (i) H_2O_2 production does not follow a simple dose-effect relation, with a lag time shortened in relation with the MWCNTs concentration and (ii) the regulation of the H_2O_2 production occurs rapidly after tadpole's exposure. ROS represent a dynamic parameter; they are continuously generated and eliminated (Lushchak, 2011). Even if ROS are toxic for organisms, they play an important role in cell signaling and regulation, particularly in cell division and apoptosis. Therefore, it is of particular importance in constant metamorphosis state of larvae as *Xenopus laevis* tadpoles (Menon and Rozman, 2007). In addition, the fast response obtained in function of the concentration is not in accordance with the intensity of H_2O_2 production; since the maximum response (3.2 ± 0.2 mmole/mg FW) of H_2O_2 was obtain in presence of 1 mg/L of MWCNTs. These results indicate that in the presence of 10 mg/L MWCNTs, the maximum was obtained before 2 h. In this case, the end of the acute oxidative stress, would be observed as defined by Lushchak (2011). In the case of in vitro studies, the increase of intracellular ROS has been explained by the metal traces associated with commercial nanotubes (Pulskamp et al., 2007). In this study the absence of significant release of Al and Fe (the metal particles associated to MWCNTs catalyze process) in exposure medium (Table 3) supposed that they are biologically inert. In contrast, very low Mo concentrations are released in water exposure with 10 mg/L of MWCNTs, but do not correspond to higher enzymatic activities in larvae. Metals from catalysers would be not responsible of oxidative stress status in the present work.

The antioxidant system includes water soluble compounds as reduced glutathione, ascorbic acid and lipid-soluble molecules as carotenoids, retinol and α-tocopherol. They generally operate as free radical scavengers but they also serve as cofactor for antioxidant enzyme such as glutathione. The most important enzymatic pathway for ROS defense are SOD that convert O_2^- into H_2O_2 and CAT which convert H_2O_2 in h_2o and O_2 (Donaldson et al., 2006). In the addition of the CAT action, GPX is involved in the mobilization of H_2O_2 by using reduced glutathione (GSH) as electron donor. This produces oxidized glutathione (GSSG) that can be reduced by the action of GR enzyme. As for H_2O_2 production, induction of antioxidant enzyme activities does not follow a simple dose-effect relation. GR activity was induced with 0.1 mg/L of MWCNTs only after 8 h. For 1 mg/L, the induction appears significant after 4 h (maximal level) and 8 h, then decreased after 24 h. For 10 mg/L, the induction was only significant after 2 h, with a rapid decrease after 4 h. In addition, SOD activity was only significant in presence of 10 mg/L of MWCNTs. Despite the high H_2O_2 production observed in tadpoles exposed to 1 mg/L of MWCNTs, the SOD activity remains low. H_2O_2 has been described to modulate the response of enzyme involved in the regulation of the oxidative stress (Lushchak, 2011). When the level of superoxide is low, the peroxidase reaction will dominate, hence regulate dismutase activity by substrate inhibition and therefore reduce the level of H_2O_2 (Gottfredsen et al., 2013). The absence of significant SOD activation in presence of low MWCNTs concentrations (0.1 and 1 mg/L) suggest different possible sources of H_2O_2 production. Several enzymes, such as glucose oxidase, uric acid or amino acid oxidase in mammalian cells, produce H_2O_2 directly (Cadenas and Davies, 2000; Szatrowski and Nathan, 1991). These enzymes are generally located in cellular organelles as peroxisomes. Monoamine oxidase present in the mitochondrial membranes is also involved in hydrogen peroxide production (Edmondson, 2014; Sandri et al., 1990).

Nanomaterials, and particularly carbon nanotubes, have been described to induce oxidative stress in different organisms and cell types (Shvedova et al., 2012). They can activate the inflammosome by interaction with phagocytes leading to ROS production. CNTs could also interfere directly with cell membranes, producing cell damages at the origin of oxidative stress. In the same way, an alteration of the mitochondrial respiratory chain could promote a rise of ROS production. In addition, Fenoglio et al. (2006) reported that MWCNTs were effective scavengers of both O_2^- and OH free radicals, regardless of how the species were generated. All these data suggest a complex interaction between MWCNTs and tadpoles disturbing the redox statute by both inducing and/or scavenging ROS.

Although it does not constitute the only genotoxic pathway, oxidative stress was described as being mainly implied in DNA-damage formation (Halliwell, 1990; Petersen and Nelson, 2010). This can induce primary damages such as oxidized base, cross-links, double- and single-strand breaks, alkali-labile sites, and excision repair sites. In this work, alkaline comet assay has been used to detect primary lesions in blood erythrocytes tadpoles. Study of erythrocytes viability (blue trypan exclusion) in larvae exposed to MWCNTs, revealed a decreased of cellular viability at 10 mg/L from 2 h of exposure, preventing the realization of the Comet assay as recommended by Collins (2002). Significant DNA damages, compared to the negative control, appear after 4 h to 24 h of larvae exposed to 0.1 mg/L of MWCNTs, whereas no DNA damages are measured after 2 h and 8 h. Moreover, in larvae exposed to 1 mg/L of MWCNTs, DNA damages are significant at all experimental times. In Table 2 comparison between mean values for both MWCNTs concentrations (0.1 and 1 mg/L) are shown with exposure time. DNA damage induction at 1 mg/L of MWCNTs is higher than that of 0.1 mg/L, suggesting an increasing dose-response, regardless parameter and exposure time. This maximal response of DNA damages to 1 mg/L would correspond to the higher registered enzymatic activity and H_2O_2 production. Significant enzymatic activities and DNA damages are not induced at the same times. This observed shift could be due to the fact that DNA damages are evaluated in erythrocytes circulating blood of larvae, whereas enzymatic activities and H_2O_2 production are measured at the entire larval level. Nevertheless, profiles of DNA damages, H_2O_2 production and enzymatic activities in course of time show fluctuations which are characteristics of oxidative stress response in relation with the continuous balance between damage and compensation process. This includes the DNA repair systems based on excision repair enzymes at the origin of DNA breaks also measured with Comet assay (Petersen and Nelson, 2010). In blood erythrocytes, DNA damages are detected earlier than enzymatic induction in entire tadpoles. In this way, Comet assay could be considered as a more sensitive tool than enzyme induction measurement to evaluate the potential effect of MWCNTs on oxidative stress. The in vivo micronucleus assay in amphibians detects fixed DNA damages persisting after at least one mitotic cycle, i.e. chromosomal and/or genomic mutations (Mouchet et al., 2005). Alkaline Comet assay detects primary DNA damages which represent reversible damages (Moretti et al., 2002; Van Goethem et al., 1997). Unlike the micronucleus assay, which highlights the cumulative effect of chronic exposure, the Comet assay provides instantaneous information about the current exposure (Maluf and Erdtmann, 2000). This method, however, does not

allow for predictive information on the possible DNA damage evolution in transmissible mutations from cell generation to another.

Macroscopic observation under binocular of tadpoles exposed to MWCNTs suggests a presence of agglomerated MWCNTs with food particles on the gills surface from 1 mg/L (Fig. 3) and into intestine (data not shown). Agglomerated MWCNTs were also visible from 0.1 mg/L into intestine after 2, 4 and 8 h in a time-dependent manner (Fig. 2) and were rapidly excreted in mass not to be more visible after 24 h. Resolution of binocular is limited and CNTs must be enough agglomerated in mass to be visible under microscope. Nevertheless, gills and intestine have already been described as entry pathway in *Xenopus laevis* larvae when exposed 12 days to MWCNTs exposure (Bourdiol et al., 2013; Mouchet et al., 2010). However, it has not been demonstrated to date, the presence of CNTs in enterocytes, hepatocytes, branchial and blood cells using specific microscopy tools such as Transmission Electronic Microscopy and Raman spectroscopy. Anyway, In *Xenopus* larvae, the pathway of contaminant entry from exposure media is double: dermal (integument and gills) and breeding exposure. Indeed, *Xenopus laevis* larvae are detritivorous (Bury and Whelan, 1984), gill-breathing, microphageous feeders, thus leading to high ingestion rates of suspended particles (Wassersug, 1975), especially particles of food susceptible to bind CNTs.

It could be hypothesized that CNTs can be adsorbed on the Xenopus larval surface and especially on gill surfaces, inducing gill clogging, at the origin of gas exchanges disturbance. Gas alterations could in turn promote larval hypoxia and oxidative stress (Lushchak, 2011; Tiedke et al., 2014) at the origin of DNA damages, and induction of antioxidant enzymes.

5. Conclusion

In conclusion, these results demonstrated that exposure of *Xenopus laevis* tadpoles to MWCNTs induced an increase of oxidative stress in entire larvae and DNA break-down in blood erythrocytes. However, the induction of oxidative stress and DNA damages appears to be closely related to the concentration of CNTs in the exposure media. Data also demonstrated that Comet assay is a more sensitive method than anti-oxidative enzyme activity. The presence of nanotubes in the gill baskets suggest a possible hypoxia that must be confirmed by additional work.

Aknowledgments

The authors acknowledge the Groupement de Recherche de Lacq (Arkema France) for the supplying of MWCNT suspensions. Thanks to David Baquet (ECOLAB UMR CNRS 5245) for his technical help in ICP analysis. This study was achieved in the framework of the public/private joint research laboratory NAUTILE (NAnotUbes et écoToxIcoLogiE; Arkema France-CNRS/INPT/UPS). The English language of the manuscript has been corrected by the native English Rashard Khadaroo (Université Paul Sabatier, Toulouse, France).

We dedicate this publication to our friend and colleague Mr. FAUCON Bruno who has passed away on December 17, 2013.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.010.

References

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105, 121–126.
Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., Mustelin, T., 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. Toxicol. Lett. 160, 121–126, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.06.020.
Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. Carbon 54, 175–191, http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.11.024.
Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
Bury, R.B., Whelan, J.A., 1984. Ecol. Manage. Bullfrog.
Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic. Biol. Med. 29, 222–230.
Chen, C.-Y., Jafvert, C.T., 2010. Photoreactivity of carboxylated single-walled carbon nanotubes in sunlight: reactive oxygen species production in water. Environ. Sci. Technol. 44, 6674–6679, http://dx.doi.org/10.1021/es101073p.
Collins, A.R., 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. Methods Mol. Biol. 203, 163–177, http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163.
Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., Alexander, A., 2006. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. Toxicol. Sci. 92, 5–22, http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfj130.
Dringen, R., Gutterer, J.M., 2002. Glutathione reductase from bovine brain. Methods Enzymol 348, 281–288.
Du, J., Wang, S., You, H., Zhao, X., 2013. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 451–462, http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.007.
Edmondson, D.E., 2014. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. Curr. Pharm. Des. 20, 155–160.
Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., Fubini, B., 2006. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? Free Radic. Biol. Med. 40, 1227–1233, http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.010.
Gottfredsen, R.H., Larsen, U.G., Enghild, J.J., Petersen, S.V., 2013. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. Redox Biol. 1, 24–31, http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.004.
Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic. Res. Commun. 9, 1–32.
Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. 281, 9–19.
Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis 18, 45–51, http://dx.doi.org/10.1093/mutage/18.1.45.
Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A., 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic. Biol. Med. 28, 1456–1462.
Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S., Li, J., 2008. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of Elsholtzia argyi. J. Hazard. Mater. 154, 914–926, http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.121.
Patlolla, A.K., 2013. Environmental toxicity monitoring of nanomaterials using vicia faba GENE-TOX assay. J. Nanomed. Nanotechnol., 04, http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000e129.
Krysanov, E.Y., Pavlov, D.S., Demidova, T.B., Dgebuadze, Y.Y., 2010. Effect of nanoparticles on aquatic organisms. Biol. Bull. 37, 406–412, http://dx.doi.org/10.1134/S1062359010040114.
Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. Environ. Sci. Technol. 46, 8458–8466, http://dx.doi.org/10.1021/es301802g.
Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 101, 13–30, http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
Maluf, S.W., Erdtmann, B., 2000. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. Mutat. Res. 471, 21–27.
Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153, 83–104.
Menon, J., Rozman, R., 2007. Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 145, 625–631, http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.011.
Mitchell, L.A., Gao, J., Wal, R.V., Gigliotti, A., Burchiel, S.W., McDonald, J.D., 2007. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. Toxicol. Sci. 100, 203–214, http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm196.
Mockett, R.J., Bayne, A.-C.V., Sohal, B.H., Sohal, R.S., 2002. Biochemical assay of superoxide dismutase activity in Drosophila. Methods Enzymol. 349, 287–292.
Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., 2005. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. Toxicol. Lett. 155, 377–384, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.11.004.

Moretti, M., Marcarelli, M., Villarini, M., Fatigoni, C., Scassellati-Sforzolini, G., Pasquini, R., 2002. in vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. Toxicol. in vitro 16, 81–88.

Mouchet, F., Gauthier, L., 2013. Genotoxicity of Contaminants: Amphibian Micronucleus Assays. In: Férard, J.-F., Blaise, C. (Eds.), Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer, Netherlands, pp. 547–558.

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. Environ. Toxicol. 20, 74–84, http://dx.doi.org/10.1002/tox.20080.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2010. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomedicine (London) 5, 963–974, http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.60.

Mwangi, J.N., Wang, N., Ingersoll, C.G., Hardesty, D.K., Brunson, E.L., Li, H., Deng, B., 2012. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1823–1830, http://dx.doi.org/10.1002/etc.1888.

Nel, A., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311, 622–627, http://dx.doi.org/10.1126/science.1114397.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J, 1956. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin)—A Sytematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. North-Holland Publishing Company for the Ubrecht Laboratory Utrecht, (ed.). Amsterdam.

Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. 398, 613–650, http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3881-7.

Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K., 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Nat. Nanotechnol. 3, 423–428, http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2008.111.

Pulskamp, K., Diabaté, S., Krug, H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol. Lett. 168, 58–74, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.001.

R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0.

Sandri, G., Panfili, E., Ernster, L., 1990. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca^{2+} efflux. Biochim. Biophys. Acta 1035, 300–305.

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E., 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharmacol. 261, 121–133, http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.023.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184–191.

Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res. 51, 794–798.

Thurnherr, T., Brandenberger, C., Fischer, K., Diener, L., Manser, P., Maeder-Althaus, X., Kaiser, J.-P., Krug, H.F., Rothen-Rutishauser, B., Wick, P., 2011. A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro. Toxicol. Lett. 200, 176–186, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.012.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206–221.

Tiedke, J., Thiel, R., Burmester, T., 2014. Molecular response of estuarine fish to hypoxia: a comparative study with Ruffe and Flounder from field and laboratory. PLoS One 9, e90778, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090778.

Van der Zande, M., Junker, R., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., 2011. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. Tissue Eng. Part B Rev. 17, 57–69, http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0472.

Van Goethem, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt–tungsten carbide. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 392, 31–43, http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00043-8.

Wassersug, R.J., 1975. The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in Anurans. Am. Zool. 15, 405–417, http://dx.doi.org/10.1093/icb/15.2.405.

Zhao, X., Liu, R., 2012. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. Environ. Int. 40, 244–255, http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.12.003.