Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES PHYSIQUES À FINALITÉ SPÉCIALISÉE EN PHYSIQUE DU VIVANT

Comparaison des techniques d'analyse PIXE et AAS pour la quantification de l'internalisation de nanoparticules ZnO dans des cellules A549

Schoenauen, Lucas

Award date:
2020

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 03. Jul. 2025

Facultés des sciences

COMPARAISON DES TECHNIQUES D'ANALYSE PIXE ET AAS POUR LA QUANTIFICATION DE L'INTERNALISATION DE NANOPARTICULES ZNO DANS DES CELLULES A549

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade académique de
Master en Sciences Physique – Finalité Spécialisée

Lucas Schoenauen

Juin 2020

UNIVERSITE DE NAMUR
FACULTE DES SCIENCES
Enseignement du Département de Physique
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.90 - Téléfax : + 32(0)81.72.44.64
E-mail : enseignement.physique@unamur.be - http://www.unamur.be

Comparaison des techniques d'analyse PIXE et AAS pour la quantification de l'internalisation de nanoparticules de ZnO dans des cellules A549

Schoenauen Lucas

Résumé

Les nanoparticules (NPs), présentes en quantité grandissante dans notre environnement depuis le développement massif des nanotechnologies au XXIe siècle, sont amenées à entrer en contact avec notre organisme. Différentes recherches ont démontré la toxicité de certaines d'entre elles. Il est dès lors primordial de pouvoir les détecter dans les tissus biologiques afin de déterminer si les nanoparticules peuvent être responsables de divers dommages. Un exemple de cet engouement est le nombre de projets de recherche européens sur le thème de la *nanosafety* : 17 sont toujours en cours et 16 sont déjà finis pour un budget d'une dizaine de millions d'euros par projet. Les NPs, présentes en quantités infimes, demandent des techniques d'analyse très sensibles aux traces pour être détectées. Par exemple, l'AAS, une technique bien documentée et maîtrisée permet la détection de traces métalliques à des concentrations de l'ordre du ppm atomique mais ne peut détecter qu'un seul élément à la fois. Aussi, il y a la PIXE : une technique d'analyse très sensible aux traces d'éléments de Z>11 avec une sensibilité de l'ordre du ppm massique. L'avantage de la PIXE est qu'elle permet de détecter plusieurs éléments simultanément. La complémentarité apparente de ces deux techniques nous a incité à les comparer afin de vérifier qu'elles donnent toutes les deux les mêmes résultats. Pour cela, l'idée de ce mémoire est d'incuber des cellules du cancer du poumon A549 avec des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) pour avoir un marqueur visible tant en AAS qu'en PIXE. Les résultats préliminaires de ce mémoire présentent une bonne corrélation entre la PIXE et l'AAS pour des échantillons sans cellules. Cependant, en raison de la crise sanitaire due au Covid-19, les analyses des échantillons avec cellules pour la PIXE n'ont pas pu être effectuées. Ce manuscrit se compose d'une recherche bibliographique complète, de résultats préliminaires ainsi que d'un certain nombre d'idées à mettre en œuvre afin d'arriver à une comparaison complète entre les techniques AAS et PIXE.

Mémoire de Master en Sciences Physiques - Finalité Spécialisée
Juin 2020

Promoteur : J. Colaux
Co-promotrice : A.-C. Heuskin

UNIVERSITE DE NAMUR
FACULTE DES SCIENCES
Enseignement du Département de Physique
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.90 - Téléfax : + 32(0)81.72.44.64
E-mail : enseignement.physique@unamur.be - http://www.unamur.be

Comparison of PIXE and AAS analysis for the quantification of the uptake of ZnO nanoparticles by A549 lung tumor cells

Schoenauen Lucas

Abstract

Nanoparticles (NPs), present in increasing quantities in our environment since the massive development of nanotechnologies in the 21st century, are brought into contact with our body. Various studies have shown the toxicity of some of them. It is therefore essential to be able to detect them in biological tissues in order to determine if these nanoparticles can be responsible for various damages. An example of this craze is the number of European research projects on the nanosafety topic: 17 are still in progress and 16 are already finished for a budget of about 10 million euros per project in average. NPs, present in tiny quantities, require very sensitive analysis techniques to be detected. For example, AAS, a well-established technique procedure, allows the detection of metal trace in the at at.ppm range but can only detect one element at a time. Also, there is PIXE: a technique very sensitive to trace elements with Z>11 at the wt.ppm range. The advantage of PIXE is that it can detect multiple traces simultaneously. The apparent complementarity of these two techniques prompted us to compare them to assert that they both give the same results. To do this, the main idea of this master thesis is to incubate A549 lung carcinoma cells with zinc oxide nanoparticles (ZnO) to have a marker which can be seen both in AAS and PIXE. The preliminary results of this master thesis show a good correlation between PIXE and AAS for no-cells samples. However, due to the Covid-19 health crisis, analyzes of cell samples in PIXE could not be performed. This master thesis is therefore intended to lay the ground for further studies on this subject. It consists of a complete bibliographic research, preliminary results and a few ideas to be implemented in order to carry out a complete comparison between the two techniques.

Master thesis in physics
June 2020

Supervisor: J. Colaux
Co-supervisor: A-C. Heuskin

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier mon promoteur, Julien Colaux, pour son implication dans ce mémoire, sa disponibilité et pour les mesures PIXE. Nos discussions furent très enrichissantes tant d'un point de vue scientifique que personnel. Je remercie aussi ma co-promotrice Anne-Catherine Heuskin pour sa relecture du manuscrit et ses idées. Je tiens également à remercier Jorge pour son aide sur la CLS et la préparation des échantillons PIXE. J'aimerais aussi remercier Sébastien pour son aide tout au long du mémoire et Anne-Catherine Wéra pour son aide pour la partie biologique. Je voudrais aussi remercier Pierre Cambier pour son aide avec l'AAS, Ornella pour la CPS et Margot pour les mesures du potentiel zêta. Je souhaite aussi remercier Louis, Emile et Boulbi pour les mesures XPS et leur interprétation. Un grand merci à Tijani pour la conception du porte-échantillon compatible avec le SpeedVac. Je remercie aussi Corry du service de microscopie électronique pour les images HRTEM. Enfin, merci à ma sœur et à mon père pour les dernières relectures de mon orthographe.

Merci à toute l'équipe du LARN pour leur accueil et leur bonne ambiance. Je n'oublie pas mes camarades de master avec qui j'ai passé deux belles années et un beau voyage en Allemagne.

Table des matières

Table des abréviations 2
Table des figures 3
1 Introduction 5
2 PIXE et AAS dans la littérature 9
3 Matériel et méthodes 14
3.1 Choix des nanoparticules 14
3.2 Caractérisation des nanoparticules 16
3.3 Cellules 18
3.3.1 Culture cellulaire 18
3.3.2 Incubation avec les nanoparticules 18
3.3.3 Tests de toxicité 19
3.4 Dispositif et Préparation des échantillons pour l'AAS 19
3.5 Dispositif et Préparation des échantillons pour l'IBA 21
4 Résultats 26
4.1 Caractérisation des nanoparticules 26
4.1.1 Toxicité 26
4.1.2 Les nanoparticules 27
4.2 AAS 31
4.3 PIXE 32
5 Discussion 34
5.1 Caractérisation des nanoparticules 34
5.2 AAS 35
5.3 PIXE 39
5.4 Comparaison PIXE-AAS 41
6 Conclusion et perspectives 43
Références 45

TABLE DES ABRÉVIATIONS

AAS : Atomic Absorption Spectroscopy

AFM : Atomic Force Microscope

CLS : Centrifugal Liquid Sedimentation

CNT : Carbon NanoTube

EBS : Elastic Backscattering Spectroscopy

ELS : Electrophoretic Light Scattering

FBS : Fetal Bovine Serum

HRTEM : High-Resolution Transmission Electron Microscopy

IBA : Ion Beam Analysis

IC50 : half maximum Inhibitory Concentration

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy

LARN : Laboratoire d'Analyse par Réaction Nucléaire, UNamur

LOD : Limit Of Detection

MEM : Minimum Essential Medium

MTS : Methyl Tetrazolium Salt

MWCNT : Multi-Walled Carbon NanoTube

NP : Nanoparticule

PATROLS : Physiologically Anchored Tools for Realistic nanOmateriaL hazard aSsessment

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEEK : PolyEtherEtherKetone

PIPS : Planar Implanted Passivated Silicon

PIXE : Particle Induce X-ray Emission

ROI : Region Of Interest

ROS : Reactive Oxygen Species

RX : Rayons X

SDD : Silicon Drift Detector

STM : Scanning Tunneling Microscope

SWCNT : Single-Walled Carbon NanoTube

TEM : Transmission Electron Microscopy

ultra-LEGe : ultra-Low Energy Germanium

URBV : Unité de Recherche en Riologie Végétale, UNamur

UV : UltraViolet

XPS : X-ray Photoelectron Spectrometry

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Photo d'un bout de céramique peinte en bleu égyptien (a) (© Ny Calsberg Glypotek, [5]). Ainsi que deux photos de la coupe de Lycurgus en réflexion (b) et en transmission (c) (© The Trustees of the British Museum, [6]) 5
Figure 2. Comparaison de deux spectres typiques obtenus par EDS (courbe rouge) et PIXE (protons de 2,5 MeV ; courbe bleue) sur un même échantillon de bronze [14]. Là où les éléments de Pb et Zr sont clairement identifiés en PIXE, ces éléments sont essentiellement noyés dans le bremsstrahlung dans le spectre EDS. 10
Figure 3. Structure de la molécule 3-aminopropyltriethoxy silane ($C_9H_{23}NO_3Si$) [32]. 15
Figure 4. Cellule de Neubauer. Le carré encadré en rouge est le quadrillage de 1 mm² dans lequel ont été comptées les cellules. 21
Figure 5. Schéma de la chambre d'analyse "PIXE Sciences de la vie", situé sur la ligne 30° gauche de l'accélérateur. Cette chambre en développement a subi des modifications pour pouvoir accueillir des échantillons liquides sous vide. Adapté des documents du projet PATROLS, mis à ma disposition par J. Colaux. 22
Figure 6. Porte-échantillon liquide développé au LARN pour le projet PATROLS. Adapté des documents du projet PATROLS. Il s'agit d'un schéma de principe qui n'est pas à l'échelle. 23
Figure 7. Schéma montrant le contrôle de la taille du faisceau par les deux collimateurs ainsi que le faisceau diffus produit par ceux-ci. 24
Figure 8. a) Surface idéale permettant une quantification en PIXE. b) Structure en surface typique obtenue après une déshydratation des cellules. Adapté des documents du projet PATROLS. 25
Figure 9. Photo du porte-échantillon conçu pour être compatible avec le SpeedVac. À gauche une vue du haut et à droite une vue de côté. 25
Figure 10. Taux de survie des cellules A549 mises en contact durant 24h avec différentes concentrations de nanoparticules de ZnO. Test effectué sur une large gamme de concentration. 27
Figure 11. Taux de survie de cellules A549 mises en contact avec différentes concentrations de nanoparticules de ZnO durant 24h (N=3) 27
Figure 12. Images TEM en haute résolution des nanoparticules d'oxyde de zinc. 28
Figure 13. Distribution de masse des nanoparticules en fonction du diamètre hydrodynamique. (a) Pour différents temps après la mise en solution sans sonication. (b) Pour différents temps après la mise en solution avec sonication. (c) À 10 000 RPM. (d) À 22 000 RPM. Toutes les mesures ont été réalisées avec une solution concentrée à 1 mg/ml. 29
Figure 14. Spectres XPS acquis sur la nanopoudre commerciale ZnO autour des régions a) du pic Auger du zinc, b) 1s de l'oxygène, c) 2p du silicium et d) 1s de l'azote. 30
Figure 15. Spectres à large gamme en énergie (a) d'oxyde de zinc ''bulk'' et (b) de la nanopoudre d'oxyde de zinc achetée. 30
Figure 16. Données obtenues pour les analyses AAS d'échantillons de nanoparticules dissoutes (N=3). 31
Figure 17. Quantité de zinc internalisée par la cellule en fonction de la concentration en nanoparticules de ZnO mise en contact durant l'incubation (N=2). Les barres d'erreur tiennent compte de l'erreur sur le comptage des cellules. 32
Figure 18. Spectre EBS de l'échantillon à 0,1 mg/ml dans de l'eau MilliQ. La ROI de l'eau est marquée en rouge. 32

Figure 19. Spectre PIXE des échantillons de nanoparticules en solution dans de l'eau pour des concentrations de 0,1 et 1 mg/ml. 33
Figure 20. Comparaison des résultats expérimentaux obtenus avec l'AAS avec les résultats prévus par calcul des concentrations. Les barres d'erreur sur les concentrations théoriques sont calculées à partir de l'erreur maximale autorisée par la norme ISO 8655 pour les pipettes et celles sur les concentrations expérimentales à partir de la déviation standard des triplicatas. 36
Figure 21. Droites d'étalonnage pour les standards avec et sans cellules. 38
Figure 22. Correction de valeurs obtenues pour la concentration en zinc en tenant compte de la quantité estimée de zinc présente naturellement dans les cellules (en orange) et puis en supprimant la correction par rapport au blanc (en gris). 39
Figure 23. Semi-quantification des spectres PIXE des nanoparticules dans l'eau MilliQ (en bleu) et dans le milieu de culture (en orange). La correction apportée se fait en ajustant le ratio par rapport à la quantité de fer détectée. Les barres d'erreur tiennent compte de l'erreur d'intégration des pics de zinc et de fer. 40
Figure 24. Origine du faisceau diffus et projection de ce faisceau sur l'échantillon à 0,2 mg/ml dans le milieu de culture, présentant une bulle d'air importante. Le faisceau diffus passe au travers de la bulle dans la zone entourée en rouge. 41
Figure 25. Graphe de corrélation entre l'AAS et la PIXE. À gauche pour les nanoparticules dans de l'eau MilliQ et à droite pour les nanoparticules dans le milieu de culture. 42

1 INTRODUCTION

Les nanoparticules, ces corps de taille nanométrique ($10^{-9}\ m$), suscitent un intérêt grandissant tant dans la recherche fondamentale que pour leurs applications industrielles. Le secteur économique des nanotechnologies est en pleine expansion depuis la fin du 20e siècle, période à laquelle ont émergé les concepts de nanosciences et nanotechnologies. Le développement de ces technologies a été rendu possible par l'invention du microscope à effet tunnel (STM) et du microscope à force atomique (AFM), deux instruments permettant l'observation et la manipulation des corps de taille nanoscopique [1]. On définit une nanoparticule (NP) comme un corps possédant au moins une dimension comprise entre 1 et 1000 nm. Plus couramment, on la définit comme un corps ayant un diamètre inférieur à 100 nm [2]. Bien que le développement de cette technologie soit récent, son utilisation ne l'est pas. En effet, on retrouve des traces d'utilisation des nanoparticules depuis l'antiquité, en particulier dans l'industrie du verre et de la poterie où elles étaient utilisées comme colorant. Un premier exemple de cette utilisation précoce des nanoparticules est le pigment synthétique bleu que l'on connait sous le nom de bleu égyptien (Figure 1 (a)). Les égyptiens de l'Égypte antique utilisaient des nanoparticules de $CaCuSi_4O_{10}$ et de SiO_2 dans une mixture pour créer cette couleur. On considère ce pigment comme le premier pigment synthétique [3]. Mais l'exemple le plus célèbre de cette utilisation est la coupe de Lycurgus. La coupe de Lycurgus date du 4e siècle EC et présente une couleur verte en réflexion et rouge en transmission (Figure 1 (b) et (c)). Cette particularité est expliquée par la présence de nanoparticules allant jusqu'à 100 nm de diamètre composées d'un alliage d'argent (66,2 %), d'or (31,2 %) et de cuivre (2,6 %) [4]. La couleur rouge vient de l'absorption de la lumière rouge à 520 nm par les nanoparticules d'or[1] alors que la couleur verte en transmission s'explique par la diffraction de la lumière par les nanoparticules d'argent.

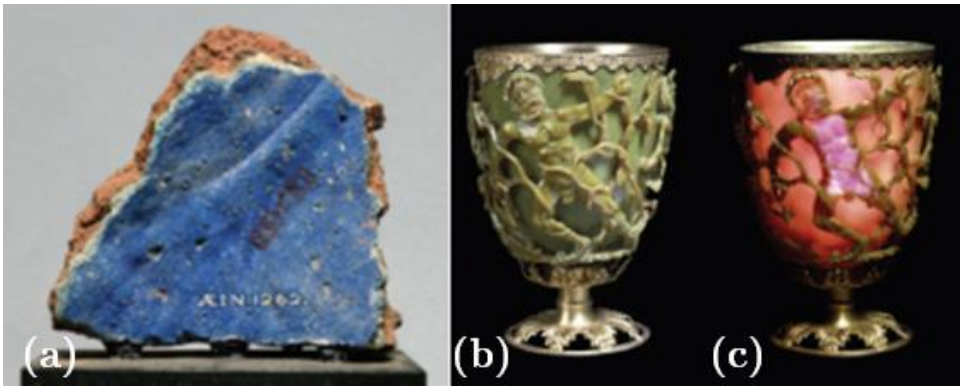


Figure 1. Photo d'un bout de céramique peinte en bleu égyptien (a) (© Ny Calsberg Glypotek, [5]). Ainsi que deux photos de la coupe de Lycurgus en réflexion (b) et en transmission (c) (© The Trustees of the British Museum, [6])

On retrouve de nos jours une grande variété de nanoparticules dans une multitude de domaines. Deux nanoparticules très utilisées sont les nanoparticules d'oxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO), toutes deux présentes dans les crèmes solaires comme agent absorbant d'UV [7]. Le TiO_2 est aussi utilisé dans les plastiques afin de limiter leur jaunissement au soleil [8]. Une liste des nanoparticules les plus utilisées et leurs effets respectifs sur les cellules a été publiée par Bahadar et al. [9]. Une liste non-exhaustive de ces nanoparticules, de leurs domaines d'application ainsi que certains de leurs effets sur les cellules sont repris dans le Tableau 1.

[1] L'absorption de la lumière rouge par les nanoparticules d'or s'explique par le phénomène de résonance plasmonique de surface de ces nanoparticules (i.e. oscillation collective des électrons en surface). Ce phénomène dépend de la taille des nanoparticules et de la nature de la matrice dans laquelle elles se trouvent.

Nanoparticules	Utilisations	Effets sur les cellules
Oxyde d'aluminium (Al_2O_3)	- Réservoirs de carburant - Polymères - Revêtements - Textiles - Biomatériaux	- Viabilité ↘ (8-12 et 160 nm) - Stress oxydatif ↗ (8-12nm) - Dommages à l'ADN (50nm) - Pas d'effets toxiques (50-80 nm)
Or (Au)	- Traitement du cancer - Agent de contraste	- Toxicité dépendante du revêtement
Oxydes de cuivre	- Semi-conducteurs - Contraceptifs	- Viabilité ↘
Argent (Ag)	- Revêtements d'outils chirurgicaux et de prothèses - Pansements	- ↗ des ROS (15 à 100 nm) - Viabilité ↘
Oxyde de Zinc (ZnO)	- Peinture - Produits de beauté - Plastiques	- Stress oxydatif ↗ (<20 et 50-70 nm) - Viabilité ↘ - Dommages à l'ADN (307-419 nm)
Oxyde de titane (TiO_2)	- Plastiques - Colorants - Crèmes solaires	- Dommages à l'ADN (160 nm) - Stress oxydatif ↗ (<100 nm) - Toxicité ↗ (<100 nm)
Oxydes de fer	- Administration de médicaments - Diagnostiques	- Viabilité ↘
À base de carbone (Nanotubes et autres fullerènes)	- Remplacement de la fibre de carbone - Électronique	- Viabilité ↘ (MWCNT 20 nm) - Mort cellulaire (SWCNT 800 nm) - Dommages aux chromosomes (fullerènes 178 nm)

Tableau 1. Liste non-exhaustive des nanoparticules les plus utilisées, leurs domaines d'application ainsi que leurs effets sur les cellules. Les effets de ces nanoparticules sur les cellules dépendent de la lignée cellulaire utilisée, de la taille des nanoparticules, du revêtement, de la concentration en nanoparticules de la solution mise en contact avec les cellules et du type de test de toxicité effectué. Adapté de Bahadar et al. (2016) [9]. ROS = Espèces réactives de l'oxygène ; SWCNT = Nanotube de carbone simple-feuillet ; MWCNT = Nanotube de carbone multi-feuillet.

De par cette utilisation récurrente de ces technologies, il est important de connaître son impact sur notre santé mais aussi sur notre environnement. En effet, les nanoparticules sont caractérisées par une grande réactivité de surface et par la capacité de traverser les membranes cellulaires [10]. Un exemple de cet intérêt pour l'impact de ces nanoparticules est le nombre important de projets financés par la Communauté Européenne sur la thématique « *nanosafety* ». Ce sont 17 projets, financés à hauteur d'une dizaine de millions d'euros chacun, qui sont actuellement en cours. Parmi ceux-ci, on peut citer le projet PATROLS (*Physiologically Anchored Tools for Realistic nanOmateriaL hazard aSsessment*) auquel l'université de Namur participe activement. Ce projet européen regroupant industries, gouvernements et instituts de recherche vise à mettre au point une batterie de tests en laboratoires ainsi que des outils informatiques pour déterminer et prédire les effets des nanomatériaux sur l'environnement et l'homme [11].

La toxicité et les autres effets des nanoparticules sur les cellules sont directement liés à l'internalisation de ces corps étrangers par celles-ci. L'étude de l'impact des nanoparticules sur les

cellules passe donc par une étude de leur mécanisme d'internalisation et de la quantité qu'elles peuvent internaliser. C'est ici qu'intervient l'intérêt de pouvoir les détecter.

Pour cela, il existe une multitude de technologies. La détection des nanoparticules peut se faire indirectement grâce à la spectroscopie d'absorption atomique (AAS). L'AAS est une technique d'analyse qui permet de quantifier le nombre d'atomes d'un élément dans une solution liquide. La détection de nanoparticules passe donc par la dissolution de celles-ci dans une solution. Par la suite, les biologistes ont adapté la technique pour quantifier des éléments dans des cellules. L'AAS présente plusieurs avantages tels qu'une facilité pour le traitement des données et une grande sensibilité (1 ppm atomique). Cependant, l'analyse est destructive et le nombre d'éléments quantifiables par le spectromètre dépend du nombre de cathodes disponibles sur l'appareil. Par ailleurs, l'absence d'analyse multi-élémentaire impose de connaître l'élément que l'on souhaite quantifier avant d'en réaliser la mesure. De plus, l'analyse destructive peut être handicapante si l'on ne possède qu'une petite quantité d'échantillons pour effectuer les mesures. Dans le cas de l'étude de l'internalisation des nanoparticules par les cellules, ces deux limitations de l'AAS peuvent présenter un problème. Par exemple, pour quantifier plusieurs types de nanoparticules internalisées par les cellules, il faudrait préparer de grandes quantités d'échantillons. Mais la préparation de ce type d'échantillons est longue et peut devenir rapidement coûteuse selon la nature des nanoparticules et des cellules employées.

Au vu de ces limitations, il convient de la comparer avec la PIXE (*Particle Induce X-ray Emission*), technique qui lui est complémentaire. La PIXE étant une technique de la famille des analyses par faisceau d'ions (i.e. *Ion Beam Analysis* ou IBA), elle requiert un accélérateur de particules et une chambre d'analyse sous vide. Elle présente l'avantage de pouvoir analyser tous les éléments de numéro atomique supérieur à celui du sodium en une seule analyse avec une sensibilité de l'ordre du ppm massique et n'est pas destructive. Il suffirait donc d'un seul échantillon pour quantifier toute une série d'éléments présents dans cet échantillon. La PIXE amène donc des mesures complémentaires à celles de l'AAS dans certains domaines de recherche. Néanmoins, le dépouillement des spectres demande une expertise avec des logiciels de pointe et le matériel expérimental nécessaire à la PIXE est nettement plus complexe, coûteux et volumineux qu'un spectromètre d'absorption atomique. La PIXE ne peut pas remplacer l'AAS dans tous les domaines de recherche mais permet dans certains cas d'amener des informations complémentaires très utiles. Un récapitulatif des avantages et inconvénients des deux techniques se trouve dans le Tableau 2.

	AAS	PIXE
Avantages	– Traitement du signal aisé et standardisé – Préparation des échantillons protocolée – Sensibilité (1 ppm atomique)	– Tous les éléments de Z > 11 quantifiable en une seule analyse – Mesure absolue – Analyse non-destructive – Sensibilité (1 ppm massique)
Inconvénients	– Nombre d'éléments quantifiables limité – Analyse destructive – Analyse séquentielle (i.e. 1 élément à la fois) – Préparation des échantillons chronophage (i.e. Digestion lente)	– Préparation des échantillons biologiques complexe et peu documentée – Traitement du signal laborieux – Équipement requis très coûteux

Tableau 2. Comparatif des techniques d'analyses AAS et PIXE. Avantages et inconvénients de chacune.

Ce mémoire a pour objectif de comparer ces deux techniques d'analyse dans l'optique de démontrer leur équivalence et leur complémentarité. Pour cela, nous chercherons à quantifier une quantité de nanoparticules d'oxyde de zinc internalisées par des cellules du cancer du poumon A549.

Dans un premier temps, nous expliquerons le fonctionnement de la PIXE et de l'AAS et appuierons l'intérêt de la comparaison des deux techniques. Dans un second temps, nous détaillerons le choix des nanoparticules d'oxyde de zinc. Les cellules A549 ont quant à elles été choisies d'une part pour leur facilité de culture et d'autre part pour la documentation conséquente que l'on trouve sur celles-ci. Et pour cause, le cancer du poumon est responsable de 26 % des cas de décès suite à un cancer [12]. Les nanoparticules de ZnO ont été caractérisées grâce à plusieurs techniques d'analyse afin de vérifier les propriétés annoncées par le fournisseur. De plus, des tests de cytoxicité[2] sur les cellules A549 ont été effectués afin de déterminer la gamme de concentrations que nous avons travaillé. En effet, il faut que le taux de survie des cellules soit suffisant afin d'avoir assez de matière à analyser par la suite. Ensuite, nous expliquerons les protocoles de préparation d'échantillons pour les mesures PIXE et analyses AAS. Enfin, les résultats obtenus lors des différents tests seront présentés et discutés.

[2] Cytotoxicité = propriété de toxicité d'une substance pour les cellules.

2 PIXE ET AAS DANS LA LITTERATURE

Ce travail est essentiellement basé sur l'utilisation de la PIXE (*Particle-Induced X-ray Emission*) et de l'AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*). Ce chapitre a pour but de décrire ces deux techniques et de dresser un bref descriptif de leurs champs d'applications. Enfin, nous verrons en quoi la complémentarité de ces deux techniques est intéressante dans le domaine de l'analyse des matériaux.

L'idée d'utiliser un faisceau de protons de quelques MeV (typiquement de 1 à 4 MeV) pour bombarder une cible et d'en analyser les raies des photons X émis est née dans l'esprit de Sven Johansson en 1970. C'est la naissance de la PIXE. Il proposa dans sa publication d'utiliser un faisceau de particules lourdes et non plus un faisceau d'électrons pour exciter la matière afin d'en extraire des rayons X (RX) [13]. La PIXE se base sur le même phénomène physique que les autres spectroscopies par fluorescence X qui consistent à détecter les rayons X produits lors de l'interaction entre une particule chargée d'énergie initiale connue et les atomes du matériau. Lorsque la particule incidente arrache un électron des couches profondes d'un atome cible, la réorganisation des niveaux électroniques qui s'en suit produit entre autres un photon X d'énergie caractéristique de l'élément qui l'émet. En mesurant l'énergie et l'intensité de ces rayonnements, nous obtenons des informations sur la composition de l'échantillon analysé. Cette technique présente les avantages d'être non-destructive et de pouvoir en observer tous les éléments de $Z>11$ en une seule fois. Bien que tous les éléments, exceptés l'hydrogène et l'hélium, produisent des RX lorsqu'ils sont irradiés, les fenêtres d'entrée standard des détecteurs en PIXE (25 µm de Be) absorbent les RX de moins de 1 keV [3]. Or, la raie K_α du sodium se situe à 1,04 keV. L'avantage d'utiliser un faisceau de particules lourdes est la diminution du bremsstrahlung et l'augmentation de la section efficace de production des rayons X. Ces effets sont visibles à la Figure 2. Grâce à cela, la sensibilité aux éléments traces augmente jusqu'à une sensibilité de l'ordre du ppm massique. Un spectre PIXE typique reprend les raies K_α et K_β des éléments présents dans l'échantillon et le bruit de fond principalement composé du bremsstrahlung des particules incidentes et des électrons secondaires. Pour les éléments les plus lourds, la section efficace de production des raies K devient de plus en plus petite et leur énergie augmente de plus en plus. Or, l'efficacité de détection des détecteurs RX diminue lorsque l'énergie augmente. On voit alors apparaitre les raies L voire M pour ces éléments, comme c'est le cas pour l'or.

[3] Calculé sur https://henke.lbl.gov/optical_constants/filter2.html le 26 mai 2020, à partir des tables de données de Henke et al. [44]

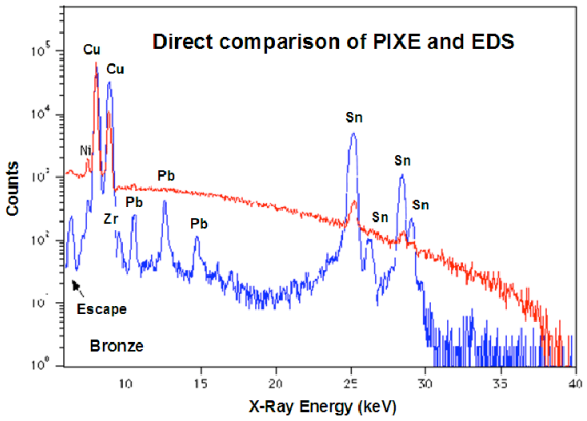


Figure 2. Comparaison de deux spectres typiques obtenus par EDS (courbe rouge) et PIXE (protons de 2,5 MeV ; courbe bleue) sur un même échantillon de bronze [14]. Là où les éléments de Pb et Zr sont clairement identifiés en PIXE, ces éléments sont essentiellement noyés dans le bremsstrahlung dans le spectre EDS.

En théorie, la quantité de matière présente dans l'échantillon est proportionnelle au nombre de coups comptés dans le pic associé. La formule basique pour extraire une quantité d'un élément d'après son pic associé dans le spectre PIXE est la suivante :

$$dN = A(s)n(s)\sigma\omega k\Omega\varepsilon T dS \qquad (1)$$

Où :

- $A(s)$ est le nombre d'atomes d'un élément chimique observés sous un élément de surface dS de l'échantillon ;
- dN le nombre de coups comptés pour cet élément ;
- $n(s)$ le nombre total de protons incidents par cm² ;
- σ la section efficace d'ionisation de la couche électronique correspondante ;
- ω le rendement de fluorescence de l'élément ;
- k la probabilité de transition relative à la transition X utilisée pour la mesure ;
- Ω l'angle solide du détecteur ;
- ε son efficacité de détection ;
- et T la transmission au travers de la fenêtre d'entrée du détecteur. Le paramètre T tient compte de l'absorption des RX par l'échantillon lui-même ainsi que par un quelconque absorbeur placé entre l'échantillon et le détecteur.

Tous les paramètres de cette équation peuvent être connus, sauf A et N qui sont déterminés expérimentalement. Ceci fait de la PIXE une technique d'analyse absolument quantitative [15].

En pratique, la détermination des paramètres est laborieuse et le traitement des données visant une quantification absolue des éléments requiert une maîtrise de logiciels de pointe tel que *GUPIX* [16]. Ces logiciels ont besoin, pour quantifier un échantillon, de connaître l'angle solide de détection, la charge intégrée (i.e. nombre de particules incidentes) et la quantité de matière analysée (en µg/cm²) émettant les RX détectés, sauf si l'échantillon est d'épaisseur infinie pour le faisceau incident (i.e. le faisceau incident est complètement stoppé dans la matière analysée). L'angle solide de détection s'obtient grâce à l'analyse de matériaux standards certifiés. Cependant, le nombre de particules incidentes, équivalent à la charge collectée, ne peut pas être déduit du spectre PIXE lui-même. C'est pour cela que nous utilisons conjointement à la PIXE une analyse EBS (*Elastic Backscatering*

Spectrometry), dont l'intensité du signal nous permet de déterminer le nombre de particules incidentes. L'EBS est une technique d'analyse de matériaux permettant d'obtenir une information quantitative sur la composition d'un échantillon avec une sensibilité de l'ordre du pourcentage atomique. Le principe de cette analyse repose sur le bombardement d'un échantillon par des particules légères chargées (typiquement des particules α ou des protons) qui ont une probabilité de passer à proximité d'un noyau et d'être rétrodiffusées par ces noyaux cibles (i.e. la section efficace de Rutherford). Dans notre cas, connaissant la composition de la matrice de l'échantillon et l'angle solide du détecteur EBS, on peut retrouver le nombre de particules incidentes en comptant le nombre de particules rétrodiffusées par les n éléments de la matrice via :

$$N_{RBS}^{M} = N_{inc}\Omega_{dét}\sum_{i=1}^{n}[Z_i]\sigma_{Z_i} \tag{2}$$

où N_{RBS}^{M} est le nombre de particules rétrodiffusées par les éléments de la matrice i.e. le nombre de coups comptés dans le détecteur dans la région d'intérêt (ROI) de la matrice, N_{inc} le nombre de particules incidentes, $\Omega_{dét}$ l'angle solide du détecteur, $[Z_i]$ la concentration en l'élément Z_i dans la matrice (en %), et σ_{Z_i} la section efficace de Rutherford pour l'élément Z_i de la matrice. Pour la quantification, on peut utiliser un logiciel dédié qui va simuler le spectre EBS de la matrice et véritablement déduire le nombre de particules incidentes. On utilise ensuite cette information dans le logiciel de quantification PIXE pour traiter le spectre PIXE. Dans le cas d'une semi-quantification, on utilise le nombre de coups comptabilisés dans la ROI correspondant au signal de la matrice et on normalise le spectre PIXE par ce nombre qui est directement proportionnel au nombre de particules incidentes.

Johansson et Johansson publient une étude en 1976 où ils développent les champs d'application de leur nouvelle technique de détection d'éléments traces [15]. Ils développent particulièrement les domaines d'analyses sur échantillons liquides pour étudier la pollution de l'eau par exemple, sur les tissus biologiques pour les applications médicales, les aérosols pour étudier la pollution de l'air et les échantillons solides plus classiques pour trouver les traces dans des alliages de métaux par exemple. Ils soulèvent la difficulté d'obtenir un échantillon biologique, souvent sous forme de tissus ou de liquide, compatible avec la technique d'analyse par faisceau d'ions : l'échantillon doit pouvoir être placé sous vide. Actuellement, les échantillons biologiques sont déshydratés suivant divers protocoles variant d'un type d'échantillon à un autre. Cependant, ces préparations s'accompagnent d'une altération de l'échantillon via des pertes de matière ou des contaminations. L'analyse direct d'échantillons hydratés, voire liquides, sous vide permet de diminuer le nombre de manipulations à effectuer sur l'échantillon et donc leur détérioration. Pour rendre ce type d'analyse faisable, les chercheurs du LARN, à l'Université de Namur, ont développé un porte-échantillon pour échantillons liquides compatible avec les chambres d'analyses sous vide.

La PIXE possède deux variantes qui méritent d'être mentionnées car elles apportent toutes deux des nouveaux champs d'applications [17]. La première est née de la possibilité de focaliser le faisceau d'ions sur une surface de l'ordre du micromètre carré. C'est la micro-PIXE (µ-PIXE). Le faisceau peut ainsi scanner une surface et établir une carte de concentration de l'échantillon pour de nombreux éléments. On peut, grâce à cette technique, cartographier une seule cellule qui possède des dimensions de l'ordre de 100 µm². Le temps d'acquisition pour établir une carte de concentration en µ-PIXE augmente grandement car chaque pixel de la carte est en fait un spectre PIXE complet. De plus,

le fait de focaliser le faisceau diminue grandement son intensité. Alors qu'en PIXE non focalisé on travaille avec une intensité de 1 à 100 nA, en µ-PIXE la gamme d'intensité est plutôt de 10 à 500 pA. Un spectre PIXE classique prend en général une dizaine de minutes pour son acquisition et une cartographie 30 à 90 minutes. Un exemple de ce type d'application pour la µ-PIXE est l'étude de l'internalisation de nanoparticules d'or par des cellules. Dans les grandes lignes, les cellules sont repérées en PIXE par le signal du phosphore, présent naturellement dans les cellules. On superpose ensuite le signal de l'or à celui du phosphore pour savoir combien d'or a été internalisé par une cellule [18]. La deuxième variante est une configuration PIXE où le faisceau est extrait à l'air libre via une fine fenêtre en bout de ligne. Cette configuration permet l'analyse de matériaux fragiles ou simplement trop volumineux pour rentrer dans la chambre d'analyse. Le souci avec cette configuration est qu'à l'air libre, on perd de l'information par absorption des RX dans l'air. De ce fait, la quantification devient difficile mais l'identification reste faisable. Cette variante peut, par exemple, permettre l'étude de matériaux archéologiques ou d'œuvres d'art sans les endommager. Les avantages et limitations de cette variante sont abordées par P. A. Mandò dans son article de 1994 [19].

Le principe de l'AAS date du XIXe siècle mais c'est dans les années 50 que A. Walsh et son équipe développèrent sa forme moderne. L'AAS est une technique d'analyse dans laquelle un échantillon atomisé sous forme gazeuse absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde connue. Un photon d'énergie spécifique peut être absorbé par un électron des couches internes et promouvoir cet électron dans les couches supérieures. Connaissant l'intensité du faisceau incident (I_0) et en mesurant son intensité en sortie de l'échantillon (I), on peut déterminer l'absorbance. Ceci est possible car en l'absence d'interférence, l'absorption du faisceau incident obéit à une loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp(-k_\nu L) \tag{3}$$

où k_ν est le coefficient d'absorption et L est le chemin optique du faisceau de photons. L'absorbance (A) est définie comme :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(e^{k_\nu L}\right) = 0{,}43 \times \mathrm{k_\nu} L. \tag{4}$$

Or, k_ν est directement proportionnel à la concentration en atomes de l'élément analysé. Dès lors, l'absorption est linéairement proportionnelle à la concentration :

$$A \propto N_0 L \tag{5}$$

On peut donc déduire la concentration dans l'échantillon à partir de l'absorbance mesurée [20]. Cette dépendance linéaire doit être établie à chaque nouvelle analyse par une étape d'étalonnage du spectromètre. Les échantillons pour l'étalonnage du spectromètre, les standards, sont préparés à partir de solutions certifiées de concentration connue en l'élément cherché. Il est important que la matrice des standards soit la même que celle des échantillons pour limiter son impact sur les mesures. L'analyse d'échantillons par AAS est rapide et les spectromètres sont faciles à utiliser. Elle permet de mesurer la plupart des métaux et métalloïdes avec une sensibilité suffisante pour de nombreuses applications. C'est pour ces raisons qu'elle est devenue l'un des outils les plus utilisés en chimie analytique [21]. Cependant, la rapidité de l'analyse est à mettre en contraste avec la lenteur de la préparation des échantillons solides. Car pour être compatible avec l'AAS, l'échantillon doit être liquide. Les échantillons solides doivent donc être digérés avant analyse. Cette digestion peut prendre

du temps : des heures voire des jours. De plus, l'AAS ne permet de quantifier un élément que si l'on sait ce que l'on cherche.

La PIXE s'est assez rapidement imposée comme candidate pour consolider les mesures effectuées en AAS sur des échantillons solides. La préparation des échantillons solides pour l'AAS présente plusieurs faiblesses qu'on ne retrouve pas en PIXE. En effet, le passage d'un échantillon solide à un échantillon liquide demande entre autres une digestion qui peut ne pas toujours être complète et un grand nombre de manipulations à effectuer sur l'échantillon avant qu'il soit compatible avec l'AAS. Ces manipulations peuvent induire des erreurs par des contaminations et pertes de matière. Une comparaison entre ces deux techniques a montré qu'elles sont en accord pour la quantification d'éléments traces sur des filtres à air [22].

Un peu plus tard, il a été vérifié que la capacité de la PIXE à analyser plusieurs éléments en une seule acquisition couplée à sa grande sensibilité fait d'elle une technique idéale pour quantifier les éléments traces dans les échantillons biologiques. Il a souvent été montré que le principal problème de l'application de la PIXE à la biologie est la préparation des échantillons. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été mises au point dans le but de mettre en évidence les erreurs qu'elles peuvent induire lors de la quantification des traces [23]. Ce n'est qu'un peu plus tard, vers la fin des années 80 que la communauté scientifique décida de comparer les données obtenues en PIXE sur des tissus avec des techniques de références telles que l'AAS [24]. Les premières mesures ont montré une relativement bonne corrélation entre les résultats pour la détection de Fe, Cu, Zn et Cd en plus d'une bonne reproductibilité pour la préparation des échantillons. De plus, d'autres études comparatives avec l'ICP-AES (Spectrométrie à plasma à couplage inductif) montrent une bonne corrélation entre les données obtenues. La déviation observée est expliquée par un problème lors de la digestion des échantillons [25]. L'AAS et l'ICP-AES utilisent le même procédé pour la préparation des échantillons. Dès lors, le problème relevé lors de la digestion peut aussi s'appliquer à l'AAS.

Le contrôle de ces deux techniques complémentaires de quantification peut fournir un appui intéressant dans certains projets de l'UNamur tel que le projet PATROLS énoncé plus tôt. Les procédures de préparation d'échantillons biologiques pour la quantification en PIXE étant assez peu documentées, un important travail expérimental pour établir un protocole de préparation d'échantillons biologiques est à réaliser.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 CHOIX DES NANOPARTICULES

Le choix des nanoparticules utilisées lors de ce mémoire a été crucial et a demandé réflexion. En effet, les nanoparticules doivent répondre à certaines caractéristiques pour être facilement exploitables lors des mesures PIXE et analyses AAS, à savoir :

1. Les nanoparticules doivent être quantifiables grâce à l'AAS que possède l'URBV (Unité de Recherche en Biologie Végétale), c'est-à-dire que l'URBV doit posséder une cathode du même élément que les nanoparticules que l'on souhaite quantifier.
2. Elles doivent posséder une taille telle qu'elles puissent être internalisées par les cellules. En théorie, même si des nanoparticules de quelques micromètres peuvent être internalisées par endocytose, la taille optimale pour une internalisation est de l'ordre de 25 à 30 nm [26].
3. Elles doivent être visibles en PIXE. Elles doivent donc être composées d'un élément de numéro atomique supérieur à celui du sodium ($Z > 11$).
4. On souhaite éviter toute interférence du signal PIXE caractéristique des NPs avec les éléments constituant les cellules de sorte à faciliter l'interprétation des spectres.
5. Elles doivent être un maximum stable en solution pour éviter la formation d'agrégats, plus difficiles à internaliser par les cellules.
6. Les nanoparticules que l'on souhaite étudier doivent avoir un intérêt en nano-toxicologie ou en radiothérapie.
7. Les nanoparticules sont fabriquées de manière industrielle et peuvent être achetées auprès d'un fournisseur. Ceci permet, en principe, d'avoir un approvisionnement en nanoparticules facile et reproductible.

Sur base d'un travail bibliographique, plusieurs nanoparticules ont été mises en évidence selon leur domaine d'intérêt :

- Des nanoparticules d'argent ou de cadmium pour l'aspect radiobiologique [12].
- Des nanoparticules de TiO_2, SiO_2, CeO, ZnO ou des nanotubes de carbone (CNT) pour l'aspect nano-toxicologique [9] [27].

Un premier tri des candidates peut se faire rapidement. Premièrement, les nanoparticules d'argent et de cadmium sont trop toxiques et nécessiteraient de travailler avec des concentrations trop faibles que pour être utiles dans ce travail. Elles ont donc été écartées. Ensuite, le carbone n'est pas visible en PIXE. Les nanotubes de carbone ont alors eux aussi été écartés. Enfin, nous avons décidé d'écarter l'oxyde de cérium car ces nanoparticules sont moins bien documentées que les trois autres oxydes métalliques. La liste est alors réduite à trois candidates : les nanoparticules de TiO_2, de SiO_2 et de ZnO. Un tableau comparatif de ces trois nanoparticules en fonction de leur utilité dans ce mémoire a été dressé (Tableau 3).

	Avantages	Inconvénients
TiO_2	– Raie K_α à 4,5 keV. Il n'y a aucun pic parasite de la cellule à cette énergie. – Stock de nanoparticules déjà disponible au laboratoire. – Commercialement disponible pour une taille de 20 nm.	– Analyse AAS peu sensible : 5 ppm atomique.
SiO_2	Commercialement disponible pour une taille de 15 nm.	– Raie K_α à 1,7 keV. Le pic est très proche de la raie K_α du phosphore que l'on retrouve abondamment dans les cellules. Le dépouillement des spectres pourrait en être compliqué. – Analyse AAS peu sensible : 2-3 ppm atomique.
ZnO	– Raie K_α à 8,6 keV. Il n'y a aucun pic parasites de la cellule à cette énergie. – AAS très sensible à faible dose de Zn (0,1 ppm atomique). – Commercialement disponible pour une taille de 18 nm.	– Besoin d'un revêtement pour empêcher la dissolution des nanoparticules lorsqu'elles sont mises en solution. – Pas de stock disponible au laboratoire.

Tableau 3. Tableau comparatif des nanoparticules candidates étudiées pour ce mémoire.

Le choix s'est porté sur les nanoparticules d'oxyde de zinc de 18 nm de diamètre avec un revêtement en 3-aminopropyltriethoxy silane (Figure 3) commercialement disponibles chez Nanographi[4]. Le revêtement permet de diminuer la dissolution des nanoparticules de ZnO. En effet, les nanoparticules de ZnO ont une forte tendance à se dissoudre dans de nombreuses solutions aqueuses, comme dans l'eau distillée et le milieu de culture cellulaire par exemple [28]. Plus particulièrement, la dissolution des nanoparticules de ZnO dans une cellule augmente la concentration en Zn^{2+} à un niveau supraphysiologique, déstabilisant ainsi l'équilibre homéostasique du zinc de la cellule [29]. Un excès de zinc dans une cellule peut engendrer une diminution des défenses de la cellule au stress oxydatif [30] et un dysfonctionnement de la mitochondrie, menant à l'activation des caspases et à l'apoptose[5] [31].

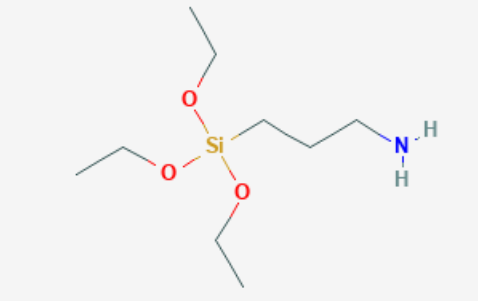


Figure 3. Structure de la molécule 3-aminopropyltriethoxy silane ($C_9H_{23}NO_3Si$) [32].

[4] Produit visible à l'adresse : https://nanografi.com/nanoparticles/zinc-oxide-zno-nanopowder-nanoparticles-purity-99-5-size-18-nm-kh550/ (consultée le 9 octobre 2019)
[5] Apoptose = mort cellulaire programmée.

3.2 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

Afin de vérifier la qualité des nanoparticules envoyées par le fournisseur, il convient de les caractériser. En d'autres termes, il faut établir si la fiche technique envoyée avec le produit correspond bien à celui-ci. De plus, on cherche à expliquer le comportement des nanoparticules grâce à des propriétés supplémentaires non renseignées par le fabriquant. Pour cela, il existe une multitude de techniques d'analyses parfois complémentaires. Citons celles utilisées lors de ce mémoire : la microscopie électronique (EM), la spectroscopie photoélectronique X (XPS), la sédimentation liquide centrifuge (CLS) et la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS).

La loi d'échelle des nanoparticules nous dit que la taille des nanoparticules influe sur leurs propriétés physiques [33]. L'internalisation des nanoparticules par les cellules dépend de nombreux paramètres tels que la taille et la chimie de surface [34]. La toxicité étant liée à l'internalisation des nanoparticules, la taille des nanoparticules joue indirectement sur leur toxicité. Pour caractériser la taille des nanoparticules, il existe de nombreuses méthodes. Cependant, la plupart de ces techniques se basent sur une approximation souvent erronée qui est la sphéricité des nanoparticules [35]. La microscopie électronique en transmission est conseillée par la Commission européenne pour la caractérisation de la taille des nanoparticules car elle s'affranchit de cette approximation. Contrairement aux autres techniques d'analyses, la microscopie électronique permet une observation directe des nanoparticules. Cependant, on ne peut observer qu'une petite quantité de nanoparticules en TEM. Verleysen et al. ont mis au point une méthodologie pour s'affranchir de cette difficulté mais cette dernière est très chronophage [36]. C'est pour cela que dans le cadre de ce mémoire, le TEM a été utilisé pour s'assurer de la presque sphéricité des nanoparticules, comme annoncé par le fabriquant, et la distribution de taille a été mesurée par sédimentation liquide centrifuge (CLS). La mesure de la distribution de taille par CLS est beaucoup plus rapide que par TEM et tout aussi valable si les nanoparticules sont sphériques.

Pour observer leur morphologie, les nanoparticules ont été passées en TEM à haute résolution (HRTEM). Pour cela, une petite quantité de nanoparticules a été mise en solution dans 1 ml d'une solution à 95% éthanol + 5% éther puis une goutte a été déposée sur une grille et est passée au TEM à haute résolution TECNAI G² 20 du service de microscopie électronique de l'université de Namur.

La CLS est une technique d'analyse permettant d'obtenir le diamètre hydrodynamique de particules mises en solution. Pour mesurer le diamètre hydrodynamique, on mesure la vitesse de sédimentation des particules en suspension dans un milieu à gradient de densité lorsqu'elles sont soumises à une force centrifuge croissante due à la rotation d'un disque. Selon leur diamètre et leur densité, la vitesse de sédimentation des particules varie. La relation entre le temps que met la particule à arriver au détecteur et le diamètre hydrodynamique de la particule, appelé diamètre de Stokes, s'écrit :

$$d_{St,m} = \sqrt{\frac{18\eta \ln(M/S)}{(\rho_p - \rho_l)\omega^2 t}} \qquad (6)$$

où η est la viscosité du milieu, M et S correspondent respectivement aux rayons auxquels les particules se trouvent lorsqu'elles arrivent au détecteur et lorsqu'elles sont injectées dans le milieu. ρ_p et ρ_l sont les densités des particules dans le milieu et du milieu lui-même. ω est la vitesse angulaire de rotation du disque [37]. Tous ces paramètres sont constants pour une même mesure. La détermination du

diamètre ne dépend alors que du temps (t). Le milieu à gradient de densité est composé d'eau et de sucrose. Deux concentrations de cette solution sont préparées : une première à 8% de sucrose et l'autre à 2%. Pour cela, on pèse respectivement 0,8 et 0,2 g de sucrose dans deux berlins et on y ajoute 10 ml d'eau distillée. En modifiant la quantité injectée dans le disque, suivant le protocole établi au LARN et détaillé ci-après, on crée un gradient de concentration. Lorsque l'on atteint la vitesse de rotation voulue, on ajoute 0,5 ml de dodécane qui va permettre aux nanoparticules d'avoir une transition en douceur dans le gradient en évitant les turbulences. Après 20 minutes d'attente, le gradient est stabilisé et on injecte un standard d'étalonnage certifié pour déterminer la relation diamètre-temps. On injecte ensuite 0,1 ml de la solution de nanoparticule. Cette solution s'obtient en pesant une dizaine de milligrammes de la poudre de nanoparticules et en ajoutant la quantité d'eau distillée MilliQ nécessaire afin d'obtenir une concentration de 1 mg/ml. Cette solution est une solution ''stock'' (que l'on appelle un *batch*) et sera utilisée pour les autres expériences. En plus de nous donner le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, la CLS est aussi utilisée pour étudier la stabilité des nanoparticules en suspension dans l'eau MilliQ. Pour cela, des mesures CLS ont été effectuées après 0, 3, 24, 72 et 168 h sur deux batchs. Pour re-susprendre les nanoparticules, le premier batch était passé au bain à ultrason pendant 10 minutes puis secoué énergiquement manuellement tandis que le deuxième passait en plus par la tête de sonication en mode impulsion à 35% d'amplitude pour 10 impulsions. La tête de sonication permet d'assurer une meilleure dispersion des nanoparticules en détruisant certains agrégats mais la méthode est brutale pour les nanoparticules et risque de les détruire. Les tests pour 0, 3, 24 et 72 h ont été itérés à des vitesses de rotations de 10 000 et 22 000 RPM. Une plus grande vitesse de rotation permet d'avoir plus de points de mesures pour les petits diamètres. Ainsi pour 10.000 RPM, nous avons plus de points pour les grands diamètres tandis que pour une vitesse de 22.000 RPM, il y a plus de points pour les petits diamètres. Enfin, étant donné que les nanoparticules vont être amenées à être mises en solution dans du milieu de culture cellulaire, leur diamètre dans ce milieu a aussi été mesuré.

Outre leur taille, il convient d'étudier leur stabilité et leurs interactions dans une solution colloïdale. Un moyen rapide de prendre connaissance de ces caractéristiques est la mesure du potentiel zêta. Le potentiel zêta représente la charge de la nanoparticule au niveau de son plan de cisaillement. La valeur de ce potentiel permet de prédire les interactions et la stabilité des nanoparticules en solution colloïdale. Pour mesurer ce potentiel, nous avons utilisé la ELS (*Electrophoretic Light Scattering*). Cette technique d'analyse permet d'obtenir la valeur du potentiel zêta en mesurant la mobilité des nanoparticules en solution dans un champ électrique grâce à la relation de Smoluchowski [38] :

$$v_E = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu}(1 + \kappa(T)r) \qquad (7)$$

avec ε_0 la permittivité du vide, ε_r la permittivité relative, μ la viscosité de la solution, r le rayon des nanoparticules et $\kappa(T)$ est le paramètre de Debye-Hückel. Les nanoparticules allant se retrouver en solution dans de l'eau MilliQ et dans du milieu de culture, leur potentiel zêta a été mesuré dans ces deux solutions.

La nanopoudre de ZnO fournie par Nanographi est certifiée pure à 99,99 % et recouverte par un revêtement en silane. Pour s'assurer de la présence du revêtement, essentiel à la suite des expériences, une identification élémentaire et chimique du matériau est nécessaire. Pour cela, nous disposons de la spectroscopie photoélectronique X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*). La XPS est une

technique d'analyse de surfaces qui consiste à bombarder un échantillon de photons X et de mesurer les énergies des photoélectrons émis par l'échantillon. La profondeur d'information de l'XPS est définie comme $d = 3\lambda$ où λ est le libre parcours moyen des photoélectrons. Ceux-ci ayant un libre parcours moyen de l'ordre du nanomètre, la profondeur d'information est du même ordre de grandeur. Le spectre XPS donne donc des informations sur la composition chimique et élémentaire de l'échantillon en extrême surface. Bien que la profondeur de d'information soit de quelques nanomètres, un décapage à l'argon est possible pour effectuer un profilage en profondeur de l'échantillon. Pour analyser de la poudre de nanoparticule, on dépose un peu de cette poudre sur du collant double face en carbone et on pose l'échantillon sur le porte-échantillon de l'XPS. Lors des mesures, l'énergie de passage a été fixée à 50 eV et les rayons X ont été produits par une cathode en aluminium.

3.3 CELLULES

3.3.1 Culture cellulaire

Les cellules A549 sont mises en culture dans ce qu'on appelle le milieu de culture. Dans notre cas, ce milieu est composé d'un mélange de MEM (*Minimum Essential Medium*) avec 10% de FBS (*Foetal Bovine Serum*) ainsi que des antibiotiques. La solution de MEM et de FBS apporte tous les nutriments dont les cellules ont besoin pour vivre : acides aminés, glucose, sels, vitamines et autres protéines. Lorsque les cellules atteignent environs 80 % de confluence, il faut effectuer un passage des cellules. Un passage permet d'assurer la pérennité de la lignée cellulaire en prélevant une partie de la population de cellules et en la remettant en culture. Dans un premier temps, un rinçage au PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) permet de rincer la boîte de culture et d'enlever les constituants du milieu de culture sans stresser les cellules. Le PBS est une solution saline physiologique dont la concentration en sels est la même que celle du corps humain. Ensuite, on ajoute de la trypsine et on incube 2 min. La trypsine est une enzyme qui va digérer les protéines qui assurent l'adhésion des cellules au fond de la boîte de culture. Les cellules ainsi détachées peuvent être récupérées dans un Falcon® de 15 ml en effectuant un rinçage au milieu de culture. On centrifuge à 1000 RPM pendant 5 min de telle manière à concentrer les cellules dans le culot du Falcon®. On vide le surnageant et on remet les cellules en suspension dans 6 ml du milieu de culture préalablement préparé. Pour un passage visant à perpétuer la lignée cellulaire, on pipette une quantité désirée que l'on dépose dans une nouvelle boîte de culture avec du milieu frais. Ce passage permet aux cellules de continuer leurs cycles durant 5 jours si on pipette pour une dilution 1:6 et 3 jours dans le cas d'une dilution 1:3.

3.3.2 Incubation avec les nanoparticules

Pour incuber des cellules avec des nanoparticules, on commence par prélever les cellules de notre culture afin d'en déposer 1 000 000 dans une nouvelle boîte T75 avec du milieu de culture frais et des antibiotiques. On prépare une boîte par concentration que l'on souhaite tester. On laisse incuber durant une nuit. Le lendemain, on vide le milieu et on rince toutes les boîtes au PBS. Pour incuber avec des nanoparticules, les concentrations à tester s'expriment en concentration surfacique (µg/cm²). En effet, les cellules se fixant dans le fond de la boîte, la quantité de nanoparticule en contact avec les cellules dépend de la surface sur laquelle elles ont proliféré. On prépare alors une solution de nanoparticules à 1 mg/ml dans de l'eau MilliQ et on calcule le volume de solution à ajouter au milieu de culture des cellules pour obtenir la concentration surfacique voulue dans les T75. La présence des antibiotiques est nécessaire car les nanoparticules ne sont pas stériles. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi de travailler dans une gamme de concentration en NPs de 1 à 10 mg/ml. Cette

gamme a été déduite des tests de toxicité, comme nous le verrons plus tard. Celles-ci correspondent à la gamme en concentration surfacique de 0,63 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 et 6,25 µg/cm². On incube les cellules avec les NPs pendant 24 h dans un incubateur. Après l'incubation, on rince 2 fois au PBS pour être sûr de ne conserver que les nanoparticules internalisées par les cellules. On ajoute de la trypsine et on incube 2 min. Les cellules sont récupérées en les détachant au PBS et sont placées dans un Falcon® de 15 ml. On centrifuge à 1000 RPM pendant 5 min et on effectue 2 autres rinçages au PBS. Ces rinçages se font en flushant[6] les cellules avec le PBS suivi d'une centrifugation et d'une vidange du PBS. On obtient en fin de manipulation un culot composé des cellules ayant survécu à l'incubation avec les NPs de ZnO.

3.3.3 Tests de toxicité

Pour tester la cytotoxicité des NPs de ZnO, nous avons procédé à des tests MTS[7] (*Methyl Tetrazolium Salt*). Un test MTS permet de quantifier le nombre de cellules métaboliquement actives. On met les cellules en contact avec une solution composée de milieu de culture et d'un sel de tétrazolium MTS (*jaune*) qui va être réduit par les mitochondries fonctionnelles en formazan (*mauve*). Cette réduction se produit durant une incubation de 60 min dans l'incubateur afin d'avoir des conditions favorables à l'activité métabolique de la cellule. Le formazan absorbant à 490 nm, une mesure de cette absorbance normalisée avec un blanc permet d'avoir une mesure de la quantité de cellules métaboliquement actives dans un puit. C'est une technique de dosage colorimétrique s'appuyant sur la loi de Beer-Lambert pour mesurer l'absorbance. Les tests ont été réalisés avec 12.500 cellules par puits, incubées avec 200 µl de milieu de culture présentant les concentrations testées. Un premier test à large spectre où les concentrations ont varié de 1 µg/ml à 1 mg/ml a permis d'avoir une idée des concentrations auxquelles les cellules ont un taux de survie acceptable (> 90%) pour la suite des expérimentations. Suite à ce premier test, les concentrations de 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 et 90 µg/ml ont été choisies pour trouver l'IC50 (*half maximum inhibitory concentration*) i.e. la concentration en NPs pour laquelle il y a 50% de survie. Le temps d'incubation a été fixé à 24 h, dans la continuité du temps d'incubation pour les autres tests. Chaque concentration a été dupliquée 6 fois par test et 3 tests ont été effectués à des moments différents pour obtenir une statistique biologique (N=3).

3.4 DISPOSITIF ET PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'AAS

La préparation des échantillons pour les mesures AAS sans cellules s'inspire grandement du protocole déjà mis en place au LARN pour des mesures avec des nanoparticules d'or effectuées lors du projet de recherche de première année de master. Afin de ne pas saturer le détecteur, les dilutions ont été adaptées par rapport aux dilutions utilisées pour les mesures d'or. L'AAS est en effet 5x plus sensible au zinc qu'à l'or. Une dilution x10 par rapport aux concentrations voulues pour l'incubation des cellules a été effectuée. On obtient ainsi des échantillons de 2 ml avec des concentrations de 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1 µg/ml de nanoparticules mises en solution dans de l'eau MilliQ.

[6] Flusher = mélanger à l'aide de la pipette en aspirant et rejetant plusieurs fois le contenu que l'on souhaite mélanger.

[7] Un test MTS est un test colorimétrique de survie cellulaire utilisant un sel de tétrazolium MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] comme colorant. Le sel utilisé a donné son nom au test.

Pour déduire la concentration d'un élément, on doit étalonner le spectromètre. Pour cela, il faut préparer des solutions standards de concentrations connues à analyser avant les échantillons de concentrations inconnues. La préparation des standards se fait grâce à une solution commerciale fournie par *Bernd Kraft® GmbH* à 1 g de Zinc par litre[8]. La solution de base est diluée 100x pour obtenir une solution à 10 ppm qui est plus facile à manipuler. On dilue ce nouveau stock dans des Falcons® de manière à obtenir 2,5 ml de standard avec des concentrations de 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3 ppm massiques. On ajoute ensuite 2,5 ml d'eau régale (i.e. un mélange de HNO_3 et de HCl, dilution 1/3), pour obtenir une matrice semblable à celle de nos échantillons. On obtient in fine des standards de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 1,5 ppm massiques. La relation entre la concentration et l'absorbance étant linéaire, une régression linéaire permet d'obtenir l'étalonnage du spectromètre. Avec la droite d'étalonnage, on peut relier une absorbance de notre échantillon à une concentration en ppm massique.

La préparation des échantillons d'étalonnage avec des cellules pour l'AAS change quelque peu de la préparation décrite ci-dessus. Pour commencer, la préparation des standards est un peu modifiée lorsque l'on souhaite analyser un échantillon avec des cellules. Pour cela, on prépare 6 boîtes de cultures avec 500 000 cellules et on laisse proliférer une nuit. Le lendemain, on récupère les cellules dans un Falcon® de 15 ml et on les suspend dans 1 ml de solution standard préalablement diluée dans du PBS pour obtenir des concentrations de 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3 ppm massiques. On ajoute ensuite 1 ml d'eau régale. Au final, nous obtenons 2 ml pour chaque solution standard avec des concentrations de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 1,5 ppm massiques. De la même manière que pour les échantillons sans cellules, on obtient l'étalonnage du spectromètre par régression linéaire. On peut alors relier une absorbance de notre échantillon à une concentration en ppm massique grâce à la droite d'étalonnage. Ensuite, pour préparer les échantillons avec cellules, on prépare 5 boîtes de culture comme expliqué dans le paragraphe traitant de l'incubation avec les nanoparticules. Lorsque l'on a les culots de cellules avec les nanoparticules, on les suspend dans 1 ml de PBS. On prélève 10 µl pour compter les cellules et on ajoute 990 µl d'eau régale dans le Falcon® pour finir de préparer l'échantillon.

Pour compter les cellules, on dilue 10 fois les 10 µl prélevés et on compte les cellules au microscope grâce à un hématimètre, une lame de verre gravée d'un quadrillage permettant d'obtenir une concentration de cellule en suspension. L'hématimètre utilisé est une cellule de Neubauer (Figure 4).

[8] 1 g/l = 1000 ppm massique

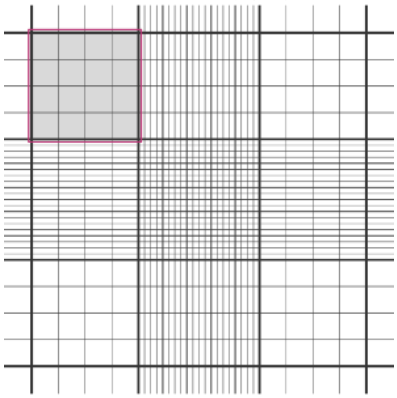


Figure 4. Cellule de Neubauer. Le carré encadré en rouge est le quadrillage de 1 mm² dans lequel ont été comptées les cellules.

On compte les cellules dans les quadrillages de 1 mm². On effectue ce comptage plusieurs fois pour avoir une moyenne. Une fois un nombre moyen de cellules obtenu, on divise par le volume du quadrillage de 1 mm² qui vaut $1\ mm^2 \times 0{,}1\ mm = 10^{-4} ml$. La concentration en cellule de la solution est donc donnée par :

$$concentration\ (cellules/ml) = \frac{nombre\ moyen\ de\ cellules\ comptées}{10^{-4}} \qquad (8)$$

Des dilutions x5 et x10 ont été effectuées sur les échantillons ayant internalisés les nanoparticules afin d'éviter de saturer la détection du zinc par l'AAS. Ces deux dilutions n'ont pas d'impact sur la détermination de la quantité de zinc internalisée par cellule car on normalise la quantité de zinc mesurée par le nombre de cellules présentes dans l'échantillon analysé.

3.5 DISPOSITIF ET PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'IBA

La chambre d'analyse est placée sur une ligne de l'accélérateur linéaire tandem de 2 MV du LARN. La chambre est composée d'une chambre à vide, d'un détecteur ultra-LEGe (*ultra-Low Energy Germanium*), d'un détecteur SDD (*Silicon Drift Detector*), de deux détecteurs PIPS (*Planar Implanted Passivated Silicon*) et d'une caméra (Figure 5). Les deux détecteurs servant à la détection des RX pour l'analyse PIXE (les détecteurs ultra-LEGe et SDD) sont montés à 135° dans le plan horizontal tandis que les deux détecteur PIPS servant à la détection des particules rétrodiffusées pour les analyses EBS sont placés à 155° dans le plan vertical. Les angles sont donnés par rapport à la direction du faisceau incident. Les deux détecteurs ont une résolution en énergie proche l'une de l'autre : environ $145\ eV$ pour l'ultra-LEGe et $130\ eV$ pour le SDD pour la raie K_α du fer. Il est absolument nécessaire d'empêcher les protons rétrodiffusés de pénétrer dans les détecteurs au risque de perdre de la résolution, voire de les endommager. Pour cela, un filtre en mylar de 250 µm d'épaisseur est placé devant le détecteur LEGe pour arrêter les protons jusqu'à $4{,}5\ MeV$. L'épaisseur du filtre de Mylar a par ailleurs été choisi afin de stopper tous les RX de moins de 3 keV[9]. Ce dispositif, assez simple, permet d'approcher le détecteur de l'échantillon tout en évitant de le saturer par les RX de basse énergie. Le SDD, que nous souhaitons utiliser pour détecter les RX de basse énergie, ne peut donc pas être équipé de ce type de

[9] La transmission des RX au travers d'un filtre de nature et d'épaisseur connues peut être calculée ici : https://henke.lbl.gov/cgi-bin/filter.pl

filtre. Il est équipé d'un filtre magnétique qui va défléchir les protons rétrodiffusés par l'échantillon sans atténuer les RX. La taille de ce filtre magnétique ne permet pas au détecteur d'être proche de l'échantillon (minimum à 10 cm), diminuant ainsi l'ange solide de détection du SDD. Néanmoins, les RX de basse énergie sont abondants. On peut dès lors se permettre de travailler avec cet angle solide de détection réduit. La combinaison des détecteurs ultra-LEGe et SDD permet de couvrir toute la gamme des RX. Avec l'ultra-LEGe essentiellement utile pour détecter les RX de haute énergie (> $10\ keV$), peu abondants tandis que le SDD détecte les RX de basse énergie (< $10\ keV$), beaucoup plus abondants.

La caméra permet d'observer l'échantillon avec un grossissement suffisant pour le positionner de façon précise et reproductible. Le porte-échantillon se place sur une canne rotative qui permet de minimiser la sédimentation des NPs durant la mesure lorsque l'on analyse des échantillons en phase liquide.

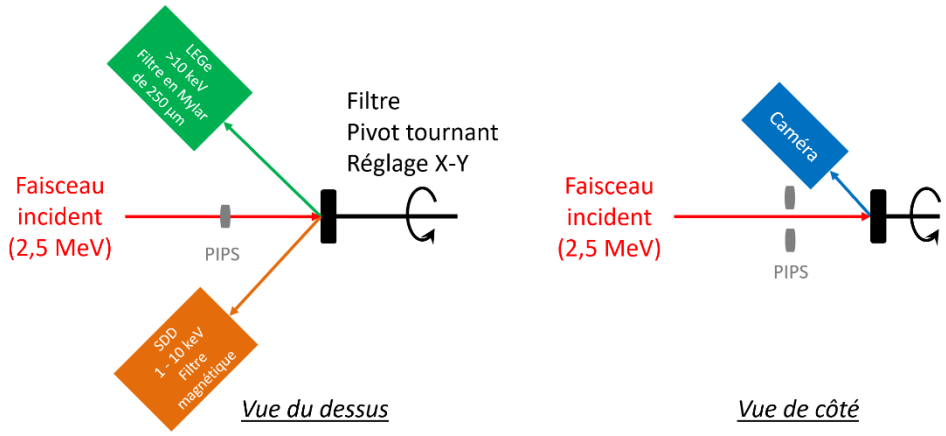


Figure 5. Schéma de la chambre d'analyse "PIXE Sciences de la vie", situé sur la ligne 30° gauche de l'accélérateur. Cette chambre en développement a subi des modifications pour pouvoir accueillir des échantillons liquides sous vide. Adapté des documents du projet PATROLS, mis à ma disposition par J. Colaux.

La difficulté dans la préparation des échantillons PIXE réside dans la capacité à obtenir un échantillon répondant aux prérequis de la quantification pour la technique, abordés au chapitre 2. L'angle solide de détection s'obtient grâce à l'analyse de cinq matériaux standards certifiés : BEN, MAN, DRN, MicaMg et MicaFe[10]. L'incertitude sur ce paramètre est d'environ 2,5%. Ensuite, le nombre de particules incidentes, équivalent à la charge collectée, est obtenu grâce au signal de la matrice d'eau dans les spectres EBS. Enfin, le dernier prérequis, la cible infinie, est difficile à obtenir dans notre cas car nous ne disposons que de peu de matière pour les échantillons. Dès lors, pour réussir à quantifier les échantillons en PIXE durant ce mémoire, deux voies ont été explorées : (i) quantification des nanoparticules en solution en utilisant des échantillons sous forme liquide dans la chambre sous vide ; et (ii) quantification des nanoparticules sur base d'échantillons solides préparés par techniques de séchage d'échantillons liquides.

Pour analyser des échantillons liquides dans une chambre d'analyse sous vide, un porte-échantillon expérimental a été mis au point dans le cadre du projet PATROLS (Figure 6). La pièce principale en acier inoxydable, conducteur, permet d'éviter l'accumulation de charges électriques

[10] Les certificats de ces standards sont disponibles à l'adresse : http://helium.crpg.cnrs-nancy.fr/SARM/pages/geostandards.html# (consultée le 4 juin 2020).

déposées dans le liquide lors de l'irradiation. De plus, le signal du fer, présent dans l'acier à ~72 at.%, permet de vérifier si le faisceau s'est bien arrêté dans le liquide. En effet, si le faisceau ne s'arrête pas dans le liquide, il viendra s'arrêter dans l'acier et on verra apparaître le pic du fer. On a ainsi un contrôle de qualité de la cible. Les pièces en PEEK (PolyEtherEtherKetone), composées de H, C et O, n'émettent pas de signal détectable par les détecteurs PIXE. Une feuille de Kapton ($C_{22}N_2O_5\ H_{10}$) de 12 µm d'épaisseur, qui allie grande résistance thermique et mécanique en plus d'une excellente transmittance pour les rayons X, scelle le porte-échantillon. L'épaisseur de la feuille permet de soutenir une pression de 1 atm sur la surface du porte-échantillon. Le joint permet d'en assurer l'étanchéité afin d'éviter l'évaporation du liquide sous vide. La profondeur de pénétration des protons de 2,5 MeV dans l'eau étant de 110 µm, la profondeur du porte-échantillon doit excéder cette taille.

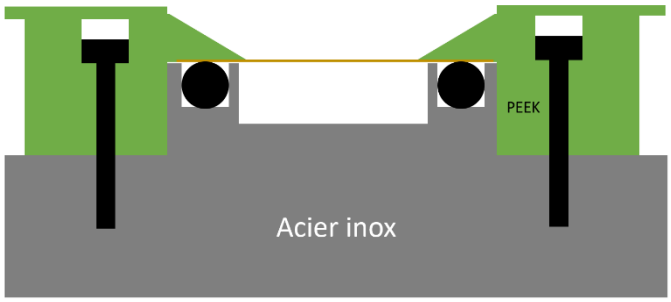


Figure 6. Porte-échantillon liquide développé au LARN pour le projet PATROLS. Adapté des documents du projet PATROLS. Il s'agit d'un schéma de principe qui n'est pas à l'échelle.

Le faible volume (environ 15 µl) du porte-échantillon présente deux avantages. Premièrement, dans le cas où le film de Kapton viendrait à céder lors de l'irradiation, relarguer le moins possible de liquide permet d'éviter d'endommager l'équipement. Deuxièmement, ceci permet de concentrer les solutions à analyser même si on n'a qu'une petite quantité de liquide à disposition.

Pour les mesures PIXE sans cellules, les concentrations testées sont de 100, 200, 400, 800 et 1000 µg/ml. Les nanoparticules ont été mises en solution dans de l'eau MilliQ et dans du milieu de culture. Une goutte de 18 µl de la concentration à tester est déposée dans le porte-échantillon avant de sceller celui-ci avec la feuille de Kapton. Le volume déposé en léger excès, par rapport au volume du porte-échantillon, permet d'éviter la formation de bulles d'air sous le Kapton. Le porte-échantillon est ensuite inséré dans la chambre d'analyse sur un bras limitant la sédimentation des nanoparticules lors de l'irradiation.

Lors des analyses, les échantillons sont irradiés avec un faisceau de protons de 2,5 MeV, d'un diamètre d'environ 1,5 mm et d'une intensité de 2 à 3 nA. La taille du faisceau est contrôlée par deux collimateurs. Le premier de 1,3 mm de diamètre définit la taille du faisceau et le deuxième de 1,5 mm de diamètre, placé une dizaine de centimètres plus loin, permet de stopper une grande partie du faisceau diffus. Le faisceau diffus vient du phénomène de diffusion vers l'avant du faisceau incident sur les bords des collimateurs (Figure 7). Il est impossible de s'affranchir de cet effet en utilisant une méthode mécanique pour collimater le faisceau. Il est, de ce fait, aussi impossible de s'affranchir du signal du fer dans nos spectres PIXE. En effet, le faisceau est diffusé à de plus grands angles que celui représenté à la Figure 7 et des protons du faisceau diffus peuvent alors rencontrer l'acier inoxydable de la chambre. On n'a pas ce genre de problème lorsque l'on travaille avec des quadrupôles pour focaliser le faisceau (comme c'est le cas en µ-PIXE). Le temps d'acquisition est quant à lui fixé à 10 minutes. Le petit temps d'acquisition et la faible intensité du faisceau ont pour but d'éviter

d'endommager le film mince de Kapton qui pourrait céder et conduire à un relargage du liquide dans la chambre d'analyse sous vide.

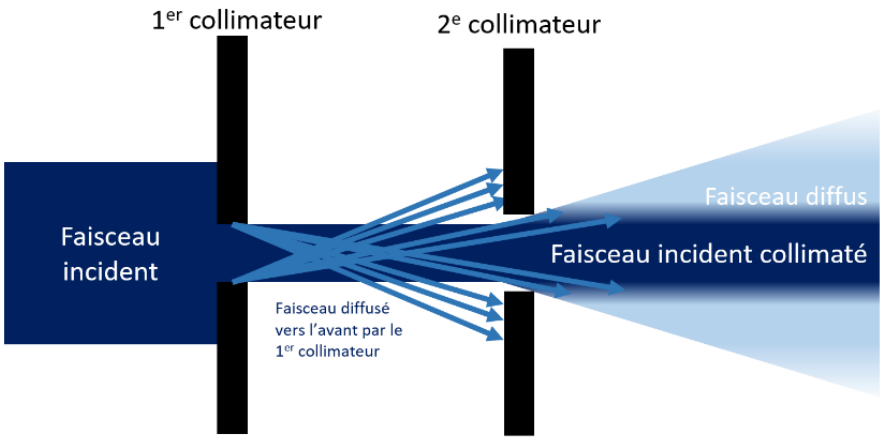


Figure 7. Schéma montrant le contrôle de la taille du faisceau par les deux collimateurs ainsi que le faisceau diffus produit par ceux-ci.

Les analyses effectuées dans le cadre du projets PATROLS ont permis de valider le dispositif et d'en déterminer la limite de détection (LOD) pour l'oxyde de zinc. Tout d'abord, les détecteurs LEGe et SDD, traités indépendamment l'un de l'autre, sont toujours en accord l'un avec l'autre. Ceci valide le dispositif. Ensuite, la LOD a été établie à 10 ppm massique, ce qui n'est pas suffisant pour ce travail. En effet, les analyses des éléments traces dans les cellules par PIXE requièrent une sensibilité de l'ordre du ppm. Pour pallier cette limitation, on peut concentrer les échantillons par évaporation. Grâce à cela, on abaisse la LOD à 1 ppm massique.

Alors que la quantification absolue des spectres PIXE est laborieuse, la semi-quantification est plus simple à mettre en œuvre. Pour ce faire, nous pouvons normaliser l'aire de la raie K_α du zinc par l'intensité du signal EBS de l'eau. Cette normalisation nous permet de nous affranchir du nombre de particules incidentes. Le nombre de particules incidentes varie d'un échantillon à l'autre car l'intensité du faisceau incident n'est pas parfaitement stable et le temps d'acquisition varie légèrement d'un échantillon à l'autre. Cette semi-quantification, rapide à effectuer, permet d'obtenir un résultat rapide après la mesure PIXE. Il est donc intéressant de commencer par une semi-quantification avant de quantifier de manière absolue un spectre.

De plus, une technique de concentration des échantillons par évaporation a été testée avec des concentrations de 10, 20 et 40 µg/ml dans le but d'obtenir des concentrations respectives de 100, 200 et 400 µg/ml. L'évaporation se passe dans un four chauffé à 90°. On dépose 1 ml de la solution à concentrer dans un Eppendorf gradué et on attend environ 4h pour que le liquide atteigne la graduation de 100 µl.

Concernant la quantification des échantillons biologiques, la déshydratation de l'échantillon liquide a été privilégiée. En effet, la déshydratation permet de concentrer l'échantillon pour se placer dans une gamme de concentration que l'on souhaite supérieure à la LOD de 10 ppm massique. En déshydratant les cellules, on ne récupère que peu de matière. Idéalement, la matière déshydratée devrait se déposer uniformément sur notre support. Dans ce cas (Figure 8.a), nous pourrions déterminer la quantité de matière déposée (en µg/cm²) connaissant la surface sur laquelle la matière

a été déshydratée, la quantité de liquide déposée avant déshydratation et le facteur de réduction de la matière déshydratée (estimée à 85,28 % dans le cadre du projet de recherche de première année de master). Ceci nous permettrait d'effectuer une quantification des NPs, même si la quantité de matière déposée était insuffisante pour stopper le faisceau incident. Cependant, la surface de l'échantillon déshydraté ressemble plus à celle de la Figure 8.b. Dans ce cas, le faisceau étant plus petit que la surface sur laquelle on a déshydraté l'échantillon, il est impossible de déterminer la quantité de matière (en µg/cm²) qui est analysée. Et donc, la quantification de l'échantillon est n'est plus possible.

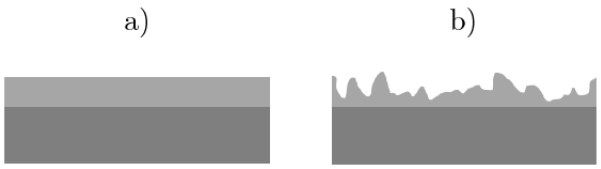


Figure 8. a) Surface idéale permettant une quantification en PIXE. b) Structure en surface typique obtenue après une déshydratation des cellules. Adapté des documents du projet PATROLS.

Pour la préparation d'échantillons avec cellules pour une analyse PIXE, deux pistes ont été investiguées. La première consiste à faire sécher goutte par goutte au four une solution concentrée en cellules sur un porte-échantillon compatible avec la chambre PIXE de l'accélérateur. La seconde utilise un SpeedVac, une centrifugeuse sous vide, qui permet de déshydrater les cellules.

Pour tester la première idée, deux tests ont été effectués au four à 70 °C. La température ne doit pas être trop élevée pour ne pas brûler les échantillons mais suffisamment élevée afin que le séchage se fasse rapidement. Pour cela, on a récupéré un culot de cellules que l'on a suspendu dans 100 µl d'eau MilliQ. Sur l'un des porte-échantillons, on a fait sécher des gouttes de 20 µl. Sur un autre porte-échantillon, ce sont des gouttes de 40 µl qui ont été séchées. Un première observation à l'œil nu permet de voir s'il existe une différence de structure dans l'échantillon sec pour des paramètres de séchage différents. On souhaite obtenir une compacité maximale.

Pour tester la seconde idée, nous disposons d'un SpeedVac Heta VR-1. Ce SpeedVac dispose d'un plateau permettant de placer des Eppendorfs de 1 cm de diamètre en embouchure. Un nouveau plateau permettant d'y placer 2 Falcons® a été conçu avec l'aide de T. Tabarrant (Figure 9). L'avantage de la déshydratation centrifuge est qu'avec la force exercée, on espère obtenir une surface uniforme (Figure 8.a) et non plus en dent de scie (Figure 8.b). Cependant, le plateau n'a pas pu être testé par manque de temps.

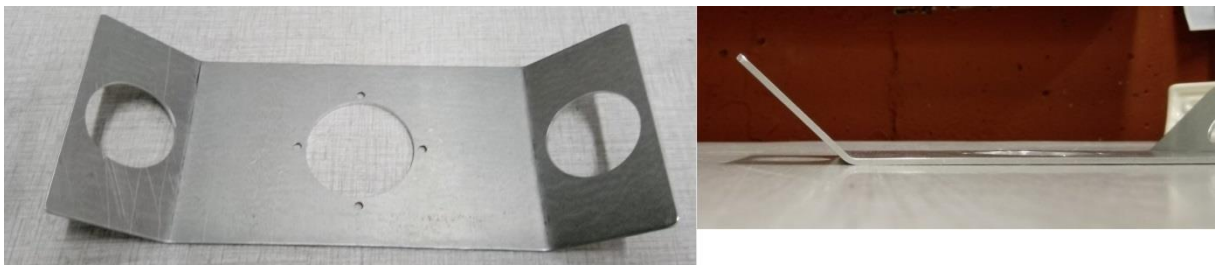


Figure 9. Photo du porte-échantillon conçu pour être compatible avec le SpeedVac. À gauche une vue du haut et à droite une vue de côté.

4 RESULTATS

4.1 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

4.1.1 Toxicité

Les données obtenues grâce aux tests MTS sont normalisées par rapport à deux contrôles. Le premier est un contrôle où les cellules ne sont pas mises en contact avec des nanoparticules. Le second est un ''blanc'', c'est-à-dire un contrôle où il n'y a que des nanoparticules. Les barres d'erreur sont obtenues en calculant l'erreur propagée à partir des déviations standards sur les mesures de chaque échantillon.

On observe un nette diminution de la survie cellulaire lorsqu'on augmente la concentration en nanoparticules de ZnO. Pour obtenir l'IC50 (*half maximum inhibitory concentration*), on effectue un ajustement des points expérimentaux au moyen d'une équation sigmoïdale de type viabilité cellulaire en réponse à une dose d'un agent pharmaceutique reçue après 24h. L'ajustement des points a été fait avec *OriginPro* suivant l'équation suivante :

$$Viabilité(x) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{\log(x_0 - x)p}} \tag{9}$$

où

- A_1 est la valeur de la survie en bas du plateau, supérieure à 0% ;
- A_2 est la valeur de la survie en haut du plateau, fixée à 100% ;
- $\log(x_0)$ est la valeur de la concentration lorsque la survie est entre les plateaux du haut et du bas i.e. lorsque la survie vaut $(A_2 - A_1)$;
- x est la concentration de l'agent pharmaceutique, les nanoparticules de ZnO dans notre cas ;
- p est la valeur de la pente qu'a la courbe en $x = x_0$.

Un premier test avec une large gamme de concentration a été fait pour isoler une gamme plus restreinte de concentrations à tester. Ce premier test à ''spectre large'' donne une IC50 aux alentours de 50 µg/ml (Figure 10). Dans les tests suivants, la gamme de concentration choisie a été restreinte de 10 à 90 µg/ml pour diminuer l'erreur sur la valeur de l'IC50. Le test à large gamme de concentrations ne servant qu'à donner un ordre de grandeur à l'IC50, il n'a été fait qu'une fois.

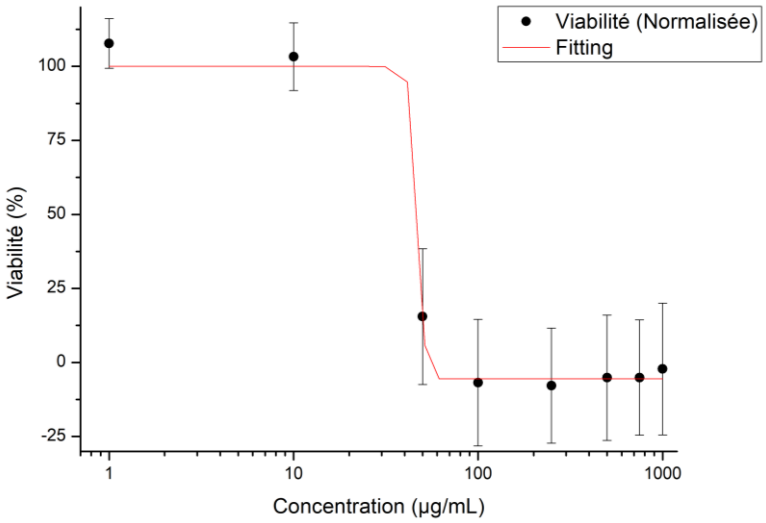


Figure 10. Taux de survie des cellules A549 mises en contact durant 24h avec différentes concentrations de nanoparticules de ZnO. Test effectué sur une large gamme de concentration.

Pour trouver l'IC50, on isole x dans l'équation (9) et on fixe le taux de survie à 50 %. On a obtenu une valeur de $33{,}1 \pm 1{,}7\ \mu g/ml$ lors du test sur une gamme réduite de concentrations (Figure 11). L'erreur est obtenue en propageant l'erreur donnée par *OriginPro* pour $\log(x_0)$ qui est proche de l'IC50.

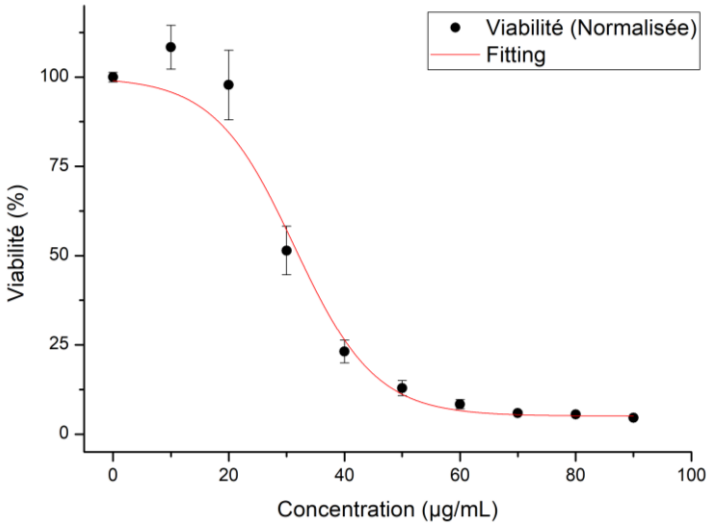


Figure 11. Taux de survie de cellules A549 mises en contact avec différentes concentrations de nanoparticules de ZnO durant 24h (N=3).

L'IC50 proche de $30\ \mu g/ml$ permet de prévoir un haut taux de survie pour les concentrations de 1 à 10 µg/ml choisies pour le reste des expériences.

4.1.2 Les nanoparticules

Les clichés pris en microscopie électronique à transmission en haute résolution montrent que les nanoparticules forment de gros agrégats et qu'elles sont, pour la plupart, de forme quasi sphérique (Figure 12).

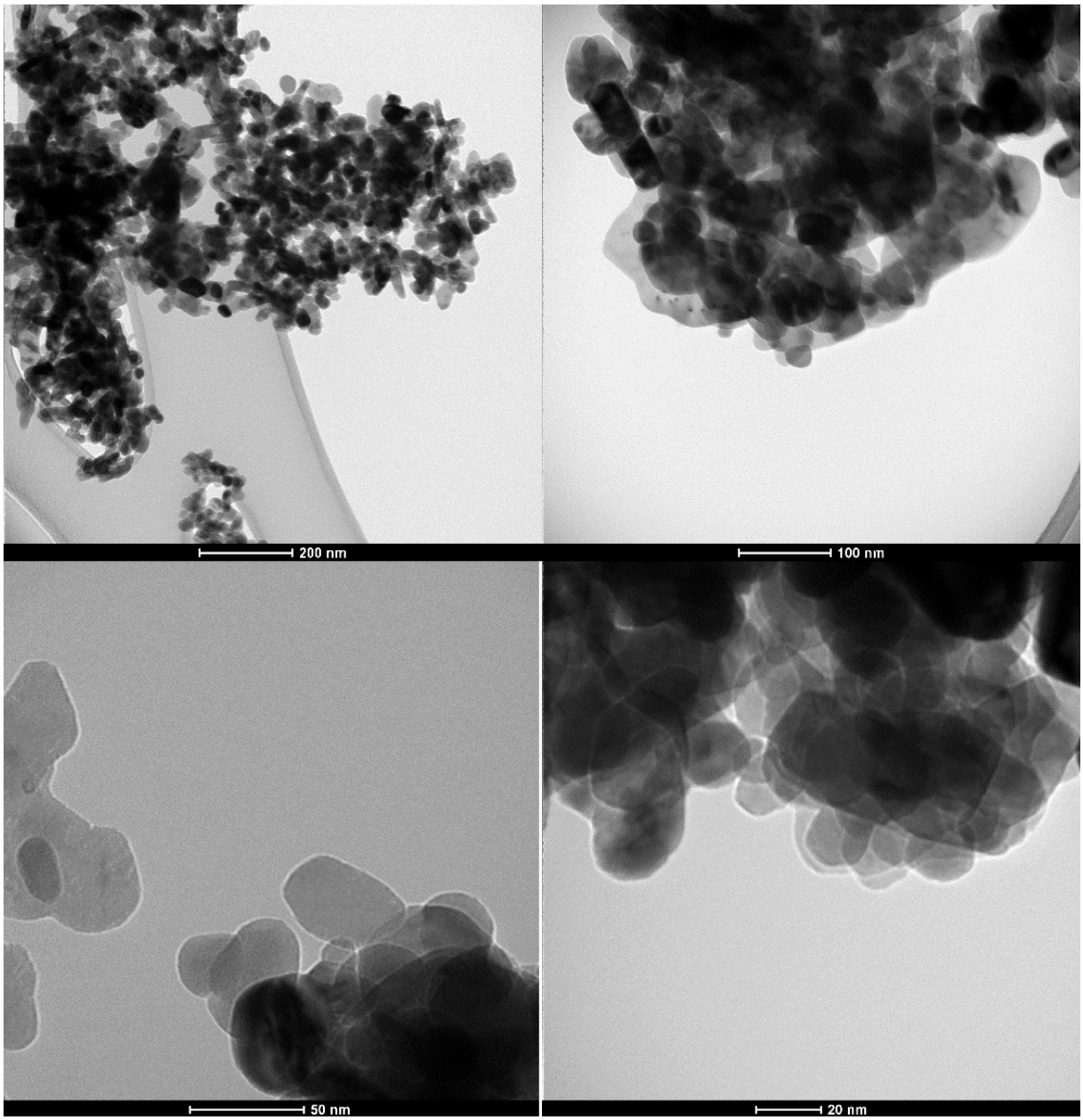


Figure 12. Images TEM en haute résolution des nanoparticules d'oxyde de zinc.

Les résultats pour la caractérisation de la taille des nanoparticules par CLS sont repris à la Figure 13. La masse est estimée à partir du paramètre de densité du matériau analysé qui est renseigné au programme d'acquisition préalablement à la mesure. Pour calculer la masse, le programme utilise le diamètre hydrodynamique afin de calculer le volume de la sphère associée et multiplie ce volume par la densité introduite dans le programme. Notons que l'intensité du signal à un diamètre hydrodynamique donné n'est pas proportionnelle au nombre de nanoparticules détectées à ce diamètre. En effet, le nombre de nanoparticules à un diamètre donnée vaut la masse/densité/volume d'une sphère de ce diamètre. Cette représentation a l'avantage de faire apparaître de manière claire les populations d'agrégats qui sont quasiment invisibles en représentation ''nombre de nanoparticules en fonction de la taille''.

Les distributions de masse en fonction du diamètre hydrodynamique pour les mesures prises à deux vitesses de rotation différentes sont présentées aux Figure 13.c et 13.d. On voit qu'il y a au moins deux populations de tailles différentes dans les agrégats formés.

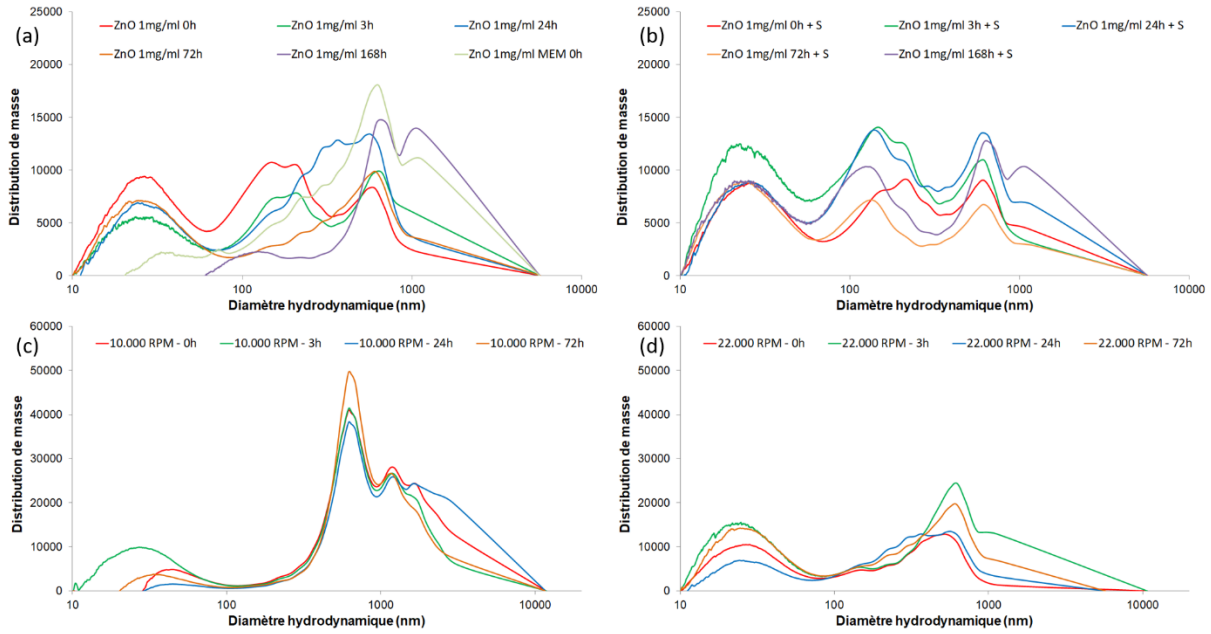


Figure 13. Distribution de masse des nanoparticules en fonction du diamètre hydrodynamique. (a) Pour différents temps après la mise en solution sans sonication. (b) Pour différents temps après la mise en solution avec sonication. (c) À 10 000 RPM. (d) À 22 000 RPM. Toutes les mesures ont été réalisées avec une solution concentrée à 1 mg/ml.

Concernant la stabilité des nanoparticules en solution, les mesures du potentiel zêta des nanoparticules de ZnO dans les deux solutions différentes donnent deux valeurs de même ordre de grandeur mais de signes opposés (Tableau 4).

Potentiel zêta (mV)	
NPs dans de l'eau MilliQ	$8{,}66 \pm 0{,}42$
NPS dans du milieu de culture	$-8{,}53 \pm 0{,}18$

Tableau 4. Potentiel zêta des nanoparticules de ZnO en solution dans de l'eau MilliQ et dans du milieu de culture cellulaire.

Les spectres XPS, montrent correctement les pics caractéristiques de l'oxyde de zinc avec le pic Auger du ZnO à $988\ eV$ (Figure 14.a) et le pic 1s de l'oxygène vers $529 - 530\ eV$ (Figure 14.b) [39]. Néanmoins, on ne voit pas de manière significative les pics associés au silicium et à l'azote (Figure 14.c et d) qui sont présents dans le revêtement des nanoparticules.

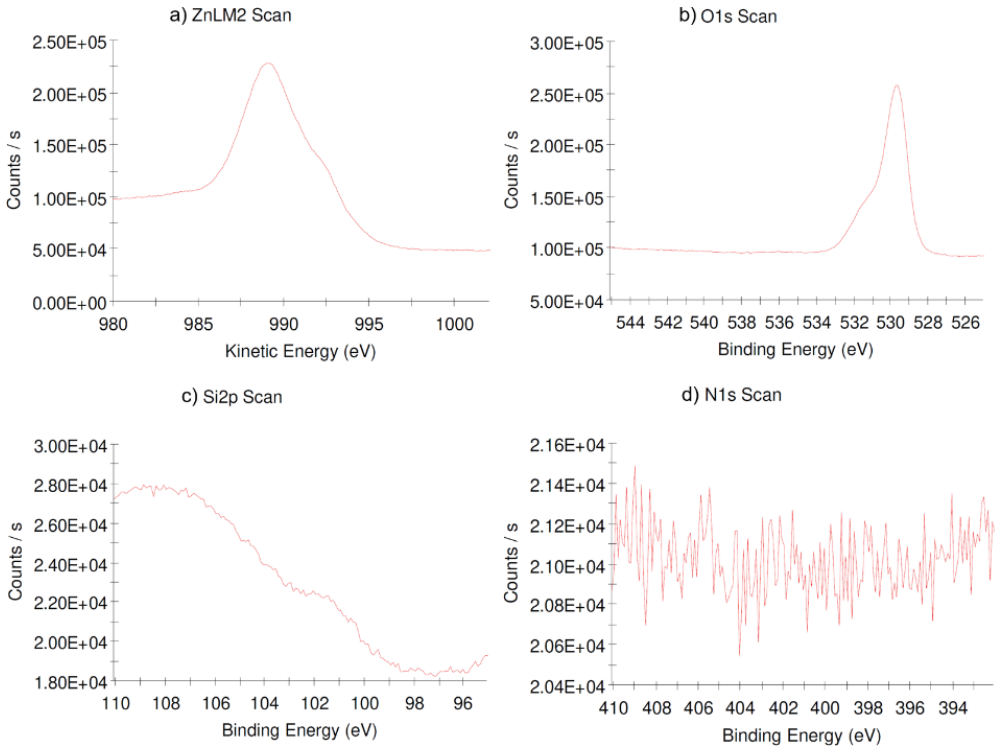


Figure 14. Spectres XPS acquis sur la nanopoudre commerciale ZnO autour des régions a) du pic Auger du zinc, b) 1s de l'oxygène, c) 2p du silicium et d) 1s de l'azote.

Une comparaison d'un spectre à large gamme en énergie d'oxyde de zinc ''bulk'' avec celui de la nanopoudre d'oxyde de zinc montre de grandes similarités comme on peut le voir sur la Figure 15. Le spectre d'oxyde de zinc sous forme ''bulk'' a été fourni par F. Bocchese du LARN.

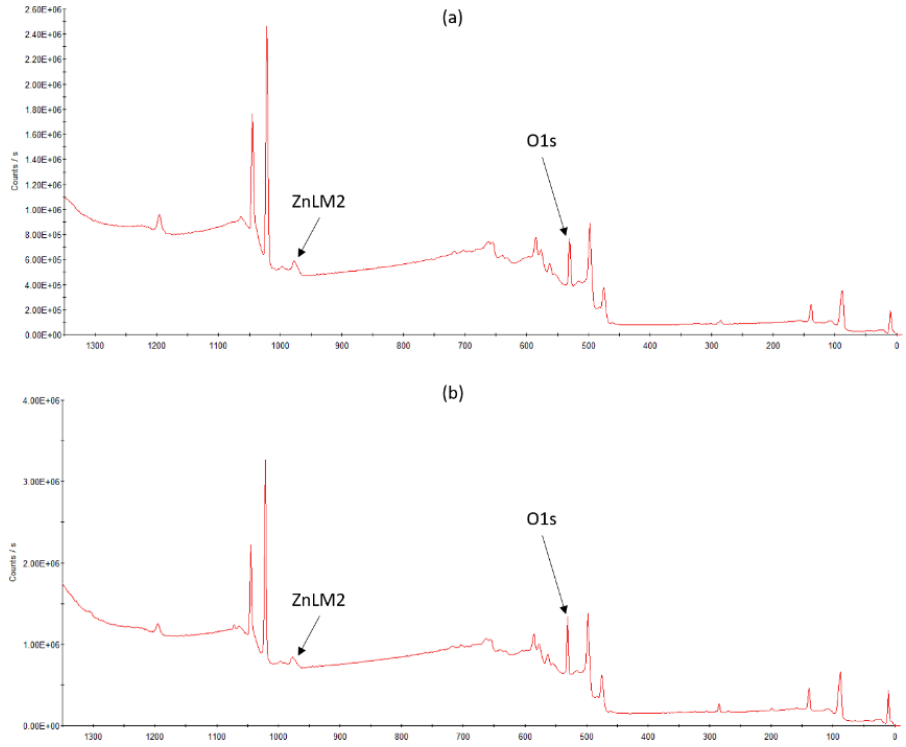


Figure 15. Spectres à large gamme en énergie (a) d'oxyde de zinc ''bulk'' et (b) de la nanopoudre d'oxyde de zinc achetée.

4.2 AAS

Les données obtenues pour les analyses AAS d'échantillons de nanoparticules de ZnO sans cellules sont reprises dans la Figure 16. Les 6 points d'étalonnage ont pour concentration 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 1,5 ppm massiques de Zn. La régression linéaire sur ces 6 points donne la droite d'étalonnage avec un coefficient de corrélation de 0,9983. Les standards ont été préparés en 3 réplicas. Les barres d'erreur verticales sont obtenues en calculant la déviation standard sur l'absorbance de l'AAS et les barres d'erreur horizontales en calculant la déviation standard des concentrations données pour les 3 réplicas. La droite d'étalonnage s'obtient grâce à la moyenne des absorptions des standards.

Les échantillons de NPs de ZnO ont été préparés en tripliquas pour des concentrations de 1 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 et 0,1 mg de ZnO par ml de solution.

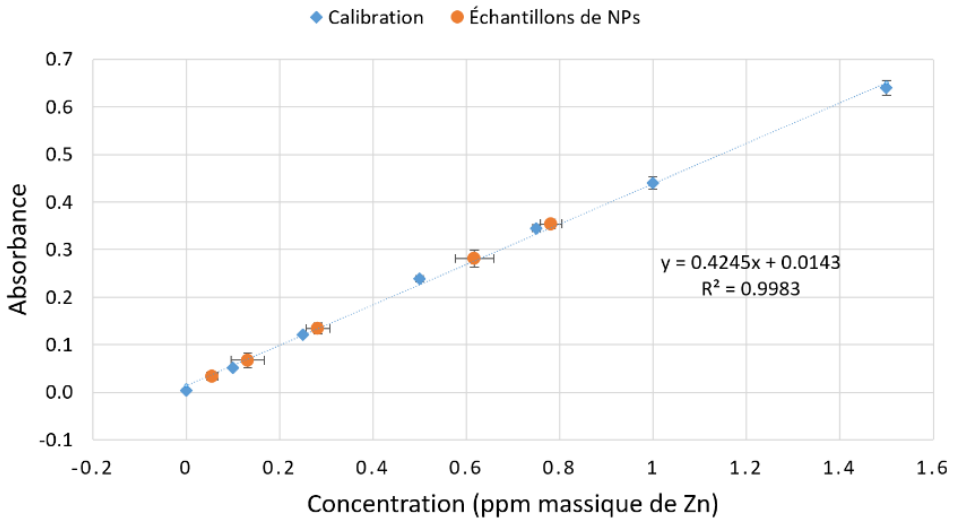


Figure 16. Données obtenues pour les analyses AAS d'échantillons de nanoparticules dissoutes (N=3).

L'AAS fournit une mesure de l'absorption atomique. La droite d'étalonnage, pour laquelle nous avons utilisé un standard de Zn en ppm massique, nous permet d'attribuer une concentration en ppm massique à une absorption mesurée.

Les résultats des analyses AAS avec cellules, où elles ont été exposées pendant 24 h à des concentrations de 1, 2, 4, 8 et 10 µg/ml de nanoparticules, sont donnés à la Figure 17. Pour calculer la quantité de zinc internalisée par les cellules, la concentration en zinc mesurée par l'AAS est divisée par le nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Les barres d'erreur prennent en compte des erreurs sur le comptage des cellules ainsi que sur la mesure de l'absorption par l'AAS. On observe bien une augmentation de la quantité de zinc internalisée par les cellules avec l'augmentation de la concentration en nanoparticules de la solution incubée. Cependant, compte tenu des barres d'erreur, les valeurs observées pour les trois plus petites concentrations sont très proches de zéro.

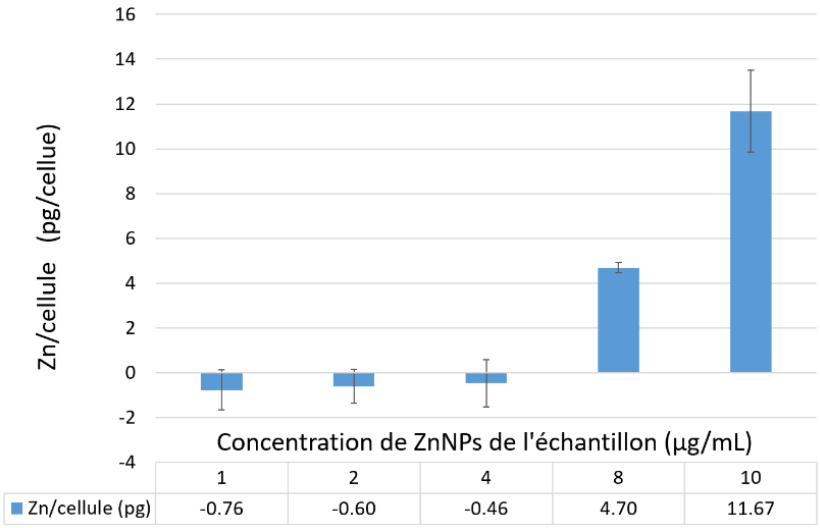


Figure 17. Quantité de zinc internalisée par la cellule en fonction de la concentration en nanoparticules de ZnO mise en contact durant l'incubation (N=2). Les barres d'erreur tiennent compte de l'erreur sur le comptage des cellules.

4.3 PIXE

Pour la normalisation des spectres, la région d'intérêt (ROI) du zinc a été fixée de $8{,}40$ à $9{,}75\ keV$ sur le spectre PIXE (Figure 19) et la ROI correspondant aux protons rétrodiffusés par la matrice d'eau a été fixée de $384{,}7$ à $1230{,}4\ keV$ sur le spectre EBS (en rouge sur la Figure 18). Sur ce dernier, on voit bien le signal du carbone, de l'azote et de l'oxygène du Kapton entre 1250 et $2000\ keV$.

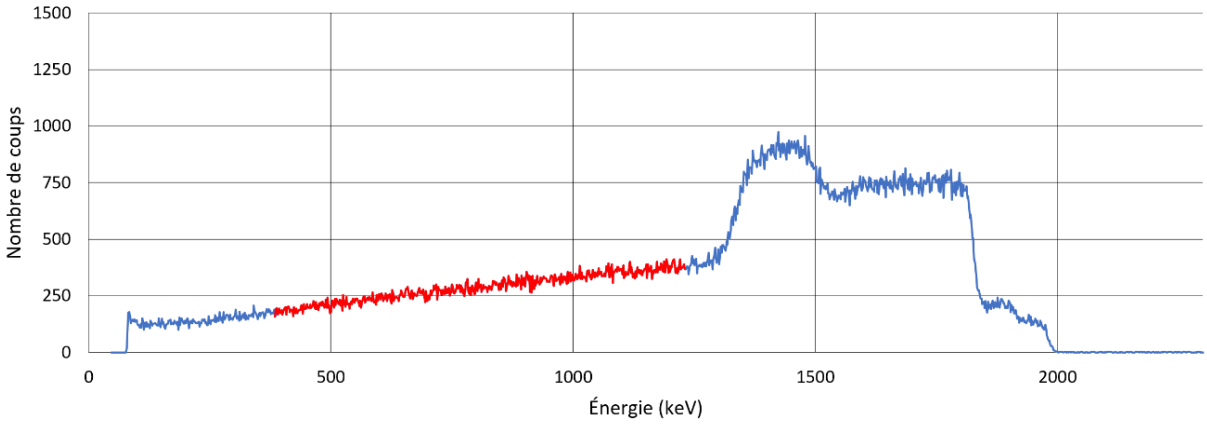


Figure 18. Spectre EBS de l'échantillon à 0,1 mg/ml dans de l'eau MilliQ. La ROI de l'eau est marquée en rouge.

Les spectres PIXE obtenus pour les nanoparticules en solution dans l'eau MilliQ sont repris à la Figure 19. Les pics K_α et K_β du zinc sont bien visibles aux alentours de 8,6 keV et 9,6 keV respectivement. On remarque aussi le pic du fer vers 6,4 keV et un pic de calcium à 3,7 keV. On voit que pour une concentration en nanoparticules plus importante, le pic du zinc est plus grand.

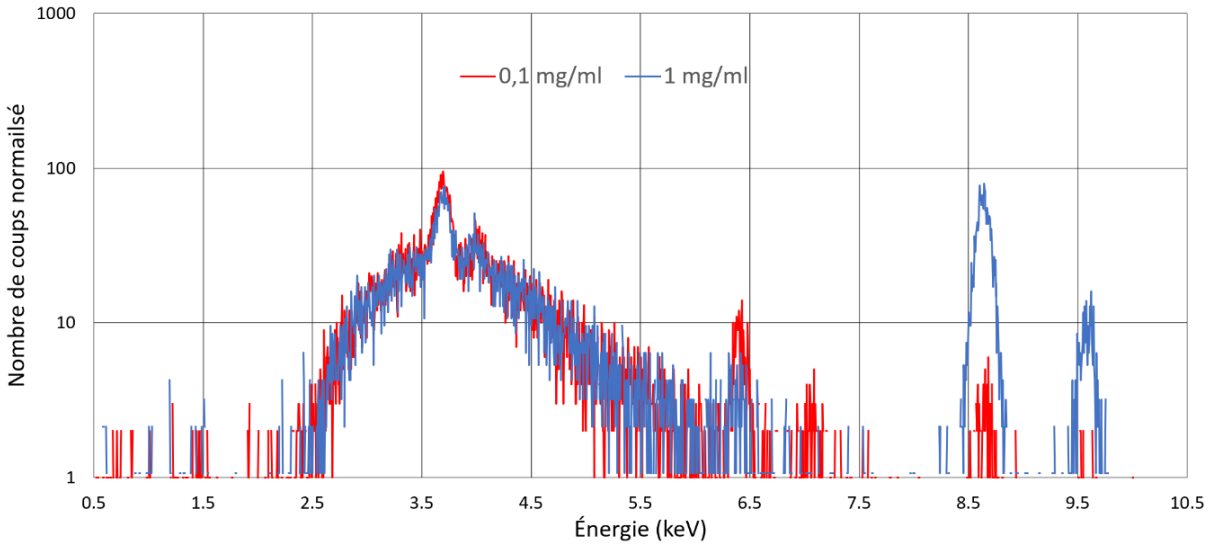


Figure 19. Spectre PIXE des échantillons de nanoparticules en solution dans de l'eau pour des concentrations de 0,1 et 1 mg/ml.

5 DISCUSSION

5.1 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

Les distributions des diamètres hydrodynamiques obtenues grâce aux analyses CLS mettent en évidence la faible stabilité des nanoparticules en solution colloïdale. En effet, on voit que la formation d'agrégats de différentes populations se produit directement après la mise en solution des nanoparticules dans l'eau distillée (courbes rouges sur les graphes de la Figure 13). Si les nanoparticules ne s'agrégeaient pas, on verrait une seule population de taille aux alentours de 20 nm sur ces graphes. La courbe kaki de la Figure 13.a montre que dans le milieu de culture, la formation d'agrégats est instantanée et une population d'agrégats d'un diamètre de 620 nm se forme. Après une semaine (168h), on ne retrouve plus de population aux alentours de 25 nm si on ne sonique pas avant la mesure (courbes mauves sur les graphes (a) et (b) de la Figure 13). Lorsque l'on prend une vitesse de rotation plus grande (i.e. 22 000 RPM, Figure 13.d), permettant d'avoir plus de mesures pour les particules de petits diamètres, on voit que les nanoparticules possèdent un diamètre légèrement plus grand que celui de 18 nm annoncé. Pour une vitesse de rotation plus faible (i.e. 10 000 RPM, Figure 13.c), qui permet d'avoir plus de mesures pour les grands diamètres, on observe que les NPs forment rapidement des agrégats avec deux populations distinctes en termes de taille comme le montrent les deux pics distincts observés à 640 et 1150 nm. Notons que l'on retrouve une population d'agrégats de diamètre proche (i.e. 620 nm) lorsque les nanoparticules sont dans du milieu de culture. On remarque, dans la Figure 13.b, que la sonication des échantillons fait apparaître au moins 3 populations de tailles différentes aux alentours de 25, 125 et 680 nm pour tous les temps testés. La sonication permet donc de disperser les agrégats de manière efficace. Cependant, le procédé étant violent pour les nanoparticules, il y a un risque de les détruire.

La CLS mesure la taille des nanoparticules à partir de leur densité. Cependant, la densité des agrégats n'est pas la même que celle des nanoparticules. Ils ont en réalité une densité plus faible qu'une nanoparticule seule car il s'agit de structures poreuses. De plus, l'approximation de sphéricité pour les agrégats n'est plus valable. Cette structure des agrégats est visible sur les clichés TEM (Figure 12) où l'on observe aussi qu'ils possèdent des formes quelconques et variables. Ces formes irrégulières peuvent conduire à d'importantes erreurs (> 20 %) sur la détermination de la taille des nanoparticules [40].

Cette formation rapide d'agrégats et leur sédimentation peut s'expliquer par le faible potentiel zêta des nanoparticules. En effet, plus le potentiel zêta est petit, moins les nanoparticules auront tendance à se repousser les unes les autres [41]. Ceci défavorise leur dispersion dans la solution. Une dispersion est considérée comme pouvant se faire par la seule force de répulsion des charges pour une valeur du potentiel zêta $> 30\ mV$ ou $< -30\ mV$ [42]. Notons que la valeur du potentiel zêta mesurée dans l'eau MilliQ est huit fois plus petite que celle que l'on retrouve dans la littérature pour des nanoparticules de ZnO recouvertes de silane [43]. Ceci peut venir de la pureté différente de l'eau distillée car la présence d'ions dans l'eau distillée peut influencer la valeur du potentiel. Une autre explication est la mauvaise qualité, voire l'absence du revêtement en silane. Dans le milieu de culture, la valeur du potentiel est du même ordre de grandeur que celle que l'on trouve dans la littérature pour des nanoparticules de ZnO sans revêtement [44]. Les nanoparticules testées ici sont donc aussi peu stables dans l'eau distillée que dans le milieu de culture. La valeur mesurée dans le milieu de culture s'explique par la formation d'une corona de protéines autour de la nanoparticule. En effet, il a été

rapporté dans la littérature qu'une corona de protéine se forme systématiquement autour des nanoparticules non organiques lorsque celles-ci sont mises en solution dans un liquide biologique (i.e. une solution contenant des protéines). Les protéines se lient aux nanoparticules via des interactions électrostatiques avec les charges en surface de celles-ci. La formation de cette corona de protéine fait chuter la charge de surface jusqu'à des valeurs négatives [45] et augmente la taille des nanoparticules. Il a été observé que de manière générale, les nanoparticules d'oxydes métalliques dans du milieu de culture ont tendance à avoir un potentiel zêta proche de celui du milieu qui vaut $-8{,}5\ mV$ [44]. La corona de protéine joue un rôle important dans les mécanismes d'internalisation des nanoparticules. Elle va donner son identité biologique aux nanoparticules et ce sont les protéines en surface qui vont interagir avec les récepteurs de la membrane cellulaire [46].

L'absence de revêtement en silane suggérée par la mesure du potentiel zêta dans l'eau MilliQ est confirmée par l'analyses XPS. On ne voit en effet aucune trace ni de silicium ni d'azote dans les spectres XPS. Pourtant, ces deux éléments sont censés être présents dans le revêtement (Figure 3). Deux des pics associés au revêtement, le pic 2p du silicium (Si2p) et le pic 1s de l'azote (N1s), devraient sortir respectivement à $102{,}6$ et $405\ eV$ [47] [48]. Cependant, les scans de l'XPS autour de ces deux énergies ne montrent aucune trace des pics recherchés (Figure 14.c et Figure 14.d). De plus, si le revêtement était bien présent, on aurait dû observer une diminution relative de l'intensité des pics liés à l'oxyde de zinc par comparaison à l'analyse d'une cathode ZnO, ce qui n'est pas le cas (Figure 15).

L'absence du revêtement est appuyée par les mesures de toxicité des nanoparticules. Lorsque l'on compare la toxicité des nanoparticules testées avec celle que l'on trouve dans la littérature pour des nanoparticules de ZnO sans revêtement, on obtient des valeurs similaires. En effet, on reporte dans la littérature une IC50 théorique de $31{,}0\ \mu g/ml$ pour des nanoparticules d'oxyde de zinc sphériques de 20 nm de diamètre sans revêtement [44]. L'IC50 obtenue pour les nanoparticules caractérisées ici est très proche de cette valeur avec une IC50 de $33{,}1\ \pm\ 1{,}7\ \mu g/ml$, calculée à partir de nos mesures de cytotoxicité. La toxicité des nanoparticules de ZnO venant de leur dissolution en ions Zn^{2+}, un revêtement devrait protéger les nanoparticules de la dissolution [29]. On s'attend donc à trouver une IC50 plus grande pour les nanoparticules avec le revêtement.

Sur base de ces analyses, nous avons pu confronter le fabriquant qui a admis son erreur et accepté de nous envoyer un nouveau batch de nanoparticules de ZnO revêtues de silane gratuitement. Malheureusement, ce second nous est seulement parvenu fin décembre 2019. Suite à la déclaration du Covid-19 début 2020 et du confinement qui s'en est suivi, il nous a malheureusement été impossible d'exploiter ce second batch de nanoparticules de ZnO. Seules les mesures en PIXE ont été réalisées sur base des nanoparticules ZnO revêtues de silane. Le revêtement de silane devait initialement permettre une meilleure internalisation par les cellules et une meilleure stabilité en solution colloïdale grâce aux groupements NH_2. L'impact de son absence s'est traduit par l'impossibilité de mener notre étude sur l'internalisation des nanoparticules de ZnO par les cellules A549. Seule la comparaison des mesures AAS et PIXE sur des solutions de ZnO à différentes concentrations a par conséquent pu être effectuée dans le cadre de ce travail.

5.2 AAS

L'écart d'environ 20 % observé entre la mesure AAS et la concentration initiale de nanoparticules dans les échantillons (points orange sur la Figure 16), sachant que 1 µg/ml vaut 1 ppm massique, s'explique par le fait que nous ne mesurons pas une concentration en ZnO mais bien une

concentration de Zn. Le zinc ayant une masse atomique de 65,38 uma et l'oxygène de 15,99 uma, le zinc participe à hauteur de 80,34% de la masse de la molécule. Une comparaison des résultats théoriques et des mesures est reprise à la Figure 20. Les valeurs théoriques sont calculées en tenant compte de la pureté annoncée de la nanopoudre fournie et de la concentration des échantillons mesurés. Les barres d'erreur sur les concentrations théoriques ont été calculées en prenant l'erreur maximale tolérée par la norme ISO 8655 pour les pipettes que nous avons utilisées pour préparer nos dilutions [49]. La norme ISO 8655 a été utilisé pour le calcul d'erreur car je n'ai pas pris note du modèle des différentes pipettes utilisées. J'ai donc cherché l'erreur maximale autorisé pour l'ensemble des pipettes du marché.

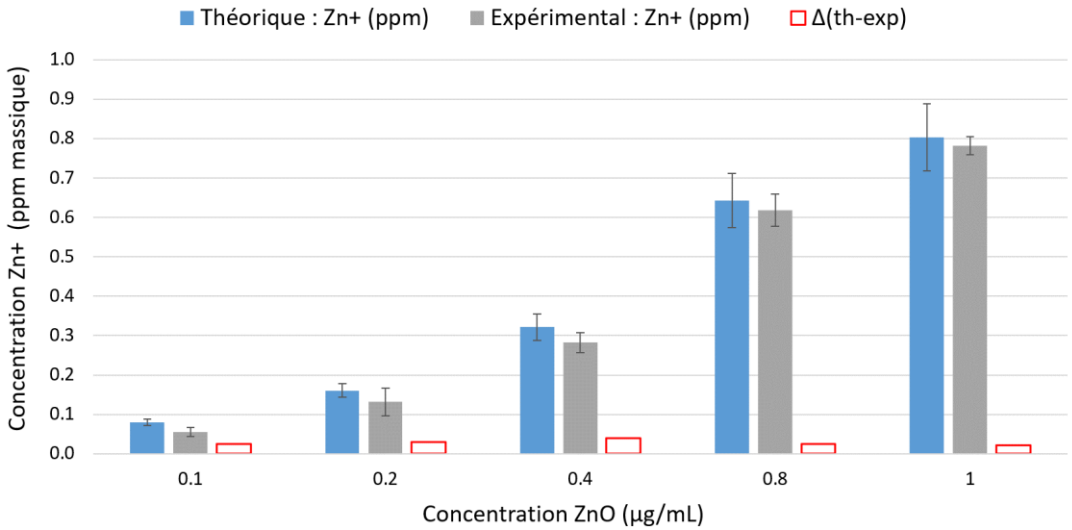


Figure 20. Comparaison des résultats expérimentaux obtenus avec l'AAS avec les résultats prévus par calcul des concentrations. Les barres d'erreur sur les concentrations théoriques sont calculées à partir de l'erreur maximale autorisée par la norme ISO 8655 pour les pipettes et celles sur les concentrations expérimentales à partir de la déviation standard des triplicatas.

On observe que les différences absolues entre les valeurs théoriques et mesurées (en rouge sur la Figure 20) sont plus ou moins constantes pour toute les concentrations. Cette différence absolue constante peut se traduire par un décalage de la droite d'étalonnage. En théorie, la droite d'étalonnage doit passer par 0 lorsque la concentration en Zn est nulle. Cependant, la régression linéaire effectuée pour obtenir cette droite donne une absorbance de $0{,}009 \pm 0{,}003$ pour une concentration en zinc nulle. Ce décalage permet d'expliquer les valeurs expérimentales systématiquement inférieures aux valeurs théoriques. Néanmoins, le recouvrement des barres d'erreur pour tous les échantillons permet de dire que les valeurs théoriques et expérimentales sont en accord. La différence absolue restant constante, la différence relative augmente pour les petites concentrations (Tableau 5). Ainsi, pour une concentration de 0,1 µg/ml, on ne retrouve que 70 % de la quantité de zinc que nous souhaitions.

ZnO (ppm)	Zn^{++} théorique (ppm)	Zn^{++} expérimental (ppm)	Différence absolue (ppm)	Différence relative (%)
1	0,80	0,78	0,02	2,7
0,8	0,64	0,62	0,03	3,9
0,4	0,32	0,28	0,04	12,2
0,2	0,16	0,13	0,03	18,2
0,1	0,08	0,06	0,02	30,1

Tableau 5. Concentrations théoriques et expérimentales en ions Zn^{++} mesurées en AAS[11], leurs différences absolue et relative.

Ces déviations peuvent s'expliquer par deux principales manipulations des nanoparticules. Premièrement, la préparation du stock de nanoparticules de concentration maitrisée, représente un défi en soi. Théoriquement, la balance utilisée pour peser la poudre qui sera mise en solution dans l'eau pour préparer le stock est précise au dixième de mg près. Expérimentalement, les chercheurs du LARN ont remarqué qu'elle ne permettait pas de peser moins d'un milligramme de manière précise. Ils conseillent de peser au minimum une dizaine de milligrammes pour avoir une erreur inférieure à 10% sur la mesure de la masse. Il est possible qu'une erreur sur la pesée soit responsable de la sous-évaluation de la quantité de nanoparticules dans le stock. Cette erreur explique la concentration expérimentale systématiquement plus petite que la concentration théorique mais pas l'augmentation de l'écart aux faibles concentrations. Deuxièmement, les multiples dilutions effectuées pour obtenir de si petites concentrations à partir d'un stock de 1 mg/ml sont sources d'erreurs. Les pipettes utilisées ne sont pas parfaites et une perte de liquide est envisageable à chaque pipetage.

Concernant les analyses AAS avec cellules, on remarque que les concentrations mesurées, et donc les masses de zinc par cellule, pour 1, 2 et 4 µg/ml sont négatives. Une idée pour corriger ces résultats négatifs serait de modifier les données obtenues en prenant en compte la présence naturelle de zinc dans les cellules. En effet, dans les standards, nous avions à chaque fois plus de cellules que dans les échantillons après incubation. Ceci s'explique par le fait que les cellules mises en contact avec les nanoparticules subissent un stress qui peut influer sur leur capacité à se multiplier. Il se pourrait que la quantité de zinc naturellement présent dans les cellules des standards soit supérieure à la quantité totale de zinc des échantillons de cellules mis en contact avec les nanoparticules. La présence naturelle de zinc dans les cellules est appuyée par la plus grande absorbance de la droite d'étalonnage des standards avec cellules (en bleu sur la Figure 21) par rapport à celle sans cellules (en rouge sur la Figure 21). La comparaison de ces deux courbes de calibrations permet d'avoir une idée de la quantité de zinc présent dans les cellules.

[11] Les valeurs sont calculées en tenant compte de la pureté de la poudre annoncée par le fournisseur à 99,99 %.

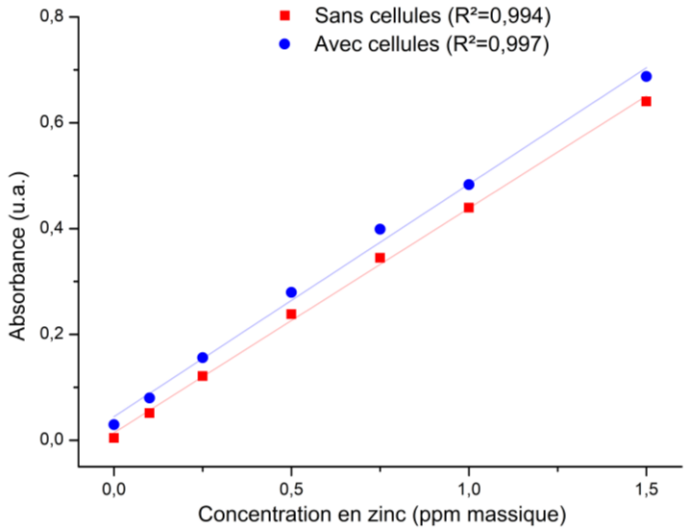


Figure 21. Droites d'étalonnage pour les standards avec et sans cellules.

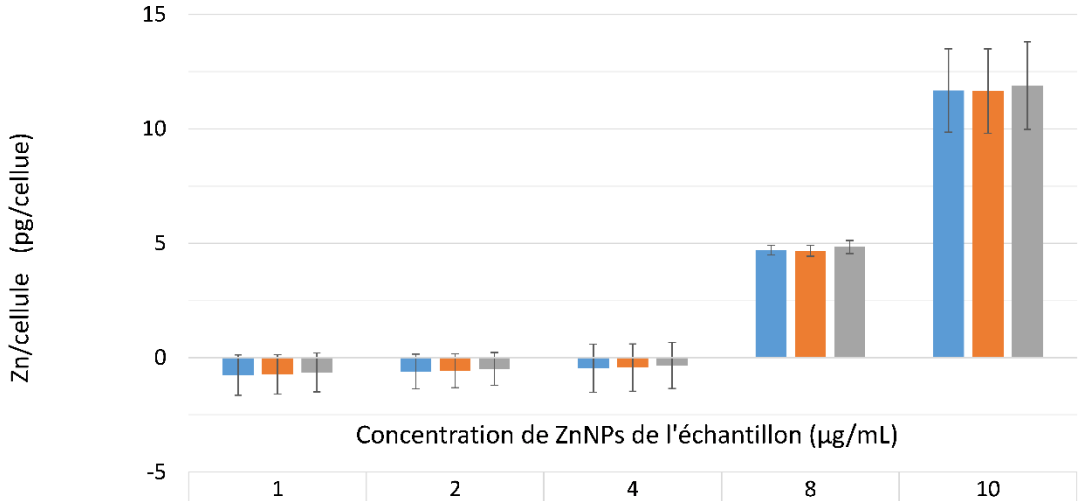
On obtient une quantité infime de $2{,}85 \pm 1{,}86 \times 10^{-2}\ pg/cellule$ ce qui équivaut à $7{,}92 \pm 5{,}17$ µg de zinc par gramme de cellules (µg/g). La masse des cellules a précédemment été mesurée et vaut $3{,}6\ ng$[12]. Cette quantité de zinc par cellule est du même ordre de grandeur que la quantité de zinc que l'on retrouve dans d'autres cellules humaines i.e. quelques µg/g [30]. Comme le montre les bâtonnets orange sur la Figure 22, la correction apportée est minime et ne permet pas d'expliquer pleinement les concentrations négatives calculées. La quantité de zinc contenue naturellement dans les cellules peut être négligée devant la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules. D'autres pistes expliquant ces résultats sont à explorer.

On remarque que certaines concentrations négatives viennent de valeurs négatives pour l'absorbance des échantillons. Ceci n'est pas physiquement possible et implique que le spectromètre modifie la valeur de l'absorbance mesurée. Les spectromètres d'absorption atomique corrigent en effet les mesures d'absorbance en fonction de l'absorbance mesurée pour un blanc. Dans nos mesures, le blanc est simplement de l'eau distillée. En théorie le blanc doit posséder une absorbance nulle car il n'y a pas de zinc dedans. Mais dans notre cas, les blancs ont présenté des absorbances de -0,006 et -0,004 pour n=1 et n=2 respectivement. Ces valeurs négatives viennent d'une erreur de calcul lorsque le spectromètre a mesuré le blanc. Lors de la création d'un fichier d'acquisition, le spectromètre va mesurer une première fois un blanc et va attribuer à l'absorbance mesurée une valeur nulle. Cependant, pour une seconde mesure d'absorbance du blanc, le spectromètre a tout de même corrigé cette valeur avec celle obtenue pour le premier blanc. Le fichier d'acquisition étant réutilisé pour deux mêmes mesures, afin de ne pas devoir enregistrer à chaque fois les paramètres de mesure, la mesure du blanc pour les échantillons avec cellules a été corrigée par celle du blanc pour les échantillons sans cellules. Les valeurs ont légèrement différé entre ces deux mesures et une absorbance négative a alors été calculée pour la seconde. Lorsque l'on supprime la correction par rapport au blanc, les absorbances négatives obtenues pour des échantillons deviennent toutes positives. Néanmoins, la suppression de cette correction ne permet pas d'obtenir des valeurs positives pour toutes les concentrations (bâtonnets gris sur la Figure 22).

[12] Ce calcul a été effectué dans le cadre du projet de recherche de première année de master.

Ces corrections mettent en évidence l'importance du contrôle de la matrice lors de la préparation des échantillons en AAS. Idéalement, il faudrait avoir le même nombre de cellules dans chacun des standards et des échantillons. On s'affranchirait ainsi de la participation du zinc des cellules en plus d'avoir une matrice strictement identique entre les échantillons.

Les valeurs négatives pour les concentrations peuvent se traduire par un passage sous la limite de détection. Car lorsque l'on regarde les barres d'erreur, on se trouve systématiquement près de 0 picogramme de zinc par cellules. Ceci est typiquement une situation que l'on retrouve pour des techniques d'analyses lorsque l'on se situe trop proche de la LOD. Les valeurs des absorbances pour les dilution x5 et x10 permettent de déterminer qu'une dilution x2 permettrait de ne pas se trouver sous la limite de détection tout en évitant de saturer le spectromètre.



	1	2	4	8	10
Zn/cellule (pg)	-0.76	-0.60	-0.46	4.70	11.67
Zn/cellule (pg) (ZnNat)	-0.73	-0.57	-0.43	4.67	11.65
Zn/cellule (pg) (ZnNat+Zero)	-0.65	-0.50	-0.34	4.84	11.89

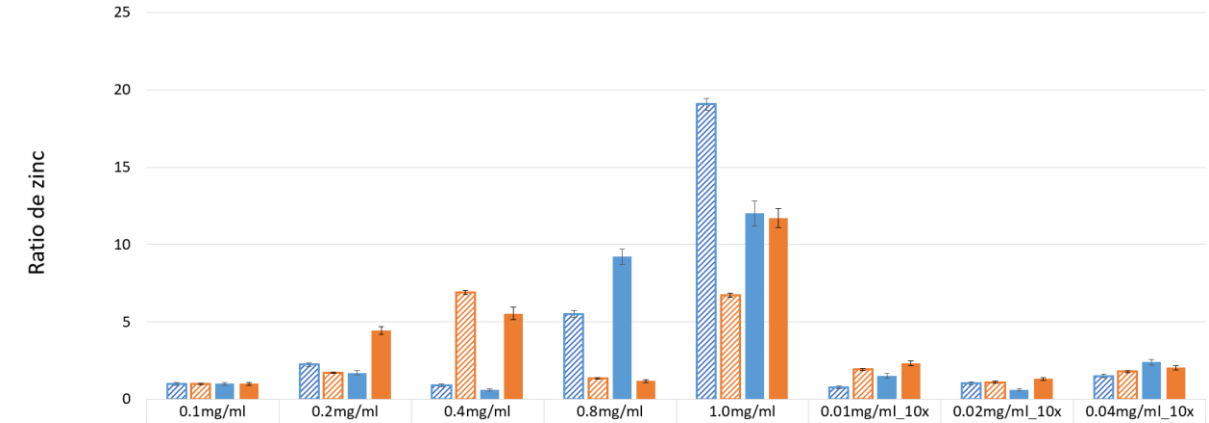
Figure 22. Correction de valeurs obtenues pour la concentration en zinc en tenant compte de la quantité estimée de zinc présente naturellement dans les cellules (en orange) et puis en supprimant la correction par rapport au blanc (en gris).

5.3 PIXE

La semi quantification des spectres des nanoparticules dans l'eau MilliQ et dans le milieu de culture a donné des résultats encourageants. En effet, on observe bien une augmentation de la quantité de zinc pour des concentrations croissantes (en hachuré sur la Figure 23). Cependant, les ordres de grandeur ne sont pas toujours respectés lorsque l'on passe d'un échantillon à un autre. Ainsi alors que nous avons un rapport théorique de 10 entre les concentrations de 1 mg/ml et 0,1 mg/ml, on mesure un ratio de 19,1 dans l'eau MilliQ (en bleu hachuré sur la Figure 23) et de 6,7 dans le milieu de culture (en orange hachuré sur la Figure 23). Ce manque de corrélation entre les valeurs expérimentales et attendues peut être corrigé grâce au signal du fer. En effet, on a remarqué que le signal du fer varie beaucoup entre les échantillons. Cette variation du signal indique que les échantillons n'étaient pas d'épaisseur infinie pour le faisceau comme nous le souhaitions. La présence variable du fer s'explique par la formation inopinée de bulles d'air lors de la préparation des échantillons et plus particulièrement lors que l'on scelle le porte-échantillon avec la feuille de Kapton. L'air possédant un pouvoir d'arrêt nettement inférieur à l'eau, il suffit d'une petite bulle d'air pour que

le faisceau incident atteigne le fond du porte-échantillon. La quantité de matière (i.e. liquide) analysée n'est par conséquent plus identique pour tous les échantillons. Il faut faire tout particulièrement attention lors de la préparation des échantillons dans le milieu de culture car celui-ci a une forte tendance à former des bulles dès qu'il est agité.

Néanmoins, il est possible d'utiliser le signal du fer pour apporter une correction aux rapports calculés entre la concentration de 0,1 mg/ml et les autres. Pour cela, on normalise les rapports calculés avec la ROI du fer sur les spectres PIXE (de $6{,}03$ à $6{,}76\ keV$). Une fois la correction par rapport au fer apportée (en trait plein sur la Figure 23), on a des rapports entres concentrations qui se rapprochent plus des valeurs attendues. Les rapports de 19,1 et 6,7 pris comme exemple dans le paragraphe précédent deviennent respectivement 12 et 11,7 après correction par rapport au fer.



	0.1mg/ml	0.2mg/ml	0.4mg/ml	0.8mg/ml	1.0mg/ml	0.01mg/ml_10x	0.02mg/ml_10x	0.04mg/ml_10x
MQ Non-corrigé	1.0	2.2	0.9	5.5	19.1	0.8	1.1	1.5
MEM Non-corrigé	1.0	1.7	6.9	1.4	6.7	1.9	1.1	1.8
MQ Corrigé	1.0	1.7	0.6	9.2	12.0	1.5	0.6	2.4
MEM Corrigé	1.0	4.4	5.5	1.2	11.7	2.3	1.3	2.1

Figure 23. Semi-quantification des spectres PIXE des nanoparticules dans l'eau MilliQ (en bleu) et dans le milieu de culture (en orange). La correction apportée se fait en ajustant le ratio par rapport à la quantité de fer détectée. Les barres d'erreur tiennent compte de l'erreur d'intégration des pics de zinc et de fer.

On notera cependant que l'échantillon à 0,4 mg/ml dans l'eau MilliQ ainsi que l'échantillon à 0,8 mg/ml dans le milieu de culture possèdent une trop petite quantité de zinc par rapport aux autres concentrations. Ceci laisse penser à une erreur de manipulation lors de la préparation des dilutions des échantillons. De plus, on ne tiendra pas compte de la correction par rapport au fer pour l'échantillon à 0,2 mg/ml dans du milieu de culture. Cet échantillon présentait une grosse bulle mais nous avons observé qu'elle restait en permanence au-dessus de la surface analysée. Cette bulle conduit néanmoins à une exposition directe du substrat en acier au faisceau diffus, parfois appelé « voile » du faisceau incident (Figure 24). L'intensité du voile du faisceau est très faible, mais la bulle étant en vue du détecteur, aucun RX du fer n'est absorbé par l'échantillon avant d'être détecté, donnant ainsi la fausse impression d'avoir beaucoup de fer.

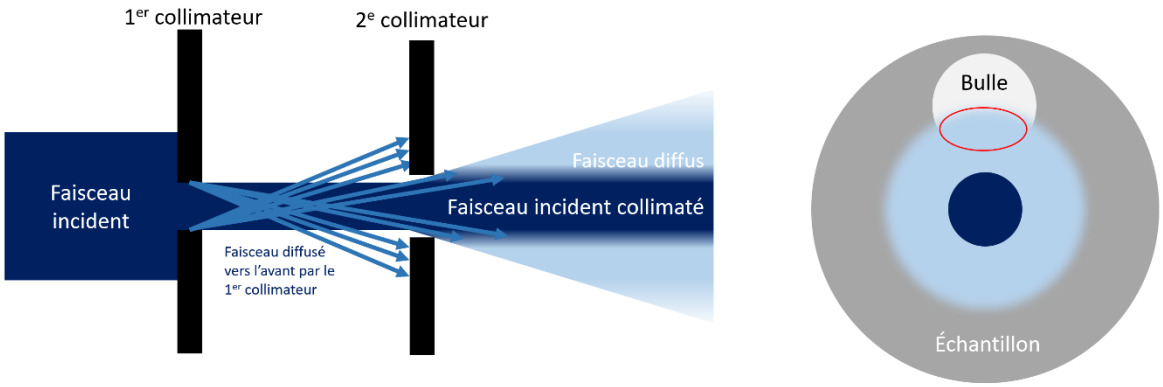


Figure 24. Origine du faisceau diffus et projection de ce faisceau sur l'échantillon à 0,2 mg/ml dans le milieu de culture, présentant une bulle d'air importante. Le faisceau diffus passe au travers de la bulle dans la zone entourée en rouge.

Idéalement, ces mesures en PIXE seraient à répéter encore 2x pour obtenir une statistique ainsi que des barres d'erreur permettant une discussion plus approfondie de la méthode employée pour la préparation des échantillons.

La concentration d'un facteur 10 par évaporation des échantillons de 0,01 ; 0,02 et 0,04 mg/ml est encourageante dans le sens où les ordres de grandeur de la semi-quantification de ces échantillons sont les mêmes que ceux des échantillons à 0,1 ; 0,2 et 0,4 mg/ml. Il y a cependant plusieurs améliorations à apporter au procédé. En effet, à la fin de l'évaporation, on observe un dépôt de matière sur la paroi de l'Eppendorf. Ceci s'explique par la non uniformité de l'évaporation de l'eau dans les Eppendorfs. Lorsque l'on pipette l'échantillon dans le porte-échantillon liquide, il n'est pas toujours possible de récupérer la totalité du dépôt formé, en particulier pour les échantillons dans le milieu de culture où le dépôt est épais et très visqueux. Il est fort probable qu'une partie des nanoparticules finisse dans ce dépôt. Une autre idée de méthode de concentration à tester serait d'utiliser le SpeedVac pour déshydrater partiellement l'échantillon et limiter le dépôt de matière grâce à la centrifugation.

5.4 Comparaison PIXE-AAS

Avant d'obtenir un graphe montrant l'équivalence en les deux techniques, on doit prouver leur corrélation. Ceci se fait en traçant un premier graphe avec en abscisse la semi quantification du zinc en PIXE et en ordonnée la quantification AAS. Ceci a été effectué pour les échantillons PIXE dans de l'eau MilliQ et dans du milieu.

On obtient après régression linéaire une droite de corrélation avec les coefficients de corrélation $R^2 = 0,999$ pour l'eau distillée et $R^2 = 0,983$ pour le milieu de culture (Figure 25). Les paramètres des droites de régression sont donnés dans le Tableau 6. Ces coefficients nous permettent de dire que les deux techniques donnent bien des résultats corrélés. Cependant, on remarque une meilleure corrélation pour les échantillons dans de l'eau MilliQ.

	Pente	Intersection avec les ordonnées	R^2
Eau distillée	$0{,}066 \pm 0{,}001$	$-0{,}004 \pm 0{,}008$	$0{,}999$
Milieu de culture	$0{,}067 \pm 0{,}005$	$-0{,}012 \pm 0{,}027$	$0{,}983$

Tableau 6. Paramètres des droites de régression pour la corrélation PIXE-AAS

Pour les échantillons PIXE dans de l'eau distillée, on a rejeté le ratio obtenu pour la concentration en zinc de l'échantillon à 0,4 mg/ml pour la même raison que celle développée au point précédent. De même pour le ratio de zinc obtenu pour l'échantillon de 0,8 mg/ml dans le milieu de culture.

Il serait avisé d'étoffer ces graphes en ajoutant d'une part d'autres concentrations pour avoir plus de points et donc une droite de corrélation donnant une meilleure information et d'autre part, d'obtenir des barres d'erreurs sur les mesures PIXE en effectuant plusieurs séries de mesures sur les échantillons.

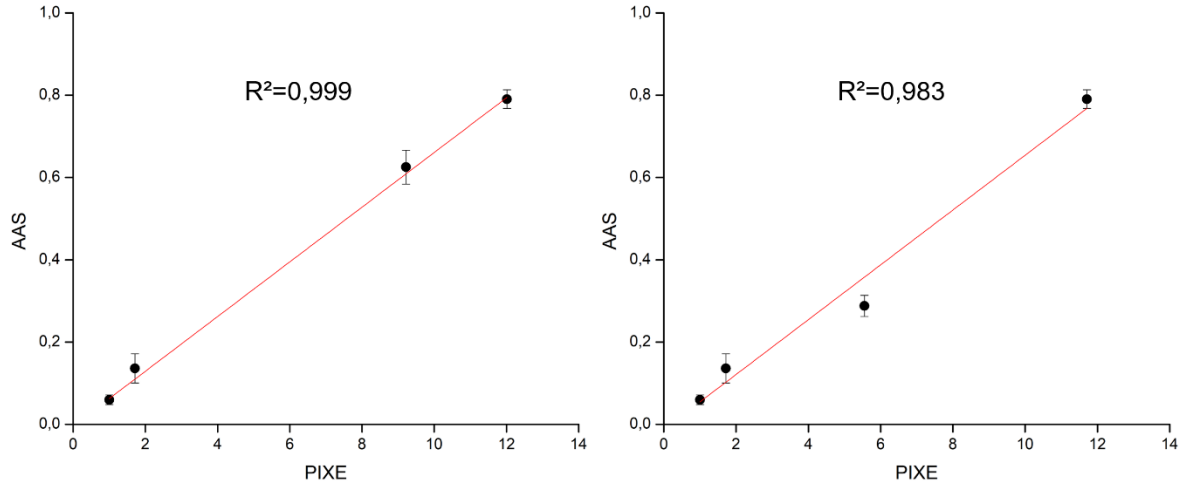


Figure 25. Graphe de corrélation entre l'AAS et la PIXE. À gauche pour les nanoparticules dans de l'eau MilliQ et à droite pour les nanoparticules dans le milieu de culture.

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de ce mémoire sont des résultats préliminaires qui vont permettre de poursuivre ces recherches avec une base solide quant à la manière d'aborder celles-ci. La comparaison entre les techniques est encouragée par un graphe de corrélation qui donne une droite de corrélation avec un R^2 supérieur à 0,99. De nombreuses pistes sont à explorer pour la suite de ce projet.

Dans un premier temps, une caractérisation complète des nanoparticules avec revêtement doit être faite. Les résultats de cette caractérisation devront être mis en parallèle avec la caractérisation des nanoparticules de ZnO sans revêtement qui ont été utilisées durant la majorité de ce mémoire. Ceci dans le but de s'assurer de l'effet voulu du revêtement i.e. une meilleure stabilité en solution colloïdale. Dans le cas où le revêtement ne changerait pas de manière significative le comportement des nanoparticules en solution et leur internalisation par les cellules, de nouvelles idées de types de nanoparticules à employer devraient être recherchées.

Dans un second temps, il faudrait réitérer les mesures en AAS de la quantité de nanoparticules internalisée par les cellules en changeant les facteurs de dilution de telle manière à ne pas passer sous la limite de détection pour les faibles concentrations.

Concernant la PIXE, il faudrait commencer par réitérer les mesures sur les échantillons sans cellules pour obtenir des barres d'erreur et déterminer si les erreurs commises lors de la préparation des échantillons de 0,4 mg/ml dans l'eau MilliQ et de 0,8 mg/ml dans le milieu de culture sont des erreurs uniques ou systématiques pour ces échantillons. Il faut de plus prendre un maximum de précautions lors de la préparation de ces échantillons afin d'éviter la formation de bulles d'air sous la feuille de Kapton. Pour cela, on pourrait par exemple optimiser la quantité de liquide à déposer dans le porte-échantillon pour minimiser la formation de bulles.

Ensuite, il faudrait tester les différents types de protocoles pour la préparation des échantillons avec cellules. L'idée principale est de trouver un moyen de concentrer l'échantillon en l'élément que nous souhaitons quantifier. Pour cela, la piste principale suivie est la déshydratation complète des cellules.

Le premier procédé imaginé est le séchage des cellules au four. Afin d'étudier la structure en profondeur des échantillons séchés, nous avons eu l'idée de concevoir une porte-échantillon similaire à celui utilisé mais pouvant être séparé en deux en son centre afin d'avoir accès au profil de l'échantillon. Une observation en microscopie électronique donnerait une information sur sa compacité. Cette dernière doit être suffisante pour que le faisceau s'arrête dans l'échantillon sans le traverser. C'est une condition nécessaire pour une quantification absolue de l'échantillon en PIXE. Si besoin, le laboratoire dispose d'une presse hydraulique qu'on pourrait utiliser afin de compacter d'avantage l'échantillon à condition de ne pas perdre de matière. Ce procédé est le plus simple des deux à mettre en place. C'est pour cela que nous pensons qu'il doit être testé en priorité.

Le second procédé va demander de continuer la conception du porte-échantillon compatible avec la centrifugeuse sous vide i.e. le SpeedVac. Nous possédons actuellement une pièce permettant de placer un Falcon dans le SpeedVac. Cependant, il reste encore du travail pour le développement d'un porte-échantillon qui soit compatible avec le SpeedVac et le support d'échantillons dans la chambre d'analyse PIXE. Par exemple, je souhaite trouver un moyen de faire tenir le porte-échantillon compatible avec la chambre PIXE de manière horizontale afin d'optimiser la compacité grâce à la centrifugation.

Une troisième technique serait non plus de viser un échantillon complètement déshydraté mais plutôt d'obtenir une solution visqueuse composée presque uniquement de cellules hydratées. La solution serait ensuite placée dans le porte-échantillon liquide utilisé durant ce mémoire (Figure 6). Cependant, la concentration en l'élément que nous souhaitons quantifier ne serait peut-être pas suffisante que pour être détectée.

Idéalement, les mesures devraient être effectuées avec divers éléments afin de consolider la comparaison entre les deux techniques. Les nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 bien que rejetées en début de manuscrit, préférant les nanoparticules de ZnO plus adaptées pour les analyses préliminaires, sont deux candidates tout de même exploitables pour la suite.

Par ailleurs, une fois la comparaison PIXE-AAS établie pour la PIXE en faisceau large (*broadbeam*), la μ-PIXE apporterait des informations supplémentaires quant à l'internalisation des nanoparticules par les cellules. Contrairement à la PIXE en broadbeam qui permet d'obtenir la quantité moyenne de nanoparticules par cellule, la μ-PIXE permet de cartographier une cellule pour voir où se trouvent les nanoparticules et en quelle quantité dans une seule cellule.

REFERENCES

[1] D. Schaming et H. Remita, «Nanotechnology: from the ancient time to nowadays,» *Foundations of Chemistry,* vol. 17, n° %13, pp. 187-205, 28 7 2015.

[2] P. C.-R. G. Chuto, «Les nanoparticules,» *Médecine Nucléaire,* vol. 34, n° %116, pp. 370-376, 2010.

[3] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne et M. K. Danquah, «Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations,» *Beilstein J. Nanotechnol,* vol. 9, pp. 1050-1074, 2018.

[4] M. Loos, «Chapter 1 - Nanoscience and Nanotechnology,» chez *Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology*, Elsevier Inc., 2015, pp. 1-36.

[5] Amalie Skovmøller, Cecilie Brøns et Maria Louise Sargent, «Egyptian blue: modern myths, ancient realities,» *Journal of Roman Archaeology,* vol. 29, pp. 371-387, 2016.

[6] Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax et Catherine Higgitt, «The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology,» *Gold Bulletin,* vol. 40, pp. 270-277, 2007.

[7] V. Aruoja, H.-C. Dubourguier, K. Kasemets et A. Kahru, «Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO2 to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata,» *Science of The Total Environment,* vol. 407, n° %14, pp. 1461-1468, 1 2 2009.

[8] TDMA - Titanium Dioxide Manufacturers Association, «How titanium dioxide protects your outdoor plastics,» TDMA, [En ligne]. Available: https://tdma.info/how-titanium-dioxide-protects-your-outdoor-plastics/. [Accès le 26 mai 2020].

[9] H. Bahadar, F. Maqbool, K. Niaz et M. Abdollahi, «Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models.,» *Iranian biomedical journal,* vol. 20, n° %11, pp. 1-11, 2016.

[10] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, «Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties,» London, 2004.

[11] PATROLS, «PATROLS - Physiologically Anchored Tools for Realistic nanOmateriaL hazard aSsessment.,» [En ligne]. Available: https://www.patrols-h2020.eu. [Accès le 12 mai 2020].

[12] S. Penninckx, *Contribution to the improvement of radiotherapy treatments driven by nanotechnology,* 2019.

[13] T. B. Johansson, R. Akselsson et S. Johansson, «X-ray analysis: Elemental trace analysis at the 10−12 g level,» *Nuclear Instruments and Methods,* vol. 84, pp. 141-143, 1970.

[14] Bradley R. Johnson, Brian J. Riley, Jarrod V. Crum et S. K. Sundaram, «Annual Report: Amorphous Semiconductors for Gamma Radiation Detection (ASGRAD),» 2007.

[15] S. A. Johansson et Johansson, Thomas B., «Analytical application of particle induced X-ray emission,» *Nuclear Instruments and Methods,* vol. 137, n° %13, pp. 473 - 516, 1976.

[16] Blaauw, M., Campbell, J. L., Fazini, S., Jakši, M., Orlic, I. et Van Espen, P., «The 2000 IAEA intercomparison of PIXE spectrum analysis software,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,* vol. 189, n° %11-4, pp. 113-122, 2002.

[17] Johansson, Sven A. E. et John Lawrence Campbell, Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE), 1988.

[18] Jeynes, J. Charles G., Jeynes, Christopher, Merchant, Michael J. et Kirkby, Karen J., «Measuring and modelling cell-to-cell variation in uptake of gold nanoparticles,» *Analyst,* vol. 138, n° %123, pp. 7070 - 7074, 2013.

[19] P. A. Mandò, «Advantages and limitations of external beams in applications to arts & archeology, geology and environmental problems,» *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B,* vol. 85, n° %11 - 4, pp. 815 - 823, 1994.

[20] Fernández, Beatriz, Lobo, Lara et Pereiro, Rosario, «Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities,» *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering,* pp. 137-143, 2018.

[21] Hill, Steve J. et Fisher, Andy S., «Atomic Absorption, Methods and Instrumentation,» chez *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2017, pp. 37-43.

[22] Nottrodt, K.H., Georgii, H.W. et Groeneveld, K.O., «Absolute element concentrations in aerosols analysed by atomic-absorption-spectroscopy and by proton-induced X-ray emission, a comparison,» *Journal of Aerosol Science,* vol. 9, n° %12, pp. 169 - 173, 1978.

[23] Galuszka, Janusz, Jarczyk, Lucjan, Rokita, Eugeniusz, Strzalkowski, Adam et Sych, Marek, «The influence of target preparation and mode of irradiation on PIXE analysis of biological samples,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,* vol. 3, n° %11-3, pp. 141 - 146, 1984.

[24] Tanaka, M., Matsugi, E., Miyasaki, K., Yamagata, T., Inoue, M., Ogata, H. et Shimoura, S., «PIXE measurement applied to trace elemental analysis of human tissues,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,* vol. 22, n° %11 - 3, pp. 152 - 155, 1987.

[25] Menzel, N., Schramel, P. et Wittmaack, K., «Elemental composition of aerosol particulate matter collected on membrane filters: A comparison of results by PIXE and ICP-AES,» *Nuclear*

Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, vol. 189, n° %11 - 4, pp. 94 - 99, 2002.

[26] Zhang, Sulin, Li, Ju, Lykotrafitis, George, Bao, Gang et Suresh, Subra, «Size-dependent endocytosis of nanoparticles,» *Advanced Materials,* vol. 21, n° %14, pp. 419-424, 2009.

[27] Dahle, Jessica T. et Arai, Yuji, «Environmental geochemistry of cerium: Applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles,» *International Journal of Environmental Research and Public Health,* vol. 12, n° %12, pp. 1253-1278, 2015.

[28] Odzak, Niksa, Kistler, David, Behra, Renata et Sigg, Laura, «Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media,» *Environmental Pollution,* vol. 191, pp. 132 - 138, 2014.

[29] S. L. Chia et D. T. Leong, «Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating,» *Heliyon,* vol. 2, n° %110, p. e00177, 1 10 2016.

[30] B. Zödl, M. Zeiner, M. Sargazi, N. B. Roberts, W. Marktl, I. Steffan et C. Ekmekcioglu, «Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells,» *Journal of Inorganic Biochemistry,* vol. 97, n° %14, pp. 324-330, 2003.

[31] Kao, Yi-Yun, Chen, Yi-Chun, Cheng, Tsun-Jen, Chiung, Yin-Mei et Liu, Pei-Shan, «Zinc Oxide Nanoparticles Interfere With Zinc Ion Homeostasis to Cause Cytotoxicity,» *TOXICOLOGICAL SCIENCES,* vol. 125, n° %12, pp. 462-472, 2012.

[32] National Center for Biotechnology Information, «PubChem Database. 3-Aminopropyltriethoxysilane, CID=13521».

[33] E. Roduner, Nanoscopic Materials : Size-dependent Phenomena, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006.

[34] Shahed Behzadi, Vahid Serpooshan, Wei Tao, Majd A. Hamaly, Mahmoud Y. Alkawareek, Erik C. Dreaden, Dennis Brown, Alaaldin M. Alkilany, Omid C. Farokhzad et Morteza Mahmoudi, «Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell,» *Chem Soc Rev,* vol. 46, n° %114, pp. 4218-4244, 2017.

[35] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolai, F. Rossi, P. Gibson et C. Klein, *Requirements on Measurements for the Implementation of the European Commission Definition ofthe Term 'Nanomaterial',* Bruxelles: Publications Office of the European Union, 2012.

[36] E. Verleysen, T. Wagner, H.-G. Lipinski, R. Kägi, R. Koeber, A. Boix-Sanfeliu, P.-J. De Temmerman et J. Mast, «Evaluation of a TEM based Approach for Size Measurement of Particulate (Nano)materials,» *Materials,* vol. 12, n° %114, p. 2274, 15 7 2019.

[37] A. Braun, O. Couteau, K. Franks, V. Kestens, G. Roebben, A. Lamberty et T. Linsinger, «Validation of dynamic light scattering and centrifugal liquid sedimentation methods for

nanoparticle characterisation,» *Advanced Powder Technology,* vol. 22, n° %16, pp. 766-770, 1 11 2011.

[38] Sze, Alice, Erickson, David, Ren, Liqing et Li, Dongqing, «Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow,» *Journal of Colloid and Interface Science,* vol. 261, n° %12, pp. 402 - 410, 15 mai 2003.

[39] Thermo Scientific XPS, «XPS Elements Table,» [En ligne]. Available: https://xpssimplified.com/periodictable.php. [Accès le 10 mai 2020].

[40] Marc Steinmetz et Stephen Fitzpatrick, *Particle Size Analysis By Differential Sedimentation : 50 microns to 5 nm,* 2003.

[41] M. L. Rami, *Etude de la stabilité de dispersions colloïdales de zircone yttriée pour la fabrication de céramiques à grains fins,* Toulouse, 2010.

[42] Hitchman, Adam, Sambrook Smith, Gregory H., Ju-Nam, Yon, Sterling, Mark et Lead, Jamie R., «The effect of environmentally relevant conditions on PVP stabilised gold nanoparticles,» *Chemosphere,* vol. 90, n° %12, pp. 410 - 416, 2013.

[43] Ma, Shu Rui, Shi, Li Yi, Feng, Xin, Yu, Wei Jun et Lu, Bo, «Graft modification of ZnO nanoparticles with silane coupling agent KH570 in mixed solvent,» *Journal of Shanghai University,* vol. 12, n° %13, pp. 278-282, 2008.

[44] A. Ivask, T. Titma, M. Visnapuu, H. Vija, A. Kakinen, M. Sihtmae, S. Pokhrel, L. Madler, M. Heinlaan, V. Kisand, R. Shimmo et A. Kahru, «Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In V.itro,» *Current Topics in Medicinal Chemistry,* vol. 15, n° %118, pp. 1914-1929, 16 6 2015.

[45] M. Lundqvist, Stigler, Johannes, Elia, Giuliano, Lynch, Iseult, Cedervall, Tommy et Dawson, Kenneth A., «Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol. 105, n° %138, pp. 14265-14270, 2008.

[46] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh et V. Puntes, «Time evolution of the nanoparticle protein corona,» *ACS Nano,* vol. 4, n° %17, pp. 3623-3632, 2010.

[47] Y. J. Kim, H. C. Park et B. K. Kim, «Triple shape-memory effect by silanized polyurethane/silane-functionalized graphene oxide nanocomposites bilayer,» *High Performance Polymers,* vol. 27, n° %17, pp. 886-897, 1 11 2015.

[48] P. M. Dietrich, S. Glamsch, C. Ehlert, A. Lippitz, N. Kulak et W. E. Unger, «Synchrotron-radiation XPS analysis of ultra-thin silane films: Specifying the organic silicon,» *Applied Surface Science,* vol. 363, pp. 406-411, 15 2 2016.

[49] ISO 8655-2:2002, *Appareils volumétriques à piston - Partie 2 : pipettes à piston,* 2002.

[50] K. Ishii, A. Sugimoto, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, C. Akama, T. Amartivan, H. Endoh, Y. Oishi, H. Yuki, S. Sugihara, M. Satoh, T. Kamiya, T. Sakai, K. Arakawa, M. Saidoh et S. Oikawa, «Elemental analysis of cellular samples by in-air micro-PIXE,» *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,* vol. 181, n° %11-4, pp. 448-453, 1 7 2001.

[51] D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. v. Prooijen, C. Allen, R. G. Bristow, R. P. Hill et D. A. Jaffray, «Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy,» *Radiation Research,* vol. 173, n° %16, pp. 719 - 728, 2010.

[52] K. Murugan, Y. Choonara, P. Kumar, D. Bijukumar, L. d. Toit et V. Pillay, «Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures,» *International Journal of Nanomedicine Dovepress,* vol. 10, pp. 2195 - 2206, 2015.

[53] B.L. Henke, E.M. Gullikson et J.C. Davis, «X-ray interactions: photoabsorption, scattering, transmission, and reflection at E=50-30000 eV, Z=1-92,» *Atomic Data and Nuclear Data Tables,* vol. 54, n° %12, pp. 181-342, 1993.

[54] Zeiner, Michaela, Zödl, Bettina, Steffan, Ilse, Marktl, Wolfgang et Ekmekcioglu, Cem, «Determination of Iron in Caco-2 cells by ET-AAS,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 382, n° %11, pp. 239-242, 2005.