

## Mise au point du dosage de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans les Dreissènes

Charlotte Neyrolle<sup>1</sup>, Mickael Tharaud<sup>1</sup>, Marc Bonnard<sup>2</sup>, Alexandre Gélabert<sup>1</sup>,  
Marc F. Benedetti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, F-75005 Paris, France

<sup>2</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH, Unité SEBIO.

\* benedetti@ipgp.fr

### Résumé

*Les recherches de ces dernières décennies ont montré que le comportement et la toxicité des nanoparticules étaient encore à approfondir. Nous cherchons ici une nouvelle stratégie afin de quantifier et caractériser les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans la Seine. En effet, les mollusques bivalves ont été le sujet d'étude de nombreuses recherches concluant sur leur capacité à stocker des nanoparticules au sein de leur organisme. Nous avons donc choisi de tester la technique sp-ICP-MS afin de déterminer le ratio de nanoparticules dans les eaux de Seine. Le résultat des analyses des mollusques montre une augmentation de la concentration en Ti dans les parties molles en aval de Paris. Le protocole expérimental permettant de solubiliser les mollusques sans dégrader les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> grâce à l'intervention d'enzymes n'a, à ce jour, pas pu être mis à l'épreuve par l'analyse sp-ICP-MS.*

### Points clefs

- ✓ *Les mollusques sont des capteurs passifs de nanoparticules*
- ✓ *Les mollusques accumulent du Ti dans leurs parties molles en aval de Paris*
- ✓ *L'analyse ICP-MS permettra de déterminer le flux de nanoparticules accumulées*

### Abstract

Research in recent decades has shown that the behavior and toxicity of nanoparticles still needs further investigation. In this report, we are looking for a new strategy to quantify and characterize TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the Seine river. Indeed, bivalve mollusks have been the subject of much research that concludes that they are capable of storing nanoparticles within their bodies. We therefore chose to test the sp-ICP-MS technique to determine the ratio of nanoparticles in Seine waters. The results of the mollusks' analyses show an increase in the concentration of Ti in their soft parts, downstream of Paris. The experimental protocol allowing the solubilization of mollusks without degrading the TiO<sub>2</sub> nanoparticles through the intervention of enzymes could not, to date, be tested by sp-ICP-MS analysis.

### Key points

- ✓ Shellfish are passive sensors of nanoparticles
- ✓ The molluscs accumulate Ti in their soft parts downstream of Paris
- ✓ ICP-MS analysis will determine the flow of accumulated nanoparticles

## Introduction

L'étude et le développement des nanoparticules (NPs) constituent un domaine important des sciences actuelles, les nanoparticules étant largement utilisées dans les produits cosmétiques jusque dans les filières automobiles et pharmaceutiques. Depuis la loi Grenelle 2 votée en 2013, il est important pour les importateurs de matériaux de déclarer la présence de nanoparticules dans leurs produits commercialisés. Le comportement des nanoparticules au contact des interfaces biologiques ou environnementales est encore méconnu à ce jour. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pour mieux comprendre les flux et processus des nanoparticules dans les milieux aquatiques.

D'après de nombreuses études, il a été montré que différents crustacés, tels que la *Daphnia magna*, étaient capables d'ingérer des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> allant jusqu'à la dizaine de µm de diamètre (Lopes Rocha, 2015). De plus, des tests d'accumulation de nanoparticules ont été réalisés sur des cultures de *Ruditapes philipinarum* (Ilaria et al., 2018) qui ont révélé une bioaccumulation de nanoparticules dans leurs branchies ainsi que dans leurs glandes digestives indiquant que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent être accumulées par les moules. Elles trouvent donc leur utilité dans le traçage des nanoparticules dans les eaux de la Seine.

Pour avoir une mesure régulière du flux de nanoparticules dans les eaux en amont et aval de Paris, nous prélevons régulièrement des quantités d'eau variables à certains points stratégiques en Île-de-France. Cependant cette approche engendre de grandes approximations quant aux quantités et flux de particules prélevées. Ces approximations peuvent convenir pour des petits cours d'eaux, mais la technique de prélèvement doit être plus élaborée pour des fleuves de l'envergure de la Seine. C'est pourquoi des études ont développé de nouvelles techniques, ayant recours à des capteurs passifs d'éléments et de nanoparticules, dans notre cas l'espèce *Dreissena Polymorpha* dite moule zébrée (Figure 1), afin de s'affranchir des approximations expérimentales et faciliter les prélèvements (Wenhong et al., 2018). En effet, les bivalves semblent être la clef d'une filtration des nanoparticules. C'est sur la base de ces travaux que nous avons élaboré notre stratégie de prélèvement pour répondre aux questions de recherche : tester l'utilisation des *Dreissènes* sur ces mêmes sites comme outils intégrateur du flux de NPs. Dans le cadre de cette étude, TiO<sub>2</sub> et les NPs de fer seront prioritairement ciblés.

Nos travaux ont cherché à établir un protocole rigoureux de solubilisation des moules sans dégradation des nanoparticules analysées. Une équipe de scientifiques européens ayant certifié la quantité de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dans les eaux de surface (Wang et al., 2021), nous avons décidé d'utiliser le dioxyde de titane en tant que témoin du protocole, connaissant déjà son abondance dans la Seine. Les points de prélèvements se situent à Marnay-sur-Seine, qui est une ville située très en amont de Paris, Bougival, qui se trouve en aval de la capitale, ainsi que Triel-sur-Seine, située encore plus en aval (voir figure 2). Il a été montré qu'à Marnay-sur-Seine les eaux contenaient une quantité très réduite de TiO<sub>2</sub> ( $0,47 \pm 0,07 \cdot 10^6$  particules.mL<sup>-1</sup>, (Wang et al., 2021).



Figure 1. *Dreissena Polymorpha* et sa coquille.

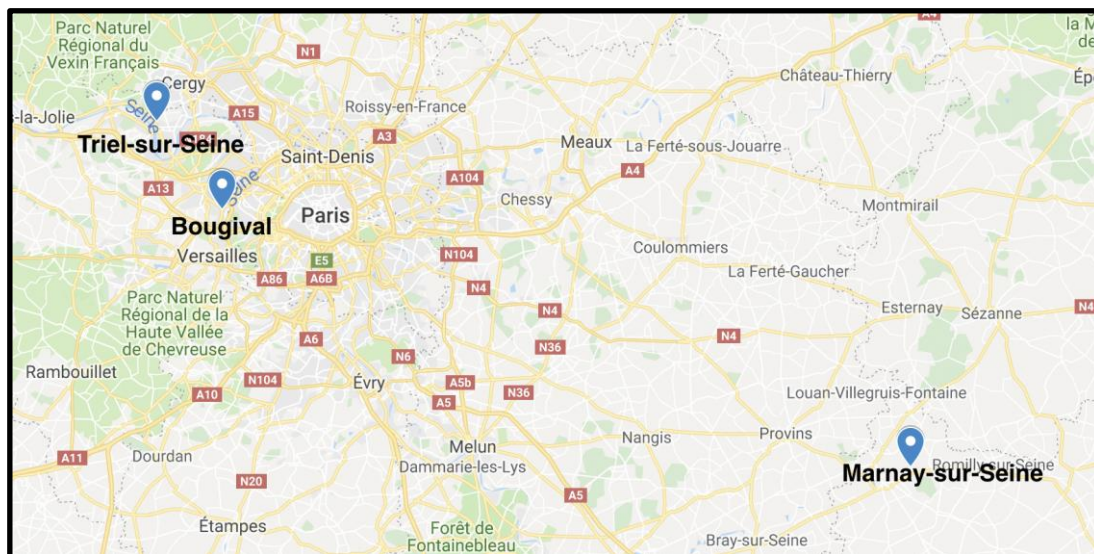


Figure 2. Carte des trois différents sites de dispersion des mollusques

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Échantillons

Les échantillons étudiés sont les parties molles de moules de l'espèce *Dreissena Polymorpha* cultivées par l'équipe UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH, SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques). Université de Reims Champagne-Ardenne. Elles ont été placées à Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine au début du mois de septembre 2018.

Les mollusques ont été immergés pendant deux temps d'exposition différents : 3 semaines et 8 semaines (T3, T8). Un échantillon de moule n'ayant pas été immergé a servi de témoin. Des échantillons d'eau de Seine ont été prélevés afin d'évaluer la concentration en nanoparticules des lieux d'immersions. Les protocoles préliminaires ont été effectués sur des moules du Pacifique surgelées, achetées dans un supermarché de proximité dans Paris, conditionnées dans un sachet en plastique, ainsi qu'un standard de tissu de moules (Sigma Aldrich). Toutes les moules ont été conservées au congélateur à -20°C, puis lyophilisées pendant 24 h minimum à -56°C à une pression de 0,04 mbar et enfin finement broyées afin de faciliter les digestions chimiques.

### 1.2. Protocole de l'attaque totale

Dans un tube Falcon en plastique de 50 mL, 100 mg de moules du Pacifique ont été attaqués avec 2 mL d'eau oxygénée 33%, 2 mL d'HNO<sub>3</sub> 16 N, puis 2 mL d'eau régale (1/5 d'HNO<sub>3</sub>, 4/5 d'HCl) à 90°C sous hotte. Les attaques ont été faites sur 24 h et les échantillons ont été évaporés durant la nuit. Les échantillons ont été mis en solution dans 10 mL d'eau milliQ acidifiée à 1%.

Nous avons prélevé 10 mg de *Dreissena polymorpha* qui ont été immergées dans l'eau de Seine, car une masse très réduite d'échantillons a été mise à notre disposition. Nous avons donc adapté la dilution à 5 ml d'eau milliQ acidifiée à 1%.

### 1.3. Protocole de l'attaque enzymatique

La problématique de l'analyse nanoparticulaire des échantillons a été de ne pas altérer les nanoparticules tout en mettant en solution les échantillons efficacement. Il a donc fallu faire varier les paramètres physiques dans un intervalle très restreint afin de rester dans des conditions douces (pH neutre, température ambiante, pression atmosphérique). L'attaque enzymatique s'est révélée être une excellente solution vis à vis des contraintes exprimées. En effet, les enzymes étant des catalyseurs biologiques très

fragiles, elles requièrent des conditions douces et physiologiques afin de ne pas dégrader leur structure. Les enzymes sont des catalyseurs qui permettent d'accélérer les réactions attendues.

Les enzymes utilisées sont des enzymes s'attaquant principalement aux lipides, permettant donc de digérer rapidement les corps gras présents dans le mollusque. Une solution tampon de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M/ NaOH 0,2 M a été préparée, le pH ayant été ajusté à 7,4 par incrémentation d'acide chlorhydrique 1 M. Deux enzymes ont ensuite été ajoutées : pancréatine porcine et lipase de *Candida Rugosa* (Sigma Aldrich) à 3 g.L<sup>-1</sup> chacune. Pour effectuer l'attaque, 1 g de mollusque du Pacifique a été prélevé dans un tube en plastique Falcon de 50 mL et attaqué dans 7,5 mL de solution tampon. Les tubes ont été passés aux ultrasons (60% d'amplitude pendant 10 min) en solution (Taboada-Lopez et al., 2018). Des conditions de solution sans enzyme, avec et sans exposition aux ultrasons, à un chauffage à 40°C ont permis de déterminer à l'œil nu que le protocole mettant en jeu les ultrasons et les enzymes était le plus performant.

Etant donné les faibles quantités de mollusques exposés dans la Seine à analyser, les volumes et masses ont été adaptés (50 mg de mollusque pour 2 mL de tampon). Les échantillons ont été dilués 50 fois dans une solution à 1% de glycérol avant analyse en qualité de lubrifiant afin de ne pas abimer les compartiments d'introduction de l'HR-ICP-MS. Il est nécessaire de procéder aux analyses du <sup>48</sup>Ti en Haute Résolution (Tharaud et al., 2017).

Pour les analyses des tests préliminaires, les échantillons de moule du Pacifique attaqués (dans des tubes Falcon de 14 mL) ont été soniqués pendant 10 minutes avec une amplitude de 60% et centrifugés pendant 25 minutes à 2500 rpm à 25°C. 1.5 mL de surnageant ont ensuite été prélevés.

## 2. Résultats et discussions

### 2.1. Attaque totale

Les attaques acides ont été appliquées à plusieurs populations d'échantillons. Ces échantillons sont encore en attente d'analyse. Ils permettront de déterminer la quantité totale de titane à l'intérieur des moules du Pacifique, ce qui nous permettra de calculer un ratio de nanoparticules au sein de l'organisme après analyse sp-ICP-MS. Etant donné la faible masse de moules à analyser, les analyses sur les mollusques exposés n'ont pas pu être répliqués autant de fois que nous l'aurions voulu.

La Figure 3 montre une augmentation de la concentration en Ti dissous lorsque l'on augmente le temps d'immersion des mollusques. Ceci atteste donc d'une capacité de filtrage des éléments. Cependant, sur le trajet du fleuve, on remarque une nette augmentation de la concentration en titane à Bougival tandis que les résultats à Triel ne montrent pas de différence notable. Il est possible que le lieu d'immersion de Bougival soit un bras mort très sensible au temps car très peu d'eau y circule, et les éléments ont donc tendance à s'y accumuler rapidement.

Une analyse multi-élémentaire a été effectuée afin de vérifier si les organismes étaient sélectifs. Nous avons donc comparé quelques éléments du tableau périodique dont nous connaissions déjà les concentrations, sachant que le lanthane est habituellement deux fois plus concentré que le cérium dans les eaux (en France d'après les valeurs du fond géochimique  $\approx 1.96$ , Reimann et al., 2018). Une droite de corrélation a été tracée afin de déterminer si le facteur entre les deux lanthanides a été modifié. On remarque que les mesures suivent le ratio habituellement observé, attestant que nous avons bien une eau caractéristique du bassin parisien.

La deuxième analyse des moules de Triel, par HR-ICP-MS cette fois-ci, a permis de rendre compte, une fois de plus, de la capacité d'accumulation des moules au cours du temps, le pourcentage d'erreur relatif étant excellent sur ces mesures ( $\approx 1\%$ ), et l'augmentation de la concentration étant stabilisée en 3 semaines.

Les analyses des moules du Pacifique par HR-ICP-MS montrent une forte concentration en titane dans les moules non dopées. Ces concentrations élevées sont probablement dues à une contamination dans le lieu de culture ou par le cheminement des moules du lieu de pêche au point de vente. Cependant, les nanoparticules ont été injectées en trop faible quantité par rapport au seuil de détection des instruments et n'ont donc pas pu être observées après analyse.

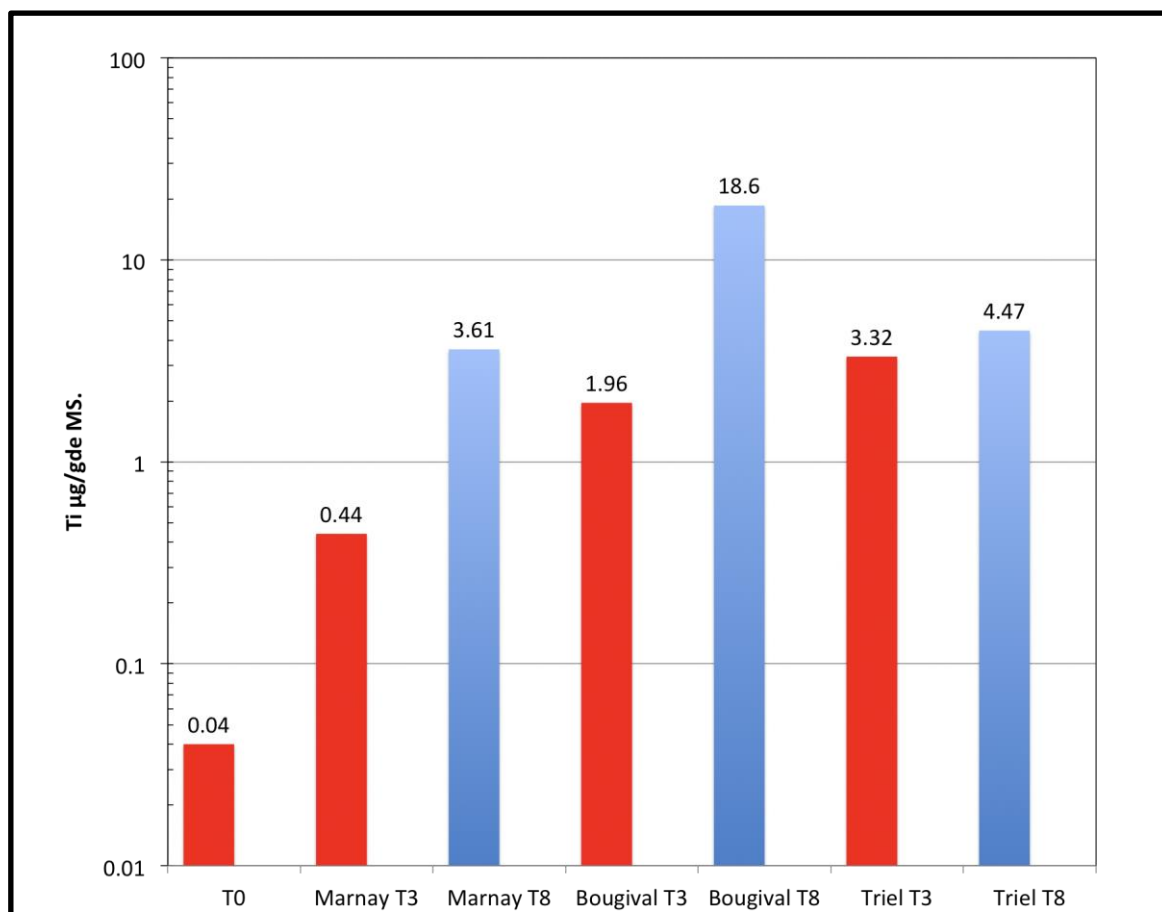


Figure 3. Diagramme de la concentration ( $\mu\text{g.g de Moules}^{-1}$ ) en Ti total dans les différentes populations de mollusques immergés

## 2.2. Attaque enzymatique

Etant donné la complexité de la matrice présente dans nos échantillons, les premiers tests d'analyse ont échoué. Une dilution est nécessaire afin de ne pas endommager l'ICP-MS en raison de la forte concentration en sodium. La centrifugation n'a pas été assez effective, des morceaux de moules s'étant coincés dans la torche. Il a donc été impossible d'avoir des données traitables, le bruit de fond étant trop important. En effet, le signal retransmis était différent pour les 5 répliques de solution de titane, impliquant qu'il y a eu une dégradation des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ou une contamination par la sonde à ultrasons. Les manipulations sont donc à poursuivre afin de perfectionner le protocole analytique.

## Conclusion

Il n'est pour le moment pas possible de conclure sur la validité du protocole employé pour solubiliser les mollusques et caractériser les nanoparticules à l'intérieur des mollusques. En effet, l'effet de matrice est trop important pour traiter les données des échantillons analysés. De plus, les nombreuses étapes de solubilisation compliquent l'identification des éléments de contamination des échantillons. Nous cherchons actuellement une solution pour pouvoir analyser en sp-ICP-MS les échantillons de mollusques, notamment en

essayant de diluer davantage les échantillons afin de ne pas endommager le dispositif de HR-ICP-MS. L'analyse des attaques totales, quant à elle, a été concluante sur l'aspect filtreur des organismes. Les analyses effectuées permettent d'attester du caractère filtreur des mollusques. D'autres d'analyses sp-ICP-MS sont prévues afin de valider le protocole de solubilisation enzymatique des moules ainsi que la quantification et détermination des nanoparticules à l'intérieur des organismes.

## Bibliographie

Ilaria et al., (2018) Bioaccumulation and effects of titanium dioxide nanoparticles and bulk in the clam *Ruditapes philippinarum*, *Marine Environmental Research*, Vol.136, 179-189.

Lopes Rocha et al., (2015) Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs : An overview, *Marine Environmental Research*, Vol.111, 75-88.

Pace et al., (2011) Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 83, 9361–9369.

Reimann C, et al., (2018), GEMAS: Establishing geochemical background and threshold for 53 chemical elements in European agricultural soil, *Applied Geochemistry*, Volume 88, Part B, 302-318.

Taboada-Lopez et al., (2018) Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS, *Analytica Chimica Acta*, Vol.1018, 16-25.

Tharaud M. et al., (2017) TiO<sub>2</sub> nanomaterial detection in calcium rich matrices by spICPMS. A matter of resolution and treatment, *J. Anal. At. Spectrom.*,32, 1400-1411.

Wang et al. (2021) Titanium nanoparticles concentrations and fluxes in small size watersheds under different land-uses. Submitted to *Nanoimpact*.

Wenhong et al., (2018) Aging influences on the biokinetics of functional TiO<sub>2</sub> nanoparticles with different surface chemistries in *Daphnia magna*, *Environmental Science and Technology*, Vol.52, 7901-7909.