

Thèse de Doctorat

Carole BERTRAND

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Soutenu le 31 octobre 2016 à Nantes

École doctorale : VENAM

Discipline : Pharmacie

Spécialité : Ecotoxicologie

Unité de recherche : MMS - LIEC (CNRS 7360)

Nanomatériaux à travers un gradient de salinité :

Exposition et effets écotoxicologiques au cours de leur cycle de vie

JURY

President du jury : **Emmanuel FLAHAUT**, Directeur de recherche au CNRS-HDR, Université Paul Sabatier (Toulouse)

Rapporteurs : **Stéphane BETOULLE**, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne (Reims)

Examineurs : **Arno GUTLEB**, Chercheur Senior, LIST (Luxembourg)

Laury GAUTHIER, Maître de conférences-HDR, Université de Toulouse (Toulouse)

Invité(s) : **Mélanie AUFFAN**, Chargé de recherches-HDR, CEREGE (Aix-en-Provence)

Aurore ZALOUK-VERGNOUX, Maître de conférences, Université de Nantes-MMS (Nantes)

Directeur de Thèse : **Catherine MOUNEYRAC**, Professeur, Université Catholique de l'Ouest- MMS (Angers)

Co-directeur de Thèse : **Laure GIAMBERINI**, Professeur, Université de Lorraine-LIEC (Metz)

Co-encadrants de Thèse : **Simon DEVIN**, Maître de conférences-HDR, Université de Lorraine-LIEC (Metz)

Laurence POIRIER, Maître de conférences, Université de Nantes-MMS (Nantes)

« C'est parce qu'ils ne savaient pas que c'était impossible qu'ils l'ont fait »

(Samuel Langhorne Clemens)

A ceux que j'aime.

REMERCIEMENTS.

Le travail de rédaction de la thèse est difficile, mais il en est un tout aussi difficile : les remerciements.

Pour m’avoir permis de mener ce projet à bien et de vivre de tels moments, je tenais donc à remercier chaleureusement mes deux directrices, Mme **Laure Giambérini** et Mme **Catherine Mouneyrac**. Merci de m’avoir permis d’acquérir cette expérience personnelle et professionnelle qu’est la thèse. Merci pour la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve, malgré vos nombreuses obligations respectives. J’ai découvert à vos côtés les relations humaines et professionnelles du monde de la science. Je remercie également l’ensemble de mes co-directeurs Mme **Aurore Zalouk-Vergnoux**, M. **Simon Devin** et Mme **Laurence Poirier**. Merci pour vos relectures et surtout de m’avoir permis de réaliser mon travail de paillasse dans les meilleures conditions possibles.

Merci aux rapporteurs M. **Emmanuel Flahaut**, M. **Stephane Betoulle**, ainsi qu’aux membres du jury M. **Arno Gutleb** et M. **Laury Gauthier** qui ont accepté d’évaluer ce travail. Je remercie également la direction des différents laboratoires, le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) UMR 7360 CNRS de Metz (LIEC), Monsieur **Fabien Thomas** et Mme **Pascale Bauda** ainsi que le laboratoire Mer Molécules et Santé de Nantes-Angers (MMS), M. **Jean-Yves Pouchus** pour m’avoir accueillie.

Mes remerciements vont également à l’ensemble du CEREGE d’Aix en Provence, pour leur aide dans l’acquisition des données physico-chimiques des nanoparticules, tout particulièrement Mme **Mélanie Auffan**, porteuse du projet NanoSALT, M. **Jérôme Labille**, M. **Clément Levard**, M. **Jérôme Rose** et M. **Jean-Yves Botero**.

Je remercie également M. **Alain Geffard**, membre de mon comité de suivi de thèse pour son écoute et son implication durant ces 3 années de recherche.

En effet, ma thèse est le fruit de trois ans de travail, sur deux sites, Metz et Angers. J’ai donc passé la moitié de mon temps sur chaque site en compagnie de deux équipes d’écotoxicologues.

Je tiens donc à remercier l’équipe d’Angers et tout particulièrement, Mme **Hanane Perrein-Ettajani**, pour son œil d’experte dans le domaine, mais également pour tous les conseils fort précieux qu’elle a pu me donner durant ma thèse. Je remercie également l’équipe scientifique Mme **Mélanie Bruneau**, Mme **Amélie Châtel**, M. **Mohamed Mouloud**, Mme **Isabelle Métais**, M. **Patrick Gillet**, Mme **Elisabeth Lambert**, et administrative, M. **Jonathan Lule**, Mme **Nina Lefloch**, Mme **Mirsada Djulbic**, Mme **Yolande Gaurion**, Mme **Marie-Laure Valles** et M. **Le Guillanton**.

Je remercie aussi l'équipe de MMS sur le site de Nantes, Mme **Aurore Zalouk-Vergnoux**, Mme **Laurence Poirier** ainsi que Mme **Simonato**.

Le temps précieux passé sur METZ m'a permis de rencontrer de nombreuses personnes que je souhaite remercier très chaleureusement, **Jean-François Poinsaint**, **Philippe Rouselle**, **Phillipe Wagner**, **Etienne Morhain**, **Maryline Goergen**, **Nathalie Kleinen**, **Catherine Drui**, **Marie-Andrée Dollard**, **Nelly Brûlé**, **Danièle Pauly** et **Bénédicte Sohm**.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à **Simon Devin** surnommé **Papa** mais également à **Sandrine Pain-Devin**, pour leur gentillesse, leur aide et leur joie de vivre. Une pensée également à l'ensemble des chercheurs du laboratoire, **Christophe Pagnout**, **Vincent Felten**, **Michaël** et **Florence Danger**, **Elise Billoir**, **Davide Vignati**, **Elisabeth Gross**, **Delphine Aran**, **Pascal Poupin**, **Carole Cossu-Leguille**, **François Rodius**, **Sylvie Cotelle** et **Jean François Masfaraud**.

Je tenais également à remercier le personnel d'entretien **Nathalie** à Metz et **Nicolas** à Angers, dont les horaires en complète opposition selon les sites, m'ont permis par leur présence de dire qu'il n'était jamais « ni trop tôt ni trop tard » pour travailler au laboratoire !

Je rends grâce au foyer Merici, aux personnels ainsi qu'aux Sœurs Ursulines (Sœur Jeanne-Françoise, Sœur Simone, Sœur Colette-Marie) pour leur accueil et leur gentillesse au quotidien. Merci également à **Mimi** pour ces bons moments échangés en cuisine.

Je remercie également les étudiants stagiaires rencontrés durant ma thèse **Simon**, **Tristan**, **Joévin**, **Vanessa**, **Cécile**, **Fayza** et les rencontres scientifiques avec **Lidwina** et **Tiphaine**.

Un immense merci aux doctorant(e)s, pour les moments partagés dans ma vie personnelle et professionnelle. MERCI aux filles : **Jennifer (DukeDadesse I)**, **Marine (DukeDadesse II)**, **Alice**, **Fanny**, **Andréïna**, **Evelyne**, **Emilie** et **Faustine** pour leur écoute, leur confiance, leur pragmatisme et bien sûr pour les soirées filles !! Merci aussi à **Maël (DukeDad)**, **Clément**, **Imad**, **Pierre**, **Julio**, **Kevin**, **Vanessa**, **Anne**, **Nicolas** et **Andrew**.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, **Lionel** et **Brigitte** et oui, sans vous rien n'aurait été possible. Merci d'avoir toujours partagé mes choix et à de nombreuses reprises mes horaires ! J'ai toujours eu conscience de la chance que j'ai de vous avoir comme parents, on y croit, on y croit jusqu'au bout ! **Mamy Yvonne**, merci de m'écouter te raconter ma vie et celle de mes petites bêtes (et autant dire que ce n'est pas une mince affaire !), je pense que toi aussi tu es heureuse du chemin parcouru.

Je pense également fort à mon **Papy Maurice** qui aurait été bien heureux (et certainement un peu fier) de sa petite fille. Je tiens également à rendre honneur à des lieux chargés de sens à mes yeux, « La Clairefontaine », « Le Bas Bourg », « Ludweiler », « Kriftel », « Gaël », « Brême »... Un grand merci à tous mes proches.

Le dernier de mes remerciements mais non le moindre va à mon amour **Jonas**. L'infini n'est pas assez grand pour exprimer l'immense chance que j'ai eu de te rencontrer et d'avoir découvert l'écotoxicologie à tes côtés. Depuis déjà quelques années, par ton amour, tu m'aides à accomplir des rêves et tu remplis ma vie de bonheur, alors pour l'ensemble de nos futurs beaux moments : MERCI.

Cette thèse a été financée par l'Agence nationale de la Recherche dans le cadre du programme NanoSALT (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project).

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : Contexte scientifique.....	5
A. Entrée des contaminants en milieu aquatique	5
B. Le cas particulier des estuaires	9
C. La salinisation des milieux.....	11
1. Salinisation primaire ou naturelle.....	12
2. Salinisation secondaire ou anthropique	12
a. Activités agricoles	13
b. Activités industrielles	13
c. Activités de transport.....	13
d. Activités domestiques.....	14
3. Conséquences écologiques	14
4. L'induction de stress suite à la variation de la salinité	15
D. Singularités des études le long du continuum aquatique eaux douces-eaux marines.....	16
E. Le nanomonde.....	16
1. Nanotechnologie, un enjeu de taille	16
2. Définition des nanotechnologies	17
3. Origines des nanomatériaux	19
F. Nanotechnologies: enjeux socio-économiques et réglementaires	20
1. Enjeux socio- économiques.....	20
2. Niveau de la réglementation des NM	21
G. Les NM manufacturés et les nanoproducts.....	22
1. Les NM manufacturés standardisés.....	22
2. Incorporation des NM aux nanoproducts	23
3. Le cas des NM et nanoproducts d'argent.....	24
a. Secteurs d'utilisation et mécanismes d'action.....	24
b. Rejets et devenir dans l'environnement	26
4. Le cas des NM et nanoproducts de dioxyde de cérium.....	27
a. Secteurs d'utilisation et mécanismes d'action.....	27

b. Comportement dans l'environnement	28
5. Enjeux environnementaux	28
Chapitre II : Démarche scientifique	31
A. Complexité de l'exposition.....	31
1. Exposition multi-stress : définition, concept	31
2. Outils mis en place pour étudier le multi-stress	32
B. Modèles biologiques	35
1. <i>Corbicula fluminea</i>	35
a. Répartition géographique et site de prélèvement	36
b. Morphologie et anatomie <i>C. fluminea</i>	38
2. <i>Scrobicularia plana</i>	39
a. Répartition géographique et site de prélèvement	39
b. Morphologie, anatomie de <i>S. plana</i>	41
3. Physiologie des bivalves.....	41
4. Régime alimentaire des deux espèces	43
5. Place des deux espèces dans le réseau trophique	43
6. Cycle de vie des deux espèces.....	44
7. Rôle bio-indicateurs des bivalves dans l'écosystème	46
8. Choix de ces deux organismes modèles	47
C. Méthodes pour le dosage des marqueurs du métabolisme biologique.....	48
1. Biomarqueurs énergétiques et structuraux.....	49
a. Cholestérol.....	49
b. Triglycérides.....	50
c. Système de transport d'électrons (ETS)	50
2. Biomarqueurs impliqués dans les processus d'osmo-régulation	51
3. Biomarqueurs du stress oxydant.....	51
a. Catalase	51
b. Glutathion peroxydase (GPx)	52
c. Capacité antioxydante totale (TAC).....	53
4. Mécanismes de détoxification	53
a. Glutathion S-transférase (GST).....	53
b. Métallothionéines	54
c. La phosphatase acide (ACP)	55
5. Biomarqueurs de comportement.....	55

6. Biomarqueur de neurotoxicité : inhibition de l'acétylcholinestérase	56
7. Les indicateurs de dommages cellulaires	57
a. Apoptose :	57
b. La lipopéroxydation	57
c. Lactate déshydrogénase LDH.....	59
8. Etat de santé général de l'individu : Indice de condition	59
D. Caractérisation du milieu d'exposition	59
a. Paramètres physico-chimiques du milieu.....	60
b. Métaux totaux.....	60
c. Mesure des formes labiles	61
E. Outils statistiques	63
a. Réponses indépendantes.....	63
b. Réponse intégrative	64
 1 ^{ère} Partie : Influence de la salinité sur les réponses écophysologiques des modèles biologiques étudiés. 67	
 Chapitre III: Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: <i>Corbicula fluminea</i> and <i>Scrobicularia plana</i>	71
 2 ^{ème} Partie : Ecotoxicologie des nanomatériaux et nanoproduits d'argent.	97
 Chapitre IV: The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve <i>Scrobicularia plana</i>	101
 Chapitre V: Impact of the degradation byproducts of silver-based wound dressing and reference nanomaterial (NM-300K) on two aquatic bivalves <i>Corbicula fluminea</i> and <i>Scrobicularia plana</i> as a function of salinity.....	117
 3 ^{ème} Partie : Ecotoxicologie des nanomatériaux et nanoproduits de dioxyde de cérium.	147
 Chapitre VI: Integrated ecotoxicological impact of pristine and ageing ceria nanoproduits and nanomaterials along a salinity gradient	151
 Chapitre VI.1: Under indoor freshwater mesocosm facility (using <i>Corbicula fluminea</i>)	151

Chapitre VI.2: Under indoor marine mesocosm facility (using <i>Scrobicularia plana</i>)	183
Chapitre VII: Discussion générale.....	213
A. L'influence de la salinité sur les organismes	213
B. L'écotoxicité des nanoproduits et nanomatériaux sur les organismes	217
a. Les nanoproduits	219
b. Les nanomatériaux standardisés	221
C. Autres facteurs de stress	222
a. La durée d'exposition.....	222
b. Le régime alimentaire.....	223
D. Pertinence des modèles biologiques	224
E. Pertinence des milieux d'exposition.....	225
F. Pertinence des réponses biologiques mesurées	226
G. Gestion de la donnée.....	229
Conclusion générale et perspectives.....	230
Bibliographie	232

Liste de figures

Figure 1 : Cycle des substances libérées dans l'écosystème aquatique (source : http://acces.ens-lyon.fr/evolution/biodiversite/dossiers-thematiques/biosurveillance-et-bioindicateurs/cycle-pollution.jpg).	5
Figure 2 : Composant de l'écosystème aquatique.	6
Figure 3 : Schéma de la zone benthique (adapté selon Pérez, 1975).	7
Figure 4 : Schéma de la circulation estuarienne à deux couches.	9
Figure 5 : Répartition des organismes benthiques dulçaquicoles (eau douce), marins et estuariens le long du gradient de salinité (Ducrottoy, 2010).	10
Figure 6 : Schématisation du mètre au nanomètre (Google images).	17
Figure 7 : Nomenclature des nanotechnologies selon l'Anses, (2014); Health Canada, (2010); Organisation internationale de normalisation, (2015).	18
Figure 8 : Schématisation de la taille des particules selon la surface spécifique (adapté de Klaine et al., 2012).	18
Figure 9 : Illustration des deux techniques de fabrication des nanomatériaux (Dreamstime, 2016).	19
Figure 10 : Domaines d'activité des entreprises françaises dans le secteur des nanotechnologies (OFI asset management, 2016).	21
Figure 11 : Proportion des différentes catégories de nanoproduits, calculées à partir des informations de Nanotechproject (2016).	23
Figure 12 : Nanoproduits étudiés dans cette thèse (A : pansement Acticoat™ ; B : additif d'huile de moteur Envirox™).	24
Figure 13 : Schématisation des modes d'actions des nanomatériaux d'argent adaptée selon Wong and Liu, (2010).	25
Figure 14 : Devenir des NM dans l'environnement (adapté selon Singh (2015). A : Extraction du composé, B : Production de NMs ; C : Formulation de NMs manufacturés ; D : Production de nanoproduit ; E : Utilisation du nanoproduit ; F : Résidus de dégradation.	29
Figure 15 : Dispositif d'exposition des organismes dans l'expérience menée sur les nanoproduits d'argent (pansement Acticoat™).	34
Figure 16 : Dispositifs expérimentaux en mésocosme d'eau douce.	34
Figure 17 : Dispositifs expérimentaux des mésocosmes marins.	35

Figure 18 : Carte de l'aire de répartition du genre <i>Corbicula</i> , en gris les espèces natives et en noir les espèces introduites (Clavero et al., 2012).....	37
Figure 19 : Site de prélèvement de <i>C. fluminea</i>	38
Figure 20 : Schéma de coquilles du genre <i>Corbicula</i> :	39
Figure 21 : Site de prélèvement <i>S. plana</i>	40
Figure 22 : Comparaison de la taille des organismes de milieux marins en fonction de la taille des siphons (http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/cotes/c_basses2.htm , consulté le 25/06/2015), B. photographie de <i>S. plana</i> et trace des siphons en surface de sédiment (googleimage).....	41
Figure 23 : Exemple d'une coupe longitudinale d'un bivalve, <i>Corbicula fluminea</i> (Vidal, 2001).....	42
Figure 24 : Schéma représentant le cycle de vie de <i>C. fluminea</i>	44
Figure 25 : Illustration du cycle de vie de <i>S. plana</i> (Fossi-Tankoua, 2011)	45
Figure 26 : Schéma illustrant le mode d'action des nanomatériaux et nanoproduits (ENMs) sur les principaux biomarqueurs au niveau cellulaire.	49
Figure 27 : Schéma représentant le mode d'action des métallothionéines (MT) dans le cytoplasme dans le cas d'une contamination au mercure (Hg).	54
Figure 28 : Schématisation de la chaîne de la peroxydation lipidique. (adapté de Alves de Almeida et al., 2007)	58
Figure 29 : Schéma du dispositif des DGT en mésocosme (en colonne d'eau et dans le sédiment)	62
Figure 30 : Dispositif d'ultra-filtration en tube Amicon™ (source : www.popscreen.com) ...	62
Figure 31 : Illustration des réponses des organismes osmo-régulateurs en fonction des contraintes environnementales et la composition du milieu interne. La ligne en pointillés bleus correspond aux espèces osmo-conformes.	213
Figure 32 : Différentes approches d'exposition réalisées durant cette thèse.	225
Figure 33 : Mécanismes physiologiques mise en place par les organismes exposés à des contaminants et les réponses des biomarqueurs pouvant être observées (Depeldge et al., 1993). Ex= exemple	228

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition ionique des eaux (rivière et mer en moyenne sur le globe) selon Schmidt-Nielsen (1997).	8
Tableau 2 : Ensemble des conditions expérimentales testées durant cette thèse.	33
Tableau 3 : Différents types de composition du sédiment testés sur les deux espèces.	215
Tableau 4 : Ensemble des expériences réalisées durant cette thèse et synthèse des principaux résultats.....	218

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré celcius
®	Marque déposée
AChE	Acétylcholinestérase
ACP	Phosphatase acide
ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Argent
Ag ⁺	Ion argent
Ag ⁰	Atome d'argent
AgCl ⁰	Chlorure d'argent
AgNM	Nanomatériaux d'argent
Al ₂ O ₃	Oxyde d'aluminium
ANOVA	Analysis of variance
ANR	Agence national de la recherche
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
Ca ²⁺	Ions calcium
CaCO ₃	Carbonate de calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
Ce ³⁺	Cérium ionique
Ce ⁴⁺	Cérium ionique
CeO ₂	Dioxyde de cérium
CeO ₂ NM	Nanomatériaux de dioxyde de cérium
CEREGE	Centre de recherche et d'enseignement de géosciences de l'environnement
Chol	Cholestérol
CI ₅₀	Inhibition de 50 % de la croissance
cm	Centimètre
CNTs	Nanotubes de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
COD	Carbone organique dissous
CSP	Caspase

CSP-3	Caspase-3
Cu	Cuivre
DA	Discriminant Analysis
DCE	Directive cadre sur l'eau
DCSMM	Directive cadre stratégie pour le milieu marin
DGCIS	Direction Générale de la Compétitivité de l'Industrie et des Services
DGT	Diffusive Gradient of Thin film
DLS	Dynamic Light Scattering
DOC	Carbone organique dissous
ENMs	Engineered nanomaterials
ETS	Electron transport système
Ex	Exemple
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferriques
g.L ⁻¹	Gramme par litre
GNLM	Modèle général non linéaire
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion à l'état réduit
GST	Glutathion-S-transférase
h	Heures
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hg	Mercure
HO ·	Radical hydroxyle
hPa	Hectopascal
HPL	Hydroperoxyde lipidique
IBR	Integrated Biomarker Response
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
INT	5 phenyl tetrazolium chloride
ISO	Organisation internationale de normalisation
JRC	Joint research centre
K ⁺	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
LCA	Life Cycle Assessment

LDA	Analyse linéaire discriminante
LDH	Lactate déhydrogénase
LIEC	Laboratoire interdisciplinaire des environnements continentaux
LOOH	Hydroperoxide lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MFB	Multi Freshwater Biomonitoring
Mg ²⁺	Ion magnésium
MgO	Oxyde de magnésium
mmol.kg ⁻¹	Millimole par kilogramme
MMS	Mer molécule santé
MON	Matière organique naturelle
MT	métallothionéines
Na/K ATPase	Pompe sodium-potassium
Na ⁺	Ion sodium
NAP	Nanoproduits commercialisés
ng/L	Nanogramme par litre
NM	Nanomatériaux
NM-212	Nanomatériaux de dioxyde de cérium
NM-300K	Nanomatériaux d'argent
NOEC	No effect concentration
O ₂	Dioxygène
ODEON	Sonde de mesure (Marque Ponsel)
OECD ou OCDE	l'Organisation de Coopération et de Développement Economique
PF	poids frais
pH	Potentiel d'hydrogène
PLS	Partial Least Squares regression
PLS-DA	Régression des moindres carrés partiels couplé à l'analyse discriminante
PME	Petites et moyennes entreprises
Prot	Protéines
PS	Poids sec
psu	Practical salinity unit
PTS	Poids total sec
PVP	Polyvinylpyrrolidone
REACH	Règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques

ROOH	Hydroperoxydes organiques
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
S.I.E.R.M	Système d'information sur l'eau Rhin-Meuse
S.m ⁻¹	siemens par mètre
SAGE	Schéma d'Aménagement et Gestion de l'Eau
Se	Sélénium
SiO ₂	Dioxyde de silicium
SnO	Oxyde d'étain
SOD	Superoxyde dismutase
sp.	Species
t/an	tonne par an
TAC	Capacité antioxydante totale (Total Antioxidant Capacity)
TBARS	Thiobarbituric réactive substances
TiO ₂	Dioxyde de titane
™	marque déposée
Trigly	Triglycérides
UNESCO	Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture
USA	Etats-Unis d'Amérique
VIP	Variable Importance in the Projection
Zn	Zinc
ZnO	Oxyde de zinc
ZrO	Oxyde de zirconium
µg/Kg	Microgramme par kilogramme
µg/L	Microgramme par litre
µm	Micromètre
µS.cm ⁻¹	Micro Siemens par centimètre

Information personnelle

Nom : Carole Bertrand

Courriel : cbbertrandcarole@googlemail.com

Date et lieu de naissance : 13 mai 1988, SAINT BRIEUC, France

Formation

10/2013 – 10/2016 **Doctorat en écotoxicologie**

Nanomatériaux à travers un gradient de salinité : Exposition et effets écotoxicologiques au cours de leur cycle de vie

Université de Nantes, Nantes (44), France

09/2011 – 07/2013 **Master**

Master Environnement & Aménagement parcours Biodiversité, Ecotoxicité, Ecosystèmes

Université de Lorraine, Metz (57), France.

09/2009 – 09/2010 **Licence professionnelle**

Protection de l'environnement, parcours Gestion et traitement des sols et des eaux

Institut de Biologie et d'Ecologie Appliqué (IBEA), Université Catholique de l'Ouest (UCO) (49), France.

09/2006 – 07/2009 **Brevet de Technicien Supérieur**

Brevet de Technicien Supérieur Biotechnologies

Lycée Talensac, Nantes (44), France.

2006 **Baccalauréat**

Sciences et Technologies de Laboratoire, (STL), parcours Biologie et génie- biologique

Lycée Jean XXIII, Quintin (22), France.

Prix

01/2014 *1st price, young scientists award, best poster presentations,
Annual conference of "Journée Scientifique de l'école doctorale VENAM",
Le Mans (72), France.*

Publications internationales

2016

Bertrand Carole, Laurence Poirier, Simon Devin, Laure Giambérini, Hanane Perrein-Ettajani, Aurore Zalouk-Vergnoux Christophe Pagnout, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac (2016, en préparation), “Integrated ecotoxicological impact of pristine and ageing ceria nanoparticles and nanomaterials along a salinity gradient (Part I: Under indoor freshwater mesocosms facility (using *Scrobicularia plana*))”.

Bertrand Carole, Simon Devin, Catherine Mouneyrac, Christophe Pagnout, Laurence Poirier, Aurore Zalouk-Vergnoux, Mélanie Auffan, Laure Giambérini (2016, en préparation), “Integrated ecotoxicological impact of pristine and ageing ceria nanoparticles and nanomaterials along a salinity gradient (Part II: Under indoor marine mesocosms facility (using *Corbicula fluminea*))”.

Bertrand Carole, Catherine Mouneyrac, Laure Giambérini, Laurence Poirier, Aurore Zalouk-Vergnoux, Hanane Perrein-Ettajani, Mélanie Auffan, Christophe Pagnout, Simon Devin (2016, en préparation), “Impact of the degradation byproducts of silver-based wound dressing and reference nanomaterial (NM-300K) on two aquatic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* as a function of salinity”.

Bertrand Carole, Devin Simon, Mouneyrac Catherine and Giamberini Laure, (11/2016, accepté), “Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*”, Ecological Indicators, (DOI : 10.1016/j.ecolind.2016.11.029).

Bertrand Carole, Zalouk-Vergnoux Aurore, Giambérini Laure, Poirier Laurence, Devin Simon, Labille Jérôme, Perrein-Ettajani Hanane, Pagnout Christophe, Châtel Amilie, Levard Clément, Auffan Mélanie and Mouneyrac Catherine, 2016, “The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*”, Environmental Toxicology and Chemistry, 35: (10)-2250-2561 (DOI: 10.1002/etc.3428)

Publications internationales en collaboration

2016

Garaud Mael, **Bertrand Carole**, Ziebel Johanna, Felten Vincent, and Giamberini Laure. (2016, en préparation) “Impairment of Zebra Mussel Hemocyte Immuno-Competence Following *in vivo* Exposure to Low Concentrations of nAg and AgNO₃ and the Influence of Feeding.”

Baumann Jonas, **Bertrand Carole**, Becker M, Filser Juliane (2016, en préparation). “Colloidal properties of PVP-coated IONP affect their bio-distribution and life history responses of *Daphnia magna*”.

Baumann Jonas, Köser Jan, **Bertrand Carole**, Filser Juliane (2016, en préparation). “Acute combinatory effects of iron oxide nanoparticles with selected contaminants on *Daphnia magna*”.

2014

Baumann Jonas, Sakka Yvonne, **Bertrand Carole**, Köser Jan, Filser Juliane (2014), “Adaptation of *Daphnia sp.* Acute toxicity test: miniaturization and prolongation for the testing of nanomaterials”, Environ. Sci Pollut Res. 21:2201-2213.

2012

Nicolai Annegret, Filser Juliane, Lenz Roman, **Bertrand Carole**, Charrier Maryvonne (2012), “Quantitative assessment of hemolymph metabolites in two physiological states and two populations of the land snail *Helix pomatia*”, Physiological and biochemical zoology, 85(3):274- 284.

2010

Nicolai Annegret, Filser Juliane, Lenz Roman, **Bertrand Carole**, Charrier Maryvonne, (2010), “Adjustment of metabolite composition in the haemolymph to seasonal variations in the land snail *Helix pomatia* ”, J Comp Physiol B, 181(4):457-66.

Communications orales internationales

2016

Bertrand Carole, Devin Simon, Mouneyrac Catherine, Auffan Mélanie, Châtel Amélie, Koehle-Divo Vanessa, Pagnout Christophe, Pain-Devin Simon, Pariat Anne, Perrein-Ettajani Hanane, Poirier Laurence, Zalouk-Vergnoux Aurore, Giambérini Laure (2016), « Cross effects of salinity and ceria nanoparticles on two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*: multibiomarker assessment », *SETAC Europe 26th annual meeting*, Nantes, France.

2015

Bertrand Carole, Zalouk-Vergnoux Aurore, Mouneyrac Catherine, Poirier Laurence, Châtel Amélie, Perrein-Ettajani Hanane, Auffan Mélanie, Tella Marie, Pagnout Christophe, Devin Simon, Giambérini Laure (2015), “Influence of salinity on fate and behavior of silver-based nanomaterials and toxicity effects toward two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*”. *SETAC Europe 25th annual meeting*, Barcelona, Spain.

2014

Bertrand Carole, Poirier Laurence, Zalouk-Vergnoux Aurore, Devin Simon, Auffan Mélanie, Tella Marie, Giamberini Laure, Mouneyrac Catherine (2014), “Nanomaterials across a salinity gradient: exposure and ecotoxicological effects within a life cycle perspective“, *CEINT Internal Meeting*, Durham, United State of America.

Bertrand Carole, Poirier Laurence, Zalouk-Vergnoux Aurore, Devin Simon, Auffan Mélanie, Tella Marie, Labille Jérôme, Perrein-Ettajani Hanane, Giamberini Laure, Mouneyrac Catherine (2014), «Effect of silver nanoparticles on the estuarine bivalve *Scrobicularia plana* », *NanoSAFE*, Grenoble, France.

Communications orales internationales en collaboration

2014

Garaud Maël, Andreï Jennifer, Auffan Mélanie, **Bertrand Carole**, Clivot Hervé, Brulé Nelly, Devin Simon, Dollard Marie-André, Felten Vincent, Guérold François, Pagnout Christophe, Pain-Devin Simon, Poinssaint Jean-François, Proux Olivier, Rodius François, Sohm Bénédicte, Rousselle Philippe, Tella Marie, Wagner Philippe and Giambérini Laure (2014), “Long term effects of cerium dioxide nanoparticles (nCeO₂) on a simplified food chain of microorganisms and zebra mussels ». SETAC Europe 24th annual meeting, Basel, Swiss.

Communications affichées internationales en collaboration

2016

Koehle-Divo Vanessa, Simonin Cécile, **Bertrand Carole**, Cossu-Leguille Carole, Pain-Devin Sandrine, Sohm Bénédicte, Giambérini Laure (2016), “Genotoxic and physiological effects of nCeO₂ on freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)”, *SETAC Europe 26th annual meeting*, Nantes, France.

Chouvelon Tiphaine, Mouneyrac Catherine, Taveré H., Auger D., **Bertrand Carole**, Brach-Papa C., Bruzac S., Crochet S., Knoery J., Rozuel E., (2016), “Biological-chemical parameters' coupling for the monitoring of trace metal contaminants in food webs: the case study of a land-to-sea continuum in the North-East Atlantic” *SETAC Europe 26th annual meeting*, Nantes, France.

2015

Garaud Maël, Auffan Mélanie, **Bertrand Carole**, Devin Simon, Felten Vincent, Pagnout Christophe, Pain-Devin Sandrine, Rodius François, Sohm Bénédicte, Rousselle Philippe, Tella Maire, Wagner Philippe and Giambérini Laure (2015), “Integrated discriminant biomarker analysis as a tool to reveal

the effects of metallic nanoparticles on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* following mesocosm exposures”. *SETAC Europe 25th annual meeting*, Barcelona, Spain.

2014

Garaud Maël, **Bertrand Carole**, Brulé Nelly, Devin Simon, Felten Vincent, Sohm Bénédicte and Giambérini Laure (2014), “Multibiomarker assessment of the long term effects of dissolved and nanoparticulate silver (nAg) on zebra mussels: influence of feeding”, *SETAC Europe 24th annual meeting*, Basel, Swiss.

Garaud Maël, Andreï Jennifer, **Bertrand Carole**, Brulé Nelly, Devin Simon, Felten Vincent, Guérolld François, Mouneyrac Catherine, Pain-Devin Sandrine, Poirier Laurence, Pagnout Christophe, Poinssaint Jean-François, Rousselle Philippe, Sohm Bénédicte, Wagner Philippe, Zalouk-Vergnoux Aurore, Giambérini Laure (2014), “Overview of silver Engineered Manufactured Nanomaterials: fate and effects on several estuarine and freshwater invertebrate species using a multimarker approach”, *SETAC North America 35th Annual Meeting*, Vancouver, Canada.

2013

Garaud Maël, Andreï Jennifer, **Bertrand Carole**, Brulé Nelly, Dollard Marie-André, Felten Vincent, Pagnout Christophe, Pain-Devin Sandrine, Poinssaint Jean-François, Rodius François, Rousselle Philippe, Wagner Philippe and Giambérini Laure (2013), « Aquatic mesocosm study of cerium dioxide nanoparticle effects on micro-organisms and invertebrates ». *8th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix-en-Provence, France.

Garaud Maël, Andreï Jennifer, **Bertrand Carole**, Brulé Nelly, Dollard Marie-André, Felten Vincent, Pagnout Christophe, Pain-Devin Sandrine, Poinssaint Jean-François, Rodius François, Rousselle Philippe, Wagner Philippe and Giambérini Laure (2013), « Aquatic mesocosm study of cerium dioxide nanoparticle effects on micro-organisms and invertebrates ». *SETAC Europe 23rd annual meeting*, Glasgow, United Kingdom.

Baumann Jonas, Sakka Yvonne, **Bertrand Carole**, Filser Juliane (2013). “Miniaturization of the *Daphnia magna* acute test increases the toxicity of silver nanoparticles.” (in German language). *3rd Cluster Meeting of NanoCare/NanoNature*, DECHEMA, Frankfurt/Main, Germany.

Baumann Jonas, Sakka Yvonne, **Bertrand Carole**, Filser Juliane (2013). “Miniaturization and economization of the *Daphnia* acute toxicity test (according to OECD 202) with microtiter plates.” (in German language). *18th Annual SETAC GLB Conference 2013*, Essen, Germany.

Sakka Yvonne, Baumann Juliane, **Bertrand Carole**, Köser Jan, Filser Juliane (2013). “Effects of miniaturizing the *Daphnia* acute test on the toxicity of silver nitrate and silver nanoparticles (NM-300K).” (in German language). *18th Annual SETAC GLB Conference 2013*, Essen, Germany.

2012

Baumann Jonas, Sakka Yvonne, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane, (2012), « The acute test with *Daphnia magna* underestimates environmental risks of iron (oxide) nanoparticles ». *6th SETAC World Congress/ SETAC Europe 22nd annual meeting*, Berlin, Germany.

Baumann Jonas, Sakka Yvonne, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2012). “The acute test with *Daphnia magna* underestimates environmental risks of iron oxide nanoparticles.” *6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting*, Berlin, Germany.

Baumann Jonas, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2012). “Iron (oxide) nanoparticles for environmental remediation? A case study on single and combinatory effects on *Daphnia magna*.” (in German language). *2nd Cluster meeting NanoCare/NanoNature*, DECHEMA, Frankfurt/Main, Germany.

2011

Baumann J, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2011). “Iron (oxide) nanoparticles for environmental remediation? A case study on single and combinatory effects on *Daphnia magna*.” (in German language). *Symposium Strategies for soil and groundwater remediation*, DECHEMA, Frankfurt/Main, Germany.

Baumann J, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2011). “Iron (oxide) nanoparticles for environmental remediation? A case study on single and combinatory effects on *Daphnia magna*.” (In German language). *12th Annual SETAC-GLB Conference*, University Koblenz- Landau, Landau, Germany.

2010

Baumann Jonas, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2010). “Ecotoxicological investigations with iron oxide nanoparticles: Toxicity, combinatory effects and bioaccumulation in *Daphnia magna*” *NORMAN-Expert Group Meeting: Engineered Nanoparticles in the Environment*, BfG, Koblenz, Germany.

Baumann Jonas, **Bertrand Carole**, Arndt Darius, Filser Juliane (2010). “Ecotoxicological investigations with iron oxide nanoparticles: toxicity, combinatory effects and bioaccumulation in

Daphnia magna.” (in German language). *4th Joint Annual Conference of SETAC GLB and GDCh*, UBA, Dessau, Germany.

Communications affichées nationales

2014

Bertrand Carole, Zalouk-Vergnoux Aurore, Giambérini Laure, Mouneyrac Catherine (2014), « Nanomaterials across a salinity gradient » (in French language), *Journées Scientifiques de l'école doctorale VENAM*, Le Mans, France.

Participation à l'organisation d'évènements scientifiques

2016

Helper student in “European 26th Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry” at Nantes (France), from 21-26 May 2016.

2014

Helper planner of “Scientific days of the VENAM doctoral school” at Angers, 3 and 4th December 2014.

Langues	Anglais (TOIEC: 675) Allemand (A2).
Informatique	Pack Microsoft office, logiciel statistique R
Permis	Permis de conduire licence B

INTRODUCTION

Les scénarios sur le changement climatique prédisent une augmentation des impacts écologiques majeurs dans les cent prochaines années sur l'ensemble de la biosphère. Dans ce contexte, le compartiment aquatique est particulièrement menacé, subissant des modifications telles que l'acidification des milieux, l'augmentation de la température ou de la salinité. Diverses sources d'origine naturelle (dite primaire) ou d'origine anthropique (dite secondaire) peuvent entraîner la modification de la salinité des milieux aquatiques. Cette salinisation peut largement augmenter l'entrée d'électrolytes dans le milieu, induisant ainsi l'augmentation de quantités de sels introduits dans les zones estuariennes et côtières (Cañedo-Argüelles et al., 2013). Le milieu aquatique est également soumis à de nombreuses pressions le long du continuum eau douce-eau de mer, notamment par les effluents toxiques (drainages des terres, rejets industriels...). La modification de la salinité dans le milieu aquatique peut jouer un rôle important dans le comportement physico-chimique des contaminants (biodisponibilité, spéciation...) (Auffan et al., 2014).

Les avancées scientifiques de ces dernières décennies ont donné naissance à une nouvelle discipline : la nanotechnologie. Ce nouveau domaine trouve des applications dans de nombreux secteurs (exemple : optique, électronique, agro-alimentaire, médical, remédiation environnementale) et pourrait permettre l'amélioration de divers aspects de notre quotidien grâce aux propriétés inédites conférées par la taille nanométrique. Dans ce contexte, les nanomatériaux (NM) sont largement incorporés dans de nombreux produits de consommation. Sur ces dix dernières années, le nombre de produits contenant des nanomatériaux est passée de 50 à 1827 (Nanotechproject, 2016). Cependant, malgré les bénéfices évoqués, l'utilisation accrue des nanomatériaux entraîne inévitablement leur entrée dans l'environnement. Des études modélisant les quantités possibles rejetées dans le milieu (air, sol, eau) et leur répartition dans ces compartiments ont été menées afin de pallier les limites techniques observées pour la mesure des NM dans les différents compartiments de l'environnement. Les nanoproduits libérés de manière intentionnelle ou non se retrouvent dans l'environnement et particulièrement dans l'écosystème aquatique, défini comme l'ultime réceptacle de multiples sources de contaminants (Amiard-Triquet et al., 2015). Ils subissent alors des changements de comportement liés aux caractéristiques physico-chimiques du milieu (salinité, pH, oxygénation, exposition aux ultra-violets ...). Les mécanismes de vieillissement des nanoproduits dans l'environnement sont donc très préoccupants lorsque l'on considère par exemple qu'ils peuvent entraîner la libération de substances (ioniques, chimiques) pouvant induire des effets toxiques.

Dans le cadre du développement de la réglementation des nanotechnologies (OECD, 2016), la communauté scientifique a montré la nécessité de définir une liste de NM prioritaires et de permettre leur étude à partir de NM standardisés largement caractérisés d'un point de vue physico-chimique.

Notre étude portera sur l'évaluation de deux types de NM standardisés d'argent et de dioxyde de cérium, le NM-300K et le NM-212 respectivement mais également sur deux nanoproducts d'argent et de dioxyde de cérium, l'Acticoat™ et l'Envirox™ respectivement. Cette approche a pour objectif de permettre l'acquisition d'une large batterie d'informations dans divers domaines (écotoxicologie, physique des matériaux...) afin de mieux appréhender le devenir et l'impact des NM dans l'environnement.

Dans ce contexte, trois laboratoires le LIEC (Metz), MMS (Angers-Nantes) et le CEREGE (Aix en Provence) ont choisis de s'associer pour développer le programme de recherche ANR NanoSALT (2013-2017). Ce projet est composé de trois axes principaux incluant :

1. La mise en place de protocoles mimant le vieillissement des nanoproducts de manière réaliste et l'étude de leur comportement physico-chimique à travers un gradient de salinité afin d'identifier les différentes voies d'exposition des organismes,
2. l'étude de l'influence de la salinité sur leur comportement physico-chimique, leur biodisponibilité (spéciation), leur distribution sub-cellulaire, leur assimilation cellulaire et les processus d'excrétions des NM selon les différentes modalités d'exposition (colonne d'eau, voie trophique ou en milieu plus complexe (mésocosme)),
3. l'évaluation écophysiologique et écotoxicologique des effets de NM et nanoproducts sur les deux espèces de bivalves endobenthiques sélectionnées, à travers un gradient de salinité et selon trois voies différentes d'exposition.

Ce travail de thèse s'insère dans les axes 2 et 3 de ce programme. Il a pour objectif de déterminer les effets écotoxicologiques des NM et des nanoproducts d'argent et de dioxyde de cérium à différentes étapes de leur cycle de vie chez deux espèces de bivalves tolérant un large gradient de salinité : *Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana*. Ces organismes euryhalins sont définis comme des espèces cibles des NM (Canesi and Corsi, 2016). L'évaluation des effets toxicologiques a été mesurée suite à l'exposition des organismes aux NM et nanoproducts en micro et mésocosmes le long d'un gradient de salinité (1.5, 15 et 30 practical salinity unit (psu)), à des doses les plus environnementalements réalistes possibles et sur des temps d'exposition pouvant atteindre un mois. L'évaluation du comportement physico-chimique des NM et nanoproducts le long du gradient a été réalisée en parallèle à la mesure d'une large batterie de biomarqueurs du niveau subcellulaire à l'individu. Ces outils biologiques (biomarqueurs) couvrent une large gamme de fonctions comportementales, biochimiques et physiologiques, complétée par l'évaluation de la bioaccumulation des métaux suite à l'exposition au NM chez les deux espèces de bivalves étudiées.

Les deux premiers chapitres de ce manuscrit de thèse permettront de poser les hypothèses de travail.

Le chapitre I nommé «Contexte scientifique » permettra d'introduire la problématique basée sur les processus de salinisation des milieux aquatiques et sur le devenir des NM et nanoproducts d'argent et de dioxyde de cérium.

Le chapitre II concerne la démarche scientifique et décrit les outils expérimentaux utilisés durant cette thèse ainsi que les organismes modèles et leur pertinence dans l'étude des NM. La batterie de biomarqueurs développée dans cette thèse sera décrite dans cette partie. Enfin, les paramètres physico-chimiques utilisés pour caractériser le milieu d'exposition ainsi que les outils statistiques employés seront présentés dans cette partie.

L'ensemble des résultats obtenus seront présentés en trois grandes parties articulées autour des manuscrits publiés, soumis, ou en cours de rédaction. Ces manuscrits seront systématiquement précédés d'un résumé en français rappelant le contexte, les objectifs et les principaux résultats. Un bilan des principales conclusions sera proposé à l'issue de chaque résumé.

La première partie, composée du chapitre III, sera consacrée à la présentation des travaux portant sur l'évaluation des réponses éco-physiologiques aux changements de salinité le long du continuum eau douce- eau de mer sur les deux organismes modèles *Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana* (publication n°1).

La deuxième partie, composée des chapitres IV et V, sera consacrée à la présentation des travaux portant sur les effets écotoxicologiques des nanomatériaux et nanoproduits d'argent.

Le chapitre IV comportera les résultats des travaux de l'influence de la salinité sur le devenir et le comportement des nanomatériaux standardisés d'argent et leurs effets toxiques sur le bivalve estuarien *Scrobicularia plana* (publication n°2). Le chapitre V décrira les travaux réalisés sur l'impact des résidus de dégradation d'un nanoproduit commercialisé et des nanomatériaux standardisés d'argent sur les deux espèces modèles (*C. fluminea*, *S. plana*) en fonction de la salinité par l'évaluation en approche intégrée des effets écotoxicologiques (publication n°3).

La troisième partie, composée du chapitre VI, sera consacré à la présentation des travaux portant sur les effets écotoxicologiques des nanomatériaux et nanoproduits de dioxyde de cérium.

Le chapitre VI sera divisé en deux sections. La première section portera sur les résultats de l'impact écotoxicologique des nanoproduits (avant et après utilisation) et des NM standardisés de dioxyde de cérium le long du gradient de salinité grâce à l'étude en mésocosme sur *Corbicula fluminea* (publication n°4). En seconde partie, les travaux porteront sur l'évaluation des mêmes nanoproduits et NM standardisé de dioxyde de cérium le long d'un gradient de salinité en mésocosme sur la seconde espèce étudiée *Scrobicularia plana* (publication n°5).

Le chapitre VII permettra une remise en perspective de l'ensemble des résultats obtenus. Dans cette discussion générale, les effets liés aux principaux facteurs de stress pris en compte, la salinité, les nanoproduits et les nanomatériaux seront revisités de manière transversale, en soulevant notamment de nouvelles questions de recherche. Les autres facteurs de stress seront finalement discutés avant de repositionner l'ensemble des travaux au sein des thématiques de l'évaluation du risque et des stress multiples.

Chapitre I : Contexte scientifique

Les recherches présentées dans ce document peuvent être abordées sous l'angle spécifique de l'écotoxicologie des nanoparticules. Néanmoins, l'originalité de la démarche adoptée ici est la prise en compte d'un second facteur de stress, la salinité des milieux, qui peut influencer à la fois le comportement des polluants et la physiologie des organismes.

A. Entrée des contaminants en milieu aquatique

Depuis que l'homme est présent sur Terre, l'ensemble des substances qu'il produit et utilise au niveau terrestre sont susceptibles d'avoir pour destination finale le compartiment aquatique. La révolution industrielle, plus particulièrement dans les années suivant la seconde guerre mondiale, a marqué le plein essor de la production mondiale dans de nombreux secteurs. La libération volontaire ou non de produits issus de l'industrie (aliments, vêtements, pâtes à papier, produits chimiques, ...), de l'agriculture (pesticides, engrais), de l'urbanisation (recouvrement des sols, rejets de produits ménagers...) ou encore du transport (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)...) est devenue une source de polluants pour l'écosystème aquatique. En effet, bien que les composés potentiellement toxiques soient introduits dans le milieu naturel de différentes manières (poussières, particules, vapeurs, gaz) et au sein de différents compartiments, ils sont susceptibles selon leur mobilité d'être entraînés vers le compartiment aquatique (Figure 1).

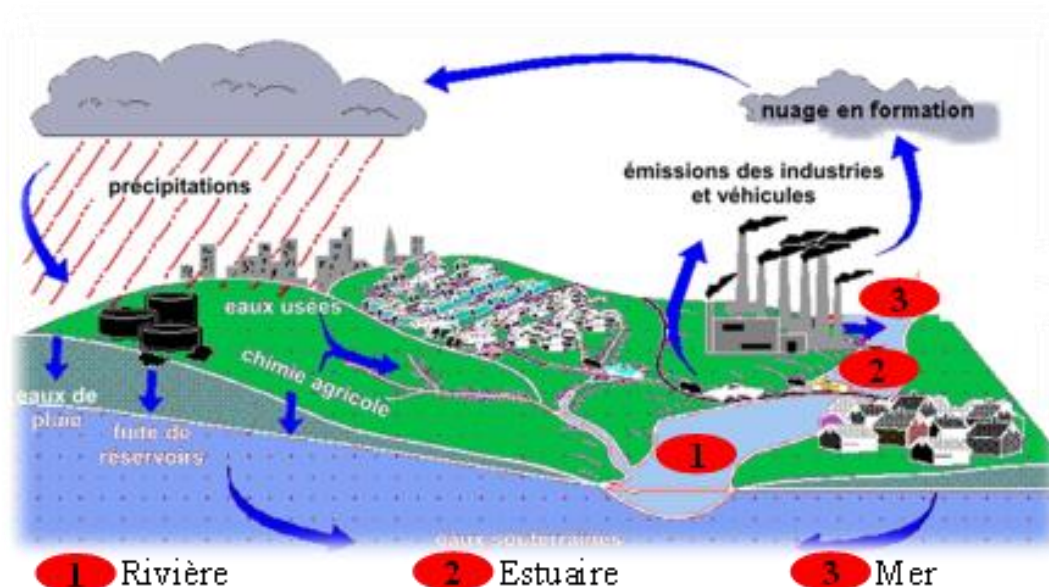


Figure 1 : Cycle des substances libérées dans l'écosystème aquatique (source : <http://accres.ens-lyon.fr/evolution/biodiversite/dossiers-thematiques/biosurveillance-et-bioindicateurs/cycle-pollution.jpg>).

Si ces composés sont volatils, ils seront libérés dans l'atmosphère et transportés par les vents sur l'ensemble de la planète. Les retombées de ces polluants atmosphériques sous forme sèche (sédimentation, adsorption, absorption, réaction chimique) ou humide (précipitations, neige, brouillard, grêle) atteindront les sols. Le lessivage des terres par la pluie, considéré comme étant le vecteur majeur du transport des polluants, entraîne le ruissellement des eaux chargées en substances potentiellement polluantes pour l'écosystème. La pollution aquatique peut ainsi être définie comme l'entrée de substances exogènes potentiellement dangereuses pour un ou plusieurs éléments constitutifs des écosystèmes continentaux et marins (Figure 2).

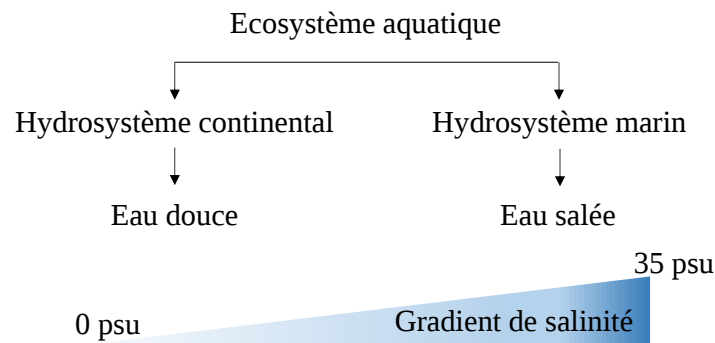


Figure 2 : Composant de l'écosystème aquatique.

L'entrée des polluants peut se faire en premier lieu dans l'hydrosystème continental. Celui-ci intègre d'une part le milieu lotique comprenant les eaux superficielles continentales qui s'écoulent de manière continue des ruisseaux aux fleuves et d'autre part le milieu lentique (ou limnique) auquel appartiennent les lacs, les étangs, les tourbières et les marais. En tenant compte de la topographie du site traversé par les eaux, les paramètres tels que la température, la pénétration des rayons solaires, le niveau d'oxygénation, la vitesse du courant ainsi que la quantité de matière en suspension structurent le biotope présent.

Dans un second temps, l'hydrosphère marine est également un réceptacle des contaminants comprenant les océans, les rivages marins (rocheux, sablonneux, coralliens), les estuaires et les marais salins. L'écosystème marin peut être divisé en trois grandes parties, selon différents critères, comprenant : l'éloignement de la côte, la profondeur de la colonne d'eau et les échanges entre les eaux superficielles et les fonds marins, définissant ainsi les zones néritique, pélagique et benthique (Covich et al., 2004). La **zone néritique** est définie de la côte à une profondeur de 300 m sous la surface de la mer. Cette partie subit de fortes variations, tels que le mouvement des marées, le changement de température, l'assèchement (au moment de la marée basse), l'exposition à l'air. Elle est constituée également d'éléments nutritifs en forte abondance, permettant ainsi d'accueillir une large diversité d'organismes biologiques.

La **zone pélagique**, nommée également « haute mer », est un espace contenant une très faible quantité d'éléments nutritifs. Elle s'étend, à la verticale, sur 3 sous-zones, l'épipélagique (eaux bien éclairées), la mésopélagique (eaux de pénombre) et la bathypélagique (eaux obscures). La **zone benthique**, quant à elle, est répartie en quatre groupes (Figure 3).

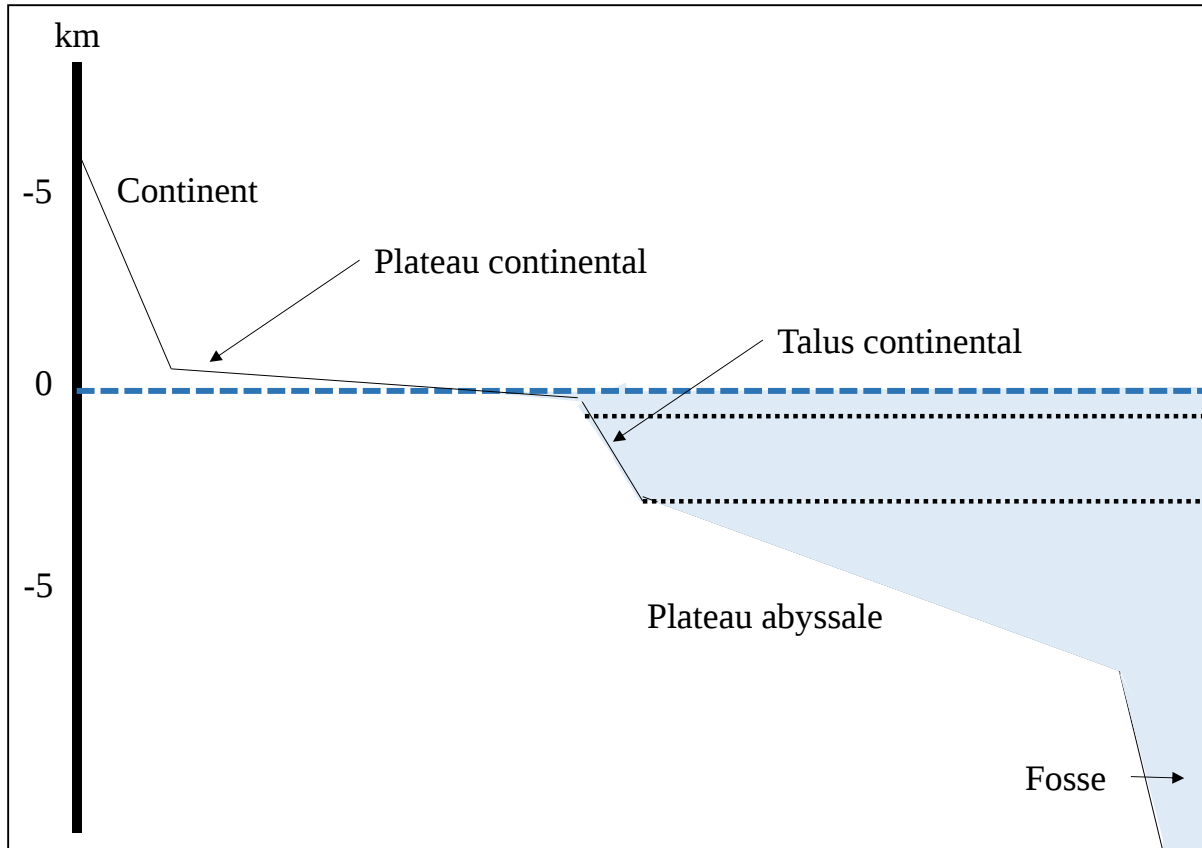


Figure 3 : Schéma de la zone benthique (adapté selon Pérez, 1975).

Le premier est la **zone littorale**, zone où la lumière est susceptible de permettre le développement d'une production primaire en bordure du continent. Le second comprend la zone **bathyale** aussi appelée « talus continental » qui se situe entre 200 m et 2000 m du littoral, correspondant à la pente dans la mer, entre le littoral et la zone abyssale, qui varie entre 1 et 5 degrés. Le troisième groupe est la zone **abyssale**, comprise entre 2000 m et 6000 m du continent, caractérisée comme la partie de la zone benthique située en dessous de la zone limite de la pénétration de la lumière. Enfin, le quatrième groupe est nommé zone **hadale** correspondant aux eaux situées à 6000 m et plus, à partir du littoral et définie par le terme de « fosses océaniques » où vivent des espèces extrémophiles (Raven et al., 2007).

La teneur en sels d'un milieu nommée salinité peut également être considérée comme un critère de classification des hydrosystèmes. La richesse d'un milieu aquatique en électrolytes (substances ou composés qui par dissolution en solution permettent la libération d'ions favorisant le passage du courant électrique) peut être extrêmement variable selon le site et le type d'électrolytes.

L'eau de mer peut contenir jusqu'à 90 ions principaux et ce quelle que soit la profondeur. Malgré la présence d'électrolytes dans les rivières, leurs eaux restent en moyenne 100 fois moins concentrées que les eaux marines (Tableau 1). Après avoir réalisé l'analyse chimique de 77 échantillons d'eau de mer prélevés à travers le monde, Dittmar (1885), a mis en évidence que les proportions des constituants sont sensiblement constants au niveau marin ce qui n'est pas le cas au niveau des eaux douces.

Tableau 1 : Composition ionique des eaux (rivière et mer en moyenne sur le globe) selon Schmidt-Nielsen (1997).

Ions (mmol.kg ⁻¹)	Eau de rivière	Eau de mer
sodium	0,39	475,4
magnésium	0,21	54,17
calcium	0,52	10,34
potassium	0,04	10,07
chlorure	0,23	554,4
sulfate	0,21	28,56
bicarbonate	0,11	2,37

Parmi ces ions, deux jouent un rôle particulier dans la définition des eaux à forte teneur en sels, le sodium et les chlorures. L'échelle Pratique de la Salinité 1978 (UNESCO/ICES/SCOR/IAPSO, 1981) a imposé une définition : « La salinité pratique (symbole S), d'un échantillon d'eau de mer, est définie en fonction du rapport K de la conductivité électrique de cet échantillon d'eau de mer à 15°C et à la pression atmosphérique normale (1013 hPa) et de celle d'une solution de chlorure de potassium dans laquelle la fraction en masse de KCl est 0,0324356, à la même température et à la même pression. Une valeur de K égale à 1 correspond par définition à une salinité pratique égale à 35 ». Ceci a permis d'établir la loi de Dittmar permettant de déterminer la salinité de l'échantillon d'eau (Wallace, 1974) par la simple mesure (i) d'un des constituants de l'eau de mer, tels que les chlorures ou le sodium ou (ii) d'un paramètre physique, à une température donnée (indice de réfraction ou conductivité). La technique la plus utilisée actuellement concernant la mesure de la conductivité est le dosage de la concentration, par la mesure du courant électrique, des ions qui traversent une solution exprimée en siemens par mètre (S.m⁻¹). Une table de conversion est disponible, qui en fonction de la température et de la conductivité mesurées, permet de déterminer la salinité définie en Practical Salinity Unit (psu).

B. Le cas particulier des estuaires

Le continuum eau douce-eau de mer est caractérisé par la zone estuarienne qui est en perpétuelle évolution. La salinité des estuaires peut atteindre des valeurs inférieures à 10 psu, à cause des mouvements progressifs de l'eau douce vers l'eau de mer. La zone estuarienne est le lieu du mélange entre l'eau douce transportée par le cours d'eau et l'eau salée qui est apportée au gré des marées (Pritchard, 1967). L'environnement estuarien est caractérisé par les fluctuations cycliques du rythme des marées (Willmer et al., 2004). Les aires estuariennes peuvent être constituées de vasières côtières, marais, et mangroves. L'estuaire est une zone très instable au niveau des paramètres abiotiques dont les plus variables sont la température, la dissolution de l'oxygène et la salinité (Freire et al., 2011).

A ce niveau, des stratifications de l'eau douce et de l'eau de mer peuvent être observées. L'eau douce, qui est d'une densité plus faible que l'eau de mer, reste en surface, alors que l'eau salée, plus dense, reste en profondeur, instaurant ainsi un système de stratification de l'estuaire en deux couches. La figure 4 met en évidence l'entrée de l'eau douce par le fleuve vers le milieu marin ; ce phénomène est permanent et constamment renouvelé (Frontier and Pichod-Viale, 1991).

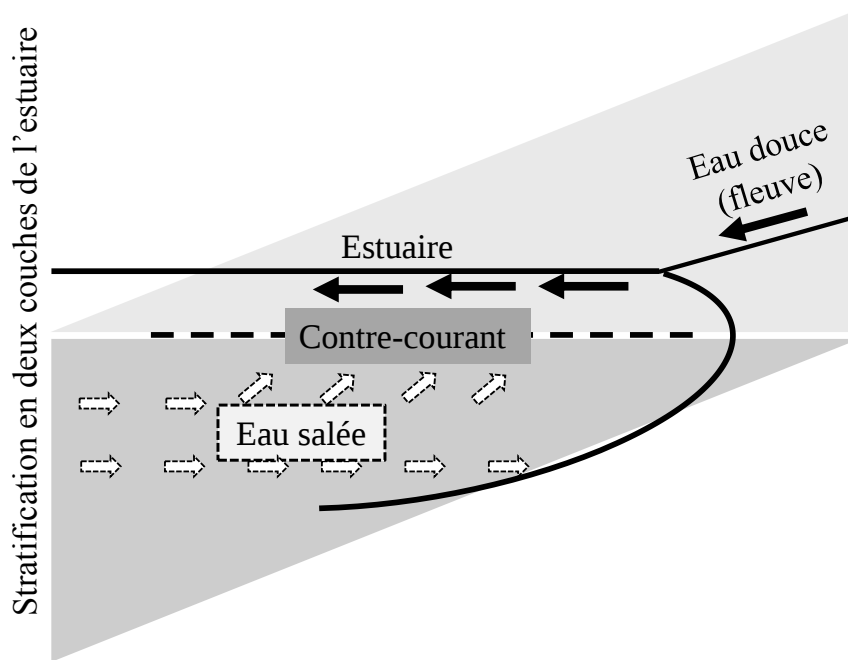


Figure 4 : Schéma de la circulation estuarienne à deux couches.

Les estuaires ont une superficie très restreinte à l'échelle du globe et présentent une faune peu diversifiée mais avec une densité élevée (Figure 5).

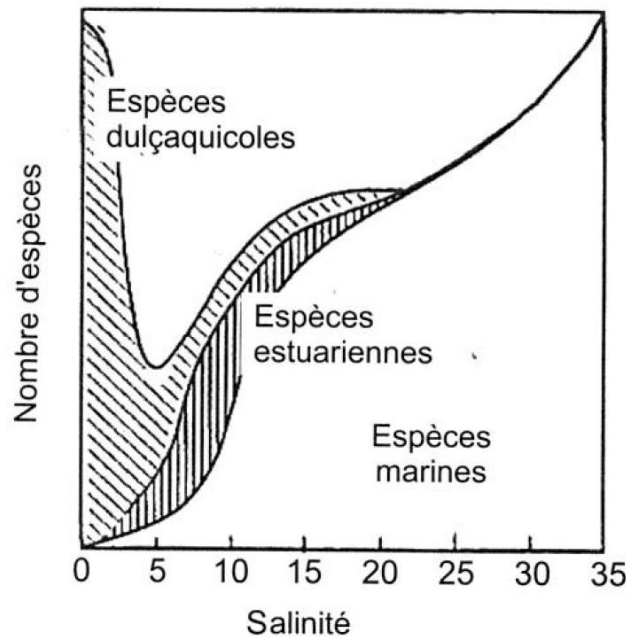


Figure 5 : Répartition des organismes benthiques dulçaquicoles (eau douce), marins et estuariens le long du gradient de salinité (Ducrotoy, 2010).

De plus, les estuaires sont souvent des zones de faible profondeur avec des apports nutritifs constants provenant de l'eau douce et du brassage continu du sédiment. Ces conditions sont la clé de la forte productivité primaire des estuaires (Ricklefs and Miller, 2005). Les estuaires sont donc des zones d'exploitation de la pêche d'espèces migratoires (civelle, anguille, truite, saumon) présentes à différents temps de l'année.

Cependant, la pression osmotique entre le milieu d'eau douce et marin n'est intermédiaire que dans la théorie. Dans les faits, elle est instable, ce qui a pour conséquence le développement de moyens de régulation des ratios internes chez les organismes vivant dans ces milieux. Les organismes vivant dans ces zones variables en paramètres abiotiques comme la salinité ont un métabolisme adapté aux changements rapides et continus du brassage des milieux. La capacité d'osmorégulation des organismes en milieu estuarien constitue l'une des facultés physiologiques primaires. En effet, les organismes bivalves et gastéropodes y vivant sont capables de vivre à de faibles salinités mais également de palier aux changements considérables de pression osmotique observés durant les marées. Pour étayer cette théorie, l'une des premières études a été menée par Beadle and Cragg (1940) sur quatre espèces de gammarus comprenant une espèce d'eau douce, une espèce estuarienne et deux espèces marines, afin de déterminer l'adaptation des crustacés marins au milieu d'eau douce.

Les résultats suggèrent que les organismes s'adaptent à la salinité selon deux étapes, comprenant premièrement le maintien des ions dans le sang à la concentration la plus proche des niveaux de l'eau de mer par assimilation active et par la suite à l'acquisition de tissus de tolérance aux faibles concentrations en ions et à la régulation des niveaux par l'urine. Ces mécanismes ne sont pas transposables à l'ensemble des espèces peuplant l'estuaire. En effet, les organismes tels que les bivalves sont des espèces dites euryhalines et eurythermes, c'est-à-dire qui peuvent respectivement supporter des variations de salinité et de température. Cependant, l'action des vagues, l'influence des UV, les risques de dessiccation dus à l'exposition à l'air sont importants pour les espèces exposées à la marée (Willmer et al., 2004). Durant les marées basses, les algues et les organismes aquatiques sont longuement exposés à l'absence d'eau de mer. Dans ce cas, ils sont soumis aux changements climatiques à l'échelle de la journée, comprenant aussi bien les fortes pluies que les rayonnements solaires intenses. Ces organismes peuvent également subir des conditions hypoxiques et jeûnent de manière intermittente. Dans ces conditions, certains organismes sont capables de s'enfouir dans le sable ou les substrats mous afin de réduire les effets du changement de milieu.

C. La salinisation des milieux

Les milieux aquatiques caractérisés par leurs différentes teneurs en sels sont soumis à de multiples pollutions mais ils sont également menacés par la salinisation des eaux due aux changements climatiques (Field et al., 2014). Les modifications futures des climats comprenant des phénomènes tels que des tempêtes et de fortes marées peuvent avoir des conséquences physiques sur les milieux aquatiques. L'interdépendance de ces phénomènes serait susceptible d'entraîner des submersions, des érosions et la salinisation des sols et des aquifères constituant ainsi les conséquences majeures de l'élévation du niveau de la mer (Dron et al., 2011). En effet, la salinisation progressive des sols peut entraîner de manière indirecte la modification des conditions d'équilibre écosystémique et induire la libération d'électrolytes le long du continuum eau douce-eau de mer. Par conséquent, l'ensemble de ces impacts limitera l'utilisation de l'eau, pour les usages domestiques, industriels ou agricoles. La salinisation des milieux est un grave problème dans de nombreux secteurs socio-économiques et environnementaux, notamment au regard de la grandeur du territoire maritime français (Beresford et al., 2001).

La salinisation des milieux peut avoir plusieurs origines. Si elles sont naturelles, on parle alors de **salinisation primaire**, tandis que la salinisation secondaire est caractérisée par des origines anthropiques, dite **salinisation secondaire** (Williams, 1987 in (Piscart, 2004)). Cependant, cette distinction en deux groupes n'empêche pas la combinaison de ces deux processus.

1. Salinisation primaire ou naturelle

La salinisation primaire est un processus naturel qui affecte les eaux et les sols. Le sel présent dans les milieux aquatiques peut avoir plusieurs origines. Premièrement, suite à l'évaporation de l'eau de mer, l'eau peut alors se charger en sels et être condensée dans les nuages puis se déposer au sol lors des pluies. Le ruissèlement des eaux entraîne l'entrée des sels dans les eaux de surfaces et ce depuis des milliers d'années. Deuxièmement, les différents électrolytes, tels que le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, les (bi)carbonates, les sulfates, les chlorures et les nitrates, peuvent avoir diverses origines, telles que la corrosion des roches au moment de la condensation de l'eau sur Terre ou suite aux éruptions volcaniques (Frontier and Pichod-Viale, 1991). En conséquence, l'eau, en s'écoulant d'amont en aval, entraîne ainsi les particules salines libérées suite aux processus géologiques (Salama et al., 1999).

La salinisation primaire et son impact sur les écosystèmes aquatiques sont souvent étudiés au niveau des régions semi-arides. On définit les zones semi-arides et arides comme des régions sèches dont la quantité annuelle de pluie est comprise entre 25 et 500 mm d'eau et où l'évapo(transpi)ration y est forte. Dans ces régions arides, la salinisation est considérée comme la menace la plus importante sur les ressources en eau (Williams, 2001). Ces régions présentent des pluies insuffisantes pour permettre la filtration des sels par le sol pouvant ainsi limiter la potabilité des eaux et l'utilisation des sols par l'homme.

L'eau douce a une salinité comprise entre 3 et 5 psu (Piscart et al., 2006) et présente une grande variation de concentrations en sels dépendante des conditions environnementales, comprenant la lithologie du bassin, la végétation, le climat (Meybeck and Helmer, 1989). La salinité moyenne de l'eau de mer est de 35 psu. Le constat le plus rémanent est que la salinité des eaux marines est restée très constante au cours des différentes périodes géologiques (Frontier and Pichod-Viale, 1991). Cependant, selon la mer étudiée, le gradient de salinité peut varier de 3,8 à 11,5 psu pour la Mer Baltique (Janssen et al., 2004) du fait des apports fluviaux et atteindre 40 psu dans la mer Rouge (Roder et al., 2013).

2. Salinisation secondaire ou anthropique

La salinisation secondaire est un problème mondial, particulièrement présent en Australie, en Amérique du Nord, en Afrique et au Moyen-Orient (Salama et al., 1999). L'Australie est très largement touchée avec près de 70 % des terres impactées par une forte teneur en sels (Kay et al., 2001). Comme précédemment définie, la salinité se réfère à la concentration totale en ions dissous.

Des mélanges différents d'ions ayant pour finalité la même salinité peuvent induire des effets biologiques différents et ces changements de salinité combinés aux autres changements de propriétés physico-chimiques de l'eau peuvent largement influencer les écosystèmes (Land & Water Australia et al., 2007). Il existe différentes voies de salinisation anthropique impliquant une large variété d'électrolytes.

a. Activités agricoles

L'apport d'engrais sur les terres cultivées participe à la salinisation non seulement des sols mais également des milieux aquatiques. En effet, le lessivage des sols par les eaux de pluies entraîne différents types d'ions et d'éléments nutritifs, tels que l'azote, le phosphore, la silice. Cette salinisation peut également s'accompagner d'une pollution de ces milieux aquatiques par des éléments traces métalliques contenus dans les fertilisants comme du fer, du manganèse, du cuivre, du cadmium, du zinc et du cobalt.

b. Activités industrielles

L'une des autres voies de contamination des eaux par le sel est l'industrialisation. (Meybeck and Helmer, 1989) ont mesuré dans le Rhin une forte concentration de chlorures de potassium passant de moins de 50 kg.s^{-1} à plus de 300 kg.s^{-1} . Cette contamination est issue des mines de potasse présentes en Alsace et en Lorraine ainsi que des activités industrielles diverses présentes le long du fleuve. Les conséquences de cet apport de chlorures peuvent être graves pour l'irrigation des terres et la production d'eau potable. Les carrières induisent l'augmentation de la composition en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} lors des prélèvements des roches. La libération de ces ions dans le milieu influence la dureté de l'eau.

c. Activités de transport

Plus récemment, les scientifiques se sont intéressés au transfert des sels provenant des fondants routiers appliqués en période hivernale pour faire fondre la glace, vers les milieux aquatiques (Lundmark, 2008). Les premiers essais utilisant le sel sous forme de granulés de chlorure de sodium ont commencé en 1938 aux États-Unis. L'utilisation s'est accrue aux États-Unis, passant de 5000 tonnes de sel en 1942, à 20 millions de tonnes de nos jours (Kelly et al., 2010). Bien que l'utilisation des fondants routiers ait permis une réduction des accidents de la route, elle a également participé à l'augmentation de la salinisation des cours d'eau (Löfgren, 2001).

d. Activités domestiques

L'usage domestique de l'eau, couplé à l'utilisation de produits détergents, peut augmenter la salinisation de l'eau douce. Le traitement incomplet des eaux usées peut augmenter la salinité des eaux en sortie de station d'épuration. Cette eau peut être directement utilisée pour l'irrigation ou envoyée de nouveau dans le réseau d'eau douce. L'ampleur de ce phénomène, lié à l'accroissement démographique prévu sur la planète pour les prochaines années, a pour conséquence l'augmentation des demandes en eau potable et en nourriture (Vengosh, 2014).

3. Conséquences écologiques

Comme cela vient d'être vu, la salinisation des milieux aquatiques est un problème environnemental mondial, qui, en plus d'être un enjeu économique, est une source d'impacts multiples sur la santé humaine (Vengosh, 2014) et les écosystèmes :

- Changement de la composition chimique des ressources en eau naturelle (rivières, lacs, eaux souterraines),
- Réduction de la biodiversité, entraînant l'augmentation des espèces supportant les variations de salinité (espèces euryhalines),
- Diminution de la capacité de fertilité du sol,
- Changement des conditions climatiques locales.

Les salinisations primaire ou secondaire des eaux requièrent la mise en place de mécanismes d'osmo-régulation chez les organismes subissant ces modifications. En effet, l'eau présente dans les organismes contient des mélanges riches en diverses molécules organiques et en ions. Ces complexes d'électrolytes permettent le maintien de la pression osmotique qui est définie comme le rapport du nombre de molécules dissoutes dans un volume de liquide. Les organismes d'eau douce ont besoin de maintenir la pression osmotique interne en fonction du milieu dans lequel ils vivent. Or, la concentration en sel du milieu impacte directement les organismes au niveau de leur pression osmotique. En effet, l'environnement où vivent les organismes présente une pression osmotique plus faible que la pression osmotique de l'organisme. Si la concentration en ions du milieu devient plus élevée que celle de l'organisme, deux scénarios sont possibles. Premièrement, l'organisme est capable de pallier le changement de salinité, c'est le cas des organismes osmo-conformes. Ces organismes dépensent de l'énergie, à raison de quelques pour cent du métabolisme total, afin d'adapter l'osmolarité des fluides circulant dans leur corps en fonction des concentrations en ions dissous dans le milieu. L'objectif étant de maintenir l'équilibre de la pression osmotique interne/externe.

Au contraire, les organismes osmo-régulateurs sont quant à eux capables de maintenir le niveau ionique constant dans le milieu interne en expulsant les ions contenus dans l'eau du milieu en concentration trop importante tout en conservant l'eau dans leurs cellules (Cañedo-Argüelles et al., 2013; Ricklefs and Miller, 2005).

Dans l'eau douce, la majorité des espèces sont osmo-régulatrices ; cependant, cette activité a un impact sur l'organisme. Le coût énergétique peut influencer la durée de vie de l'organisme et sa résistance. L'ensemble des organismes d'eau douce ne sont pas capables d'osmo-régulation. Les organismes ayant cette adaptation physiologique (coûteuse en énergie), pourront voir les contraintes biotiques s'accroître ou se relâcher selon le groupe trophique auquel ils appartiennent (Canedo-Argüelles et al., 2013). En effet, selon Piscart et collaborateurs (2006), l'augmentation de la salinité en eau douce (i) entraîne la diminution des espèces brouteuses et déshiqueteuses, (ii) favorise les prédateurs, les espèces filtrantes et celles réduisant la matière organique présente à l'interface entre la colonne d'eau et le sédiment et (iii) modifie le mode de reproduction. Dans leur revue, Zinchenko and Golovatyuk (2013) observent une grande tolérance des gastéropodes, et des mollusques en général, aux variations de salinité selon le site de l'étude. Piscart (2004) quant à lui montre dans son étude sur la Meurthe (rivière et sous-affluent du Rhin), la présence de plusieurs mollusques (*Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha*, *Planorbis corneus*, *Radix* sp., et *Physa* sp.) dans un milieu dont la salinité moyenne est élevée pour un milieu d'eau douce ($2,60 \pm 0,46$ g.L⁻¹). En dépit des changements abrupts de la salinité, quelques poissons sont capables de vivre dans les estuaires. Cependant de nombreuses autres espèces n'y séjournent que lors de leur développement (larves et organismes juvéniles).

4. L'induction de stress suite à la variation de la salinité

Des travaux ont été menés sur les variations de salinité induites par les marées et les stress oxydatifs générés dans les organismes vivant dans les estuaires (Lau et al., 2004 ; Zaccaron da Silva et al., 2005). Cependant, chez des organismes euryhalins exposés à des variations de salinité, des modifications de l'activité antioxydante telle que l'activité de la catalase ou de la superoxyde dismutase (SOD), suivie de la peroxydation lipidique traduisant le dépassement des mécanismes antioxydants ont été observées dans l'étude d'Abele et collaborateurs (2011). Verdelhos et collaborateurs (2014) ont étudié la mortalité et le taux de survie du mollusque bivalve *S. plana* durant 120h sur une échelle comprise entre 0 et 35 psu. Cette expérience a permis de mettre en évidence que son optimum de salinité se situait entre 20 et 30 psu. Cependant, durant cette expérience, aucune étude n'a été réalisée au niveau du stress oxydatif mesuré au niveau sub-individuel de l'organisme. Freire et collaborateurs (2011) soulignent le lien entre une forte salinité du milieu et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ayant pour conséquence des évolutions dans les dommages des protéines, mais aussi du matériel génétique.

D. Singularités des études le long du continuum aquatique eaux douces-eaux marines

L'étude des milieux salins est indispensable d'un point de vue social, économique, mais également dans le contexte de changements climatiques (Sereda et al., 2011). L'augmentation des températures, entraînant l'évaporation et l'évapotranspiration, couplée à la diminution des précipitations dans certaines régions du monde, permet de prédire l'augmentation importante des zones de salinisations secondaires. Les eaux douces apportent des éléments nutritifs et de la matière organique dans les estuaires mais durant le transfert d'amont en aval, l'eau se charge également en effluents contenant diverses familles de contaminants organiques et minéraux. De plus, elles transportent vers ces zones clés divers polluants émergents comme les composés pharmaceutiques et perfluorés, les microplastiques et les nanomatériaux (NM) pour lesquels l'évaluation du risque environnemental est actuellement une préoccupation majeure (Moore, 2006; Mueller and Nowack, 2008). Les produits introduits en milieu salin subissent alors des variations aux niveaux des propriétés physico-chimiques. Dans ce cadre, il est important d'évaluer les modifications des réponses de biomarqueurs du stress oxydatifs résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de ROS afin de mieux appréhender les changements dus aux paramètres biotiques et abiotiques.

E. Le nanomonde

1. Nanotechnologie, un enjeu de taille

L'infiniment petit a toujours fasciné l'homme. De tout temps, il a cherché à comprendre ses mécanismes en étudiant les constituants élémentaires de la vie. Cependant, le monde de l'infiniment petit est régi par des lois physiques complètement différentes de celle de l'environnement macroscopique. C'est pourquoi, durant des siècles, les scientifiques ont développé des théories en physique quantique afin de mieux appréhender le comportement des particules à cette échelle. De plus, la taille nanométrique est un milliard de fois plus petite que le mètre et comprend, à titre d'exemple, la molécule de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Figure 6). Feynman, prix Nobel de physique en 1965, fut l'un des pionniers dans l'étude de la matière à l'échelle atomique (0,1 nm). L'échelle nanométrique a été délimitée à une dimension comprise entre 1 à 100 nm.

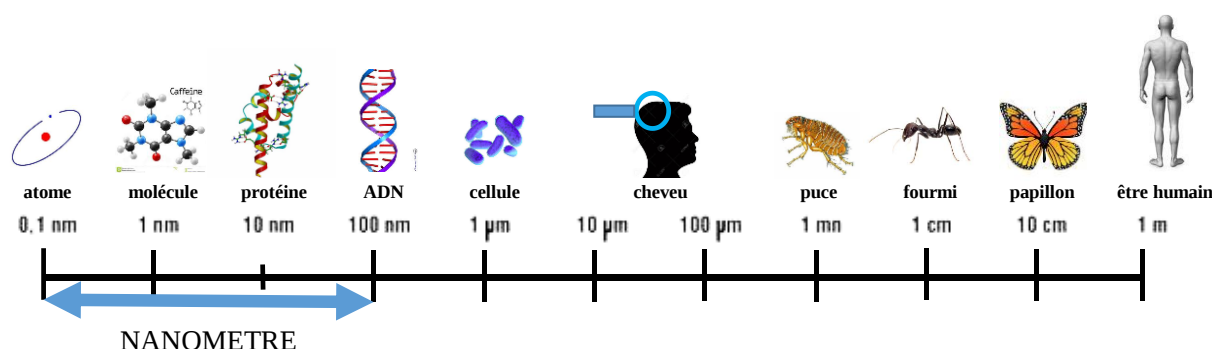


Figure 6 : Schématisation du mètre au nanomètre (Google images).

La miniaturisation des produits est, depuis toujours, considérée comme un argument de progrès. C'est dans ce contexte que sont apparues, dans les années 1990, les premières nanotechnologies, citées depuis comme étant la technologie phare du 21^{ème} siècle. Les nanotechnologies comprennent deux principaux domaines, la science et la technologie. Ils forment une discipline qui met en lumière des phénomènes particuliers dans la conception, la caractérisation, la production et l'application de matériels aux dimensions nanométriques. Cette technique est devenue indispensable pour de nombreux produits de consommation, dans divers secteurs tels que l'informatique et la communication (nanoélectronique ; (Allsopp et al., 2007)), les technologies de l'agro-alimentaire (consistance, goût, aspect ; (Weir et al., 2012)), de l'énergie (photovoltaïque, batterie électrique, pile à combustible ; (Yazami, 2014)), mais aussi le secteur médical (matériel chirurgical, consommables, prothèses, vecteurs thérapeutique ; (Nikalje, 2015)) et cosmétique (crèmes solaires, dentifrices ; (Pathak and Thassu, 2009)). Il est important également de mettre en évidence que les nanotechnologies peuvent être également utilisées en nano-remédiation des milieux aquatiques selon différents procédés (sorption, réactions redox, transformation photo-catalytique ; (Bardos et al., 2015)). Bien que la découverte de nouvelles propriétés des nanomatériaux manufacturés et leurs premières utilisations aient permis d'obtenir des avancées technologiques extraordinaires, il ne fait aucun doute que des nanomatériaux existaient depuis tout temps dans la nature (colloïdes).

2. Définition des nanotechnologies

Le préfixe « nano » représente le milliardième et est apposé pour mettre en évidence des changements de propriétés liés à la taille d'un matériau en comparaison à un matériaux de base ayant la même composition chimique (Rao et al., 2007). Bien évidemment, les propriétés des nanotechnologies sont spécifiques de leur taille mais également de certains caractères morphologiques notamment la dimension dans l'espace, la morphologie, la composition (interne et de surface), l'uniformité et les différents stades d'agglomérations. Les nanoplaques, les nanofibres et les nanoparticules sont définies comme des nano-objets (Organisation internationale de normalisation, 2015).

Les **nanomatériaux** ont été définis comme «un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (European Commission, 2011). Les nanomatériaux sont dits manufacturés lorsqu'ils incluent des processus d'ingénierie à l'échelle nanométrique et le contrôle de la matière (Health Canada, 2010). Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation (Anses), de l'environnement et du travail (2014), un **nanoproduit** est composé de nanomatériaux manufacturés. La Figure 7 reprend l'ensemble de la classification des termes utilisés en nanotechnologies.

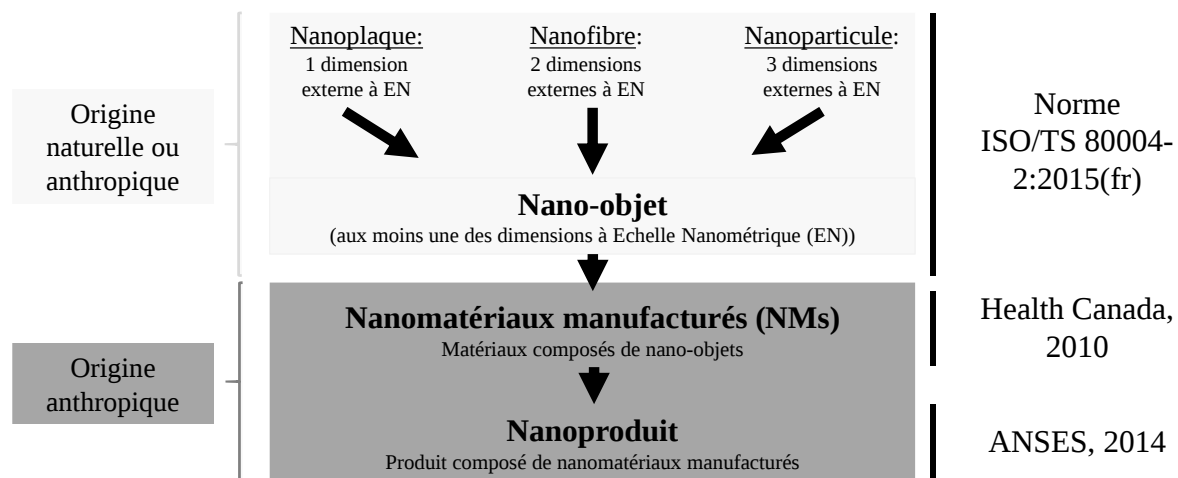


Figure 7 : Nomenclature des nanotechnologies selon l'Anses, (2014); Health Canada, (2010); Organisation internationale de normalisation,(2015).

Avec la diminution de la taille des particules, la surface spécifique augmente et par conséquent le nombre d'atomes de surface également (Figure 7).

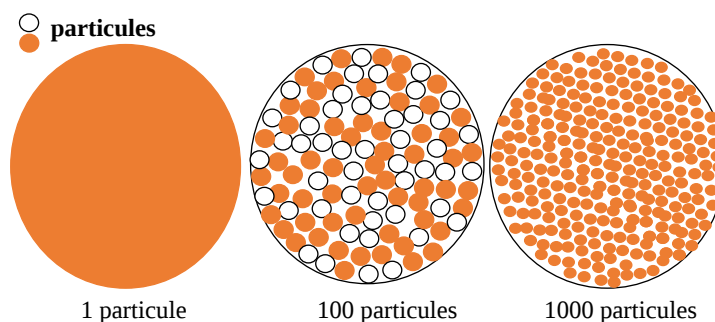


Figure 8 : Schématisation de la taille des particules selon la surface spécifique (adapté de Klaine et al., 2012).

Le nombre d'atomes de surface proportionnellement plus élevé que sur les mêmes particules de plus grande taille, confère une spécificité de surface ayant pour conséquence l'augmentation d'énergie libre à la surface des NM (Auffan et al., 2009). Dès lors que les études sont réalisées à l'échelle nanométrique, des variations de propriétés physiques des matériaux sont directement observées telles que la transparence du cuivre; l'enflamment de l'aluminium ou bien encore la liquéfaction de l'or à température ambiante (Baumann, 2014).

3. Origines des nanomatériaux

La classification des nanomatériaux peut également être réalisée comme présentée ci-dessus selon leur nature (naturelle ou anthropogénique) et leur mode de production (intentionnelle ou non). Les nanomatériaux naturels peuvent être retrouvés dans l'environnement sous forme d'embruns venant de la mer, de l'érosion des sols, de l'altération chimique, des feux, des éruptions volcaniques. Les nanomatériaux peuvent également être d'origine anthropique, soit de (i) source non intentionnelle, comprenant les produits de corrosions et de combustions, soit de (ii) source intentionnelle c'est-à-dire pour exploiter leurs propriétés dans différents secteurs (Buzea et al., 2007). Cette thèse sera uniquement axée sur les nanomatériaux manufacturés et les nanoproduits n'incluant ainsi que les NM d'origine anthropique.

Deux types de techniques sont utilisés pour synthétiser les NM manufacturés : bottom-up ou top-down (Figure 9). La première approche ascendante (bottom-up) se compose d'un assemblage d'atomes répartis de manière précise permettant de créer le nano-objet souhaité. Cette technique de fabrication est directement issue de l'industrie chimique. L'objectif à terme de cette méthode est de pouvoir produire des NM de manière reproductible et peu coûteuse (Ju-Nam and Lead, 2008).

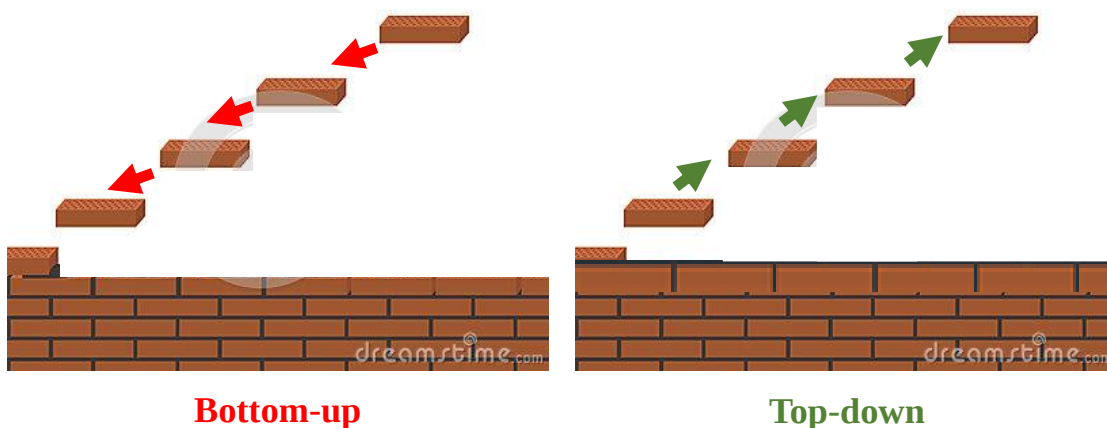


Figure 9 : Illustration des deux techniques de fabrication des nanomatériaux (Dreamstime, 2016).

La seconde approche descendante (Top-down) consiste à fragmenter une partie de la matière afin d'obtenir un nano-objet à partir d'un matériau brut contenant des atomes. Le déplacement des atomes peut être réalisé à l'aide d'un microscope à effet tunnel, qui permet de faire passer un courant électrique grâce à une pointe métallique extrêmement fine. La pointe se déplace à une distance en nanomètre du matériel à travailler et capte les électrons gravitant autour du noyau de l'atome étudié. Cette méthode permet de répéter des motifs en utilisant des techniques de lithographie (Borm et al., 2006).

Sept classes de NM sont définies selon Batley et ses collaborateurs (2011) :

- les NM d'oxyde de métal, comprenant le CeO_2 (dioxyde de cérium), TiO_2 (dioxyde de titane), ZnO (oxyde de zinc), FeO_2 (oxyde de fer), Al_2O_3 (oxyde d'aluminium), MgO (oxyde de magnésium), ZrO (manoxyde de zirconium), SnO (dioxyde d'étain).
- les NM à base de carbone, constitués de différentes formes sphériques, ellipsoïdes ou en tube. Ils sont utilisés dans de nombreux matériaux de construction, films et protections de surface, mais également dans les produits électroniques. Deux types de nanotubes de carbone sont possibles, les fullerènes (C_{60}) et les nanotubes de carbone (CNTs).
- les NM valence-zéro sont préparés selon la charge finale des NM par réduction des sels de métaux. Par exemple, le fer de valence zéro, est fabriqué à partir de la réduction de sels de Fe^{3+} ou Fe^{2+} avec une solution de borohydrure de sodium.
- Les éléments semi-conducteurs, points quantiques ou quantum dots, qui sont des nano-cristaux semi-conducteurs comprenant entre 100 et 1000 atomes, qui fluorescent quand ils sont excités par la lumière ce qui leur donne des qualités dans l'application biologique.
- Les dendrimères, qui sont complexes et constitués de polymères de fonctions multiples et de taille comprise entre 1 et 10 nm de diamètre. La fonctionnalisation de l'extrémité de la chaîne peut ainsi permettre son utilisation dans le cas de la catalyse. L'ensemble formé par trois dendrimères permet d'obtenir une cavité, ce NM est largement utilisé comme vecteur pour la libération de médicaments sur un site biologique particulier.
- Les émulsions comprennent par exemple le latex acrylique.
- Les nano-argiles, largement utilisées pour leurs propriétés non inflammables.

F. Nanotechnologies: enjeux socio-économiques et réglementaires

1. Enjeux socio- économiques

Nel et ses collaborateurs (2006) avançaient l'idée que les nanotechnologies seraient l'enjeu majeur de notre siècle allant jusqu'à dépasser l'époque de la révolution industrielle.

Durant ces dernières décennies, la découverte des différentes propriétés des NM a été présentée comme une véritable révolution et a entraîné l'augmentation de la production de nanomatériaux par les industriels. En France, l'accroissement de l'utilisation des NM manufacturés et des nanoproducts a permis l'emploi d'environ 3270 personnes dans l'industrie et près de 7000 personnes travaillant au sein des laboratoires de recherche (Gaffet, 2011). En 2011, près de 300 entreprises représentées à la hauteur de 60 % par des petites et moyennes entreprises (PME) (région parisienne, Lyon, Grenoble) travaillaient dans le secteur des nanotechnologies selon la Direction Générale de la Compétitivité de l'Industrie et des Services (DGCIS, 2011) (Figure 10).

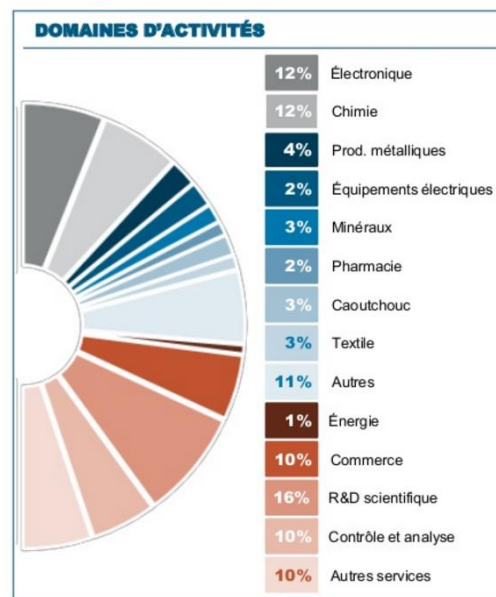


Figure 10 : Domaines d'activité des entreprises françaises dans le secteur des nanotechnologies (OFI asset management, 2016).

Selon le rapport de l'Anses (2014), en France, la production annuelle de NM est de plus de 100 000 tonnes et près de la totalité est sous forme de nanoparticules (dioxyde de titane, de silice et de dioxyde de cérium). Ce rapport relève l'absence suffisante de données pour les NM d'argent ou les nanotubes de carbone dans la liste des tonnages les plus utilisés par les industries françaises, ce qui semble très inattendu au regard de leur large utilisation dans de nombreux nanoproducts.

2. Niveau de la réglementation des NM

L'un des plus forts risques liés à l'utilisation des nanomatériaux et/ou nanoproducts concerne l'exposition des travailleurs dans la recherche et le développement des nanotechnologies (Singh, 2015). L'ensemble des industriels, associations et syndicats semble unanime sur l'obligation de réglementer les NM manufacturés.

Cependant, des normes auxquelles les nanomatériaux semblent pouvoir répondre existent tel que le règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques (REACH). Les principaux objectifs de ce règlement sont (i) de répertorier l'ensemble des substances chimiques mises et utilisées sur le marché suite à l'importation ou à la production en Europe de NM, (ii) d'augmenter les niveaux de protection de la santé et de l'environnement mais aussi (iii) d'accroître la compétitivité et l'innovation. Néanmoins, les NM entrent uniquement dans ce cadre du fait de leur composition en substances chimiques. Par ailleurs, le faible tonnage produit ou importé par les industriels ne leur permet pas d'atteindre le seuil (> 1 tonne / an) les obligeant à l'enregistrement dans REACH. Pourtant, du fait de l'importante réactivité de surface des nanomatériaux, il paraît important d'adapter le tonnage de manière spécifique à ces matériaux obtenus avec de nouvelles conditions technologiques. De plus, la réglementation REACH a été mise en place afin d'obliger tous les industriels à déposer un dossier incluant les dangers et risques des substances nouvelles qu'ils proposent sur le marché. Ceci n'est pas stipulé comme étant obligatoire lors de l'enregistrement des NM. En effet, les NM ne sont pas considérés comme de nouvelles substances, ce qui par conséquent permet aux industriels de s'affranchir des modalités telles que l'apport de données (éco) toxicologiques (Anses, 2014). Il en est de même pour les USA où l'agence de protection environnementale ne considère pas obligatoire l'entrée des NM dans l'inventaire des substances chimiques car ceux-ci comprennent des molécules communes à des substances chimiques déjà répertoriées (Singh, 2015).

G. Les NM manufacturés et les nanoproduits

1. Les NM manufacturés standardisés

L'utilisation accrue de certains NM a requis la mise en place de listes d'étude prioritaire de ces NM. Le centre de recherche de l'Union Européenne (JRC) a fourni un rapport scientifique qui définit la liste des NM les plus utilisés. Ainsi un inventaire des NM manufacturés les plus utilisés (et donc pouvant être retrouvés par la suite dans l'environnement) a été réalisée comprenant 13 NM : les nanotubes de carbone, les fullerènes, les dendrimères, les nano-argiles, les NM d'oxydes d'aluminium, d'argent, de titane, de cérium, de zinc, de silice, de fer et d'or (Roebben et al., 2013). Ces NM sont dits standardisés car ce sont des NM très largement caractérisés pour une ou plusieurs propriétés et accompagnés d'un certificat qui détaille l'ensemble des paramètres métrologiques contrôlés lors de la synthèse. En général, les tests d'écotoxicologie n'utilisent pas de substances certifiées de référence. Le but est donc de pouvoir déterminer l'impact des NM sur l'environnement à l'aide des Directives de Tests fournies par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) et à partir de critères (éco)toxicologiques pertinents (OECD, 2016).

Cette approche répond ainsi à une demande grandissante des agences de réglementations et des hautes instances politiques sur les nanotechnologies. En effet, l'état de l'art des études sur les NM a largement augmenté ces dernières décennies. Néanmoins, la détermination des possibles effets (éco) toxicologiques n'est pas facilement appréhendable à cause de la grande diversité des caractéristiques des NM incluant le revêtement de surface, la taille, la forme et la composition (Klein et al., 2011; Singh et al., 2014). Deux des 13 NM standardisés ont été étudiés dans cette thèse : les NM d'argent (NM-300K) et de dioxyde de cérium (NM-212).

2. Incorporation des NM aux nanoproduits

De nos jours, les nanomatériaux sont présents dans de nombreux produits de consommation, bien que le risque pour la santé humaine et l'environnement ne soit pas encore totalement évalué. Le Woodrow Wilson Institute (2013) dénombrait, en 2005, 54 nanoproduits tandis qu'en 2016, le nombre de produits contenant des NM est passé à 1827 (Nanotechproject, 2016) révélant le réel engouement pour les propriétés inédites issues de la taille nanométrique. La Figure 11 présente l'ensemble des catégories de produits de consommation contenant des nanomatériaux manufacturés.

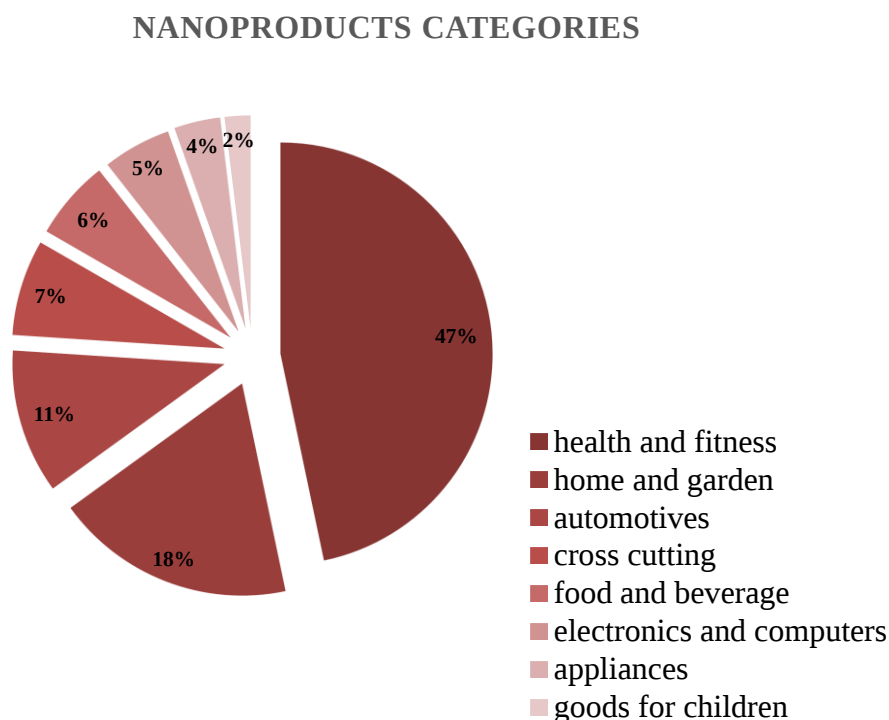


Figure 11 : Proportion des différentes catégories de nanoproduits, calculées à partir des informations de Nanotechproject (2016).

L'un des principaux domaines utilisant des nanomatériaux dans les produits de consommation est celui de la santé et du fitness, avec comme principale utilisation les nanomatériaux d'argent pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (Kim et al., 2007). Le dioxyde de titane est le second type de nanomatériau le plus incorporé aux produits commercialisés, notamment pour ses propriétés de barrière anti-ultraviolet et son fort indice de réfraction dans les crèmes solaires (Gupta and Tripathi, 2011). A titre d'exemple, les NM peuvent être trouvés dans de nombreux produits tels que les colorants alimentaires et les peintures, les surfaces autonettoyantes, les fibres et les isolants de hautes performances, les produits de catalyses et semi-conducteurs, les systèmes micro-électroniques ...

Dans cette thèse, deux types de nanoproducts constitués d'argent et d'oxyde de cérium ont été étudiés en parallèle deux de nanomatériaux NM-300K et NM-212 respectivement. Dans un premier temps, certaines expérimentations ont été menées sur le nanoproduct d'argent nommé pansement Acticoat™, développé par l'entreprise « Smith and Nephew Medical Limited » puis sur un nanoproduct utilisé comme additif d'huile de moteur diesel nommé Envirox™, produit par « Energenics Europe Limited » contenant des nanomatériaux d'oxyde de cérium (Figure 12).



Figure 12 : Nanoproducts étudiés dans cette thèse (A : pansement Acticoat™ ; B : additif d'huile de moteur Envirox™).

3. Le cas des NM et nanoproducts d'argent

a. Secteurs d'utilisation et mécanismes d'action

Les travaux de Keller et collaborateurs (2013) portant sur la modélisation de la production annuelle de nanomatériaux d'argent (AgNM) estiment que leur principale utilisation concerne le secteur médical (141 t/an) suivi de très près par leur incorporation dans les peintures, les pigments et les revêtements (104 t/an).

Les textiles et les cosmétiques (77 et 71 t/an respectivement) mais également la production d'emballages (36 t/an), de produits électroniques et optiques (23 t/an) semblent également largement utiliser l'AgNM.

L'argent est historiquement utilisé dans le secteur médical, cosmétique et textile comme agent antimicrobien et comme désinfectant (Likus et al., 2013). Le développement des techniques modernes, telles que les antibiotiques pour le traitement des maladies infectieuses, a contribué à réduire l'utilisation de l'argent dans les hôpitaux. Cependant, à l'échelle nanométrique, l'argent est de nouveau intégré aux nanoproducts. A titre d'exemple, des pansements contenant des nanocristaux d'argent (Acticoat™) sont appliqués sur les plaies durant quelques jours afin de permettre une meilleure cicatrisation en milieu aseptique (Reidy et al., 2013). Il est largement constaté que la forme la plus toxique de l'argent est la forme ionique Ag^+ (Ratte, 1999). Les mécanismes d'action présentés en figure 13 mettent en évidence que la libération des ions argent provenant des NM lors de leur maintien en milieu humide peut induire des impacts au niveau cellulaire. Une fois entrée dans la cellule, l'AgNM est libéré sous forme d'ions, ce qui lui confère ses propriétés bactéricides. L'argent ionique (Ag^+) présent dans la cellule entraîne (i) la destruction de la membrane, (ii) l'inactivation de la chaîne respiratoire, de protéines, du transport d'électrons et (iii) la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Chez les bactéries, l' Ag^+ inhibe la réplication de leur ADN (Wong and Liu, 2010).

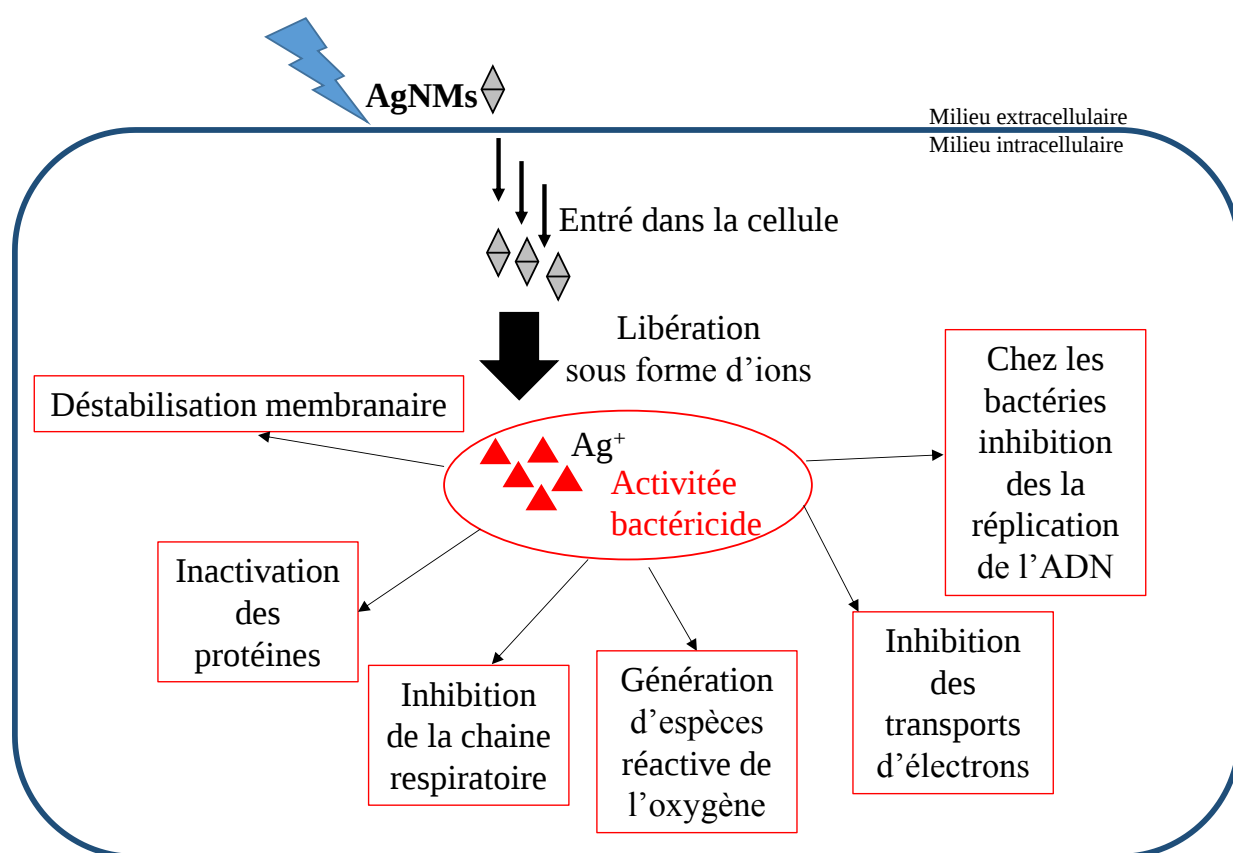


Figure 13 : Schématisation des modes d'actions des nanomatériaux d'argent adaptée selon Wong and Liu, (2010).

b. Rejets et devenir dans l'environnement

Au regard de l'augmentation croissante de l'utilisation de l'AgNM dans les différents secteurs précédemment cités, leur rejet potentiel dans le milieu est largement étudié. Une fois dans l'environnement, l'argent sous forme nanoparticulaire peut présenter des effets négatifs sur de nombreuses catégories d'organismes incluant les bactéries, les algues, les protistes, les (in)vertébrés (Fabrega et al., 2011). De plus, l'AgNM est principalement régi par les paramètres physico-chimiques des milieux dans lesquels il évolue.

Le mûrissement d'Ostwald dans le cas des AgNM, correspond au grossissement des particules grâce à un processus particulier. En effet, l'Ag⁰, en présence d'oxygène est oxydé en Ag⁺. La fraction dispersée est légèrement soluble dans la phase continue. Un transfert de matière est alors réalisé des petites particules vers les plus grosses, permettant ainsi d'augmenter la taille initiale des particules. La pression du milieu exercée sur les petites particules étant plus importante que sur les grosses, ces dernières diffusent des ions vers les particules plus grosses. La diffusion complète de la matière entraîne la disparition d'une petite particule pour la formation d'une particule plus grosse. Ce processus s'auto-ralentit lorsque le rayon moyen des particules dépasse environ 1-10 µm (Rondon, 2010).

Selon Chinnapongse et collaborateurs, (2011), la dispersion des nanoparticules libres d'argent dans le milieu est plus instable dans l'eau de mer, probablement à cause des phénomènes d'agglomération ou de sédimentation dans le milieu d'exposition (sulfures, chlorures). Dans les estuaires, les diagrammes de prédominance des formes de l'argent montrent la dominance des chloro-complexes ; AgCl⁰, AgCl₂⁻, AgCl₃⁻², AgCl₄⁻³ (Levard et al., 2013). Il est également attendu que dans un milieu riche en matière organique naturelle (MON), les AgNP soient adsorbées à la surface des MON (Chinnapongse et al., 2011). De plus, il apparaît que la toxicité est inversement proportionnelle à la salinité du milieu (Voyer et al., 1982) qui régit bien évidemment la spéciation.

En résumé, les études présentées ci-dessus indiquent que les AgNM ont le potentiel d'impacter plus particulièrement les eaux douces notamment la végétation aquatique et les animaux y vivant. De plus, l'argent est fortement dépendant de paramètres abiotiques comme la dureté de l'eau, le pH, l'alcalinité, la salinité et le carbone organique dissous (DOC) pouvant affecter la biodisponibilité des différentes espèces de l'argent. En effet, la salinité est connue pour réduire la biodisponibilité de l'ion argent dans l'eau limitant ainsi sa toxicité (Salieri, 2013).

4. Le cas des NM et nanoproduits de dioxyde de cérium

a. Secteurs d'utilisation et mécanismes d'action

Les travaux de Keller et collaborateurs (2013) portant sur la modélisation de la production annuelle de nanomatériaux de cérium (CeO_2NM) estime que la principale utilisation est observée dans le secteur électronique et optique (4500 t/an) suivie par l'utilisation dans les produits de catalyse (2500 t/an). Les revêtements de surface, les peintures et les pigments (1500 t/an respectivement) mais également la production dans le secteur de l'énergie et de l'environnement (1000 t/an), dans le secteur médical (500 t/an) semblent largement utiliser les CeO_2NM . Le cérium est un des éléments des terres rares les plus abondants. Selon de nombreux travaux, le CeO_2NM est défini comme étant insoluble dans l'eau (Singh et al., 2014). Il appartient à la famille des lanthanides et possède un fort potentiel réducteur. Les nanomatériaux de cérium (CeO_2NM) sont utilisés dans différents domaines pour leurs propriétés catalytiques, leur permettant d'augmenter la vitesse de la réaction chimique sans pour autant apparaître dans le bilan réactionnel. Ils sont également retrouvés dans les pots catalytiques (Batley et al., 2013a) et dans les protections pour le bois (Auffan et al., 2014a). L'utilisation principale du CeO_2NM comme additif dans les carburants diesel EnviroxTM testé comme nanoproduit dans cette thèse, permet d'améliorer la catalyse du diesel réduisant les gaz à effet de serre (CO_2) (Jung et al., 2005).

Le CeO_2NM peut être retrouvé à différents stades de valence (Ce^{3+} ou Ce^{4+}) selon la répartition des lacunes en oxygène présent dans leur structure conférant ainsi leur pouvoir catalyseur. L'activité auto-catalytique des CeO_2NM serait impliquée dans les mécanismes de prise en charge du stress oxydatif (Korsvik et al., 2007). Des études menées sur l'amphipode marin *Corophium volutator* exposé à la concentration 12,5 mg/L de nanoparticules de dioxyde de cérium ont mis en évidence l'absence d'effet sur la survie des organismes mais une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase, de la peroxidation lipidique et des cassures simples brins de l'ADN après 10 jours d'exposition (Dogra et al., 2016). En milieu d'eau douce, des tests ont été réalisés sur quatre organismes largement utilisés en test normalisé d'écotoxicologie comprenant des algues unicellulaires (*Pseudokirchneriella subcapitata*), deux types de crustacés (*Daphnia magna* et *Thamnocephalus platyurus*) et les embryons de poissons zèbre (*Danio rerio*). La toxicité chronique a été mise en évidence sur les algues à une concentration comprise entre 2,6 et 5,4 mg/L de CeO_2NM et sur *D. magna*. Cependant, aucune toxicité n'a été observée pour les embryons de poissons exposés aux CeO_2NM en milieu de d'exposition (Hoecke et al., 2009). En effet, les données portant sur la toxicité des CeO_2NM montrent des effets à des concentrations de l'ordre du mg/L très éloignées de celles pouvant être retrouvées dans l'environnement (ng/L).

Cependant, d'autres études ont porté sur les effets du CeO₂NM sur les algues d'eaux douces (*P. subcapitata*) mettant en évidence une plus grande toxicité des CeO₂NM en comparaison aux macro-particules (Batley et al., 2013b). L'étude menée par Auffan et collaborateurs (2013) montre le rôle de la mue dans la distribution de CeO₂NM sur *Daphnia pulex* après exposition à la concentration de 10 mg/L CeO₂NM. Les mécanismes de toxicité du CeO₂NM seraient donc essentiellement liés dans ce cas, à l'absorption/adsorption des CeO₂NM à la surface des organismes, réduisant alors leur capacité de déplacement ou d'assimilation des éléments nutritifs.

En résumé, l'abondante littérature sur la toxicité des CeO₂NM a permis de mettre en évidence deux modes principaux : rôle pro-oxydant ou antioxydant.

b. Comportement dans l'environnement

Le potentiel zêta de CeO₂NM serait influencé par le pH, la force ionique et la présence de matière organique. La forme prédominante dans les eaux naturelles (à pH 6,5 à 8,5) du cérium est CeO₂. Dans les eaux polluées, ou sujettes à de grandes variations abiotiques, le CeO₂ se dissout en Ce³⁺ (Zeyons, 2008). De plus, le potentiel de charge nulle du CeO₂NM dans l'eau est proche de 8. Le pH du milieu marin et estuarien est d'environ 8, de ce fait la charge de surface étant de zéro, l'agrégation des particules serait le plus vraisemblable (Auffan, 2007). Les études sur les interactions représentent l'enjeu principal. Cependant, il est indispensable d'acquérir préalablement des informations sur le comportement et le devenir des particules seules, en tenant compte des réelles difficultés des études sur des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental, de l'ordre du µg/L ou de µg/Kg. Le comportement des nanoparticules est largement régi par la présence de colloïdes naturels, formant ainsi des hétéro-agrégats. La difficulté de cette étude est basée sur la présence d'une forte concentration en NM en présence d'une faible concentration en colloïdes naturels, qui n'est pas mesurable actuellement par les appareils de mesure de taille des particules et des cinétiques d'agrégation (Baalousha *et al*, 2011).

5. Enjeux environnementaux

L'inventaire des nanoproducts est en évolution croissante et semble conduire de manière inévitable à l'augmentation des rejets de NM dans les différents compartiments environnementaux (air, eau, sol et biota). Comme le montre la Figure 14, les NM pourront être libérés dans l'environnement (air/ eau/ sol) aux différentes étapes de leur cycle de vie (A à F). Ces NM subiront alors des modifications de propriétés physico-chimiques pouvant entraîner des effets toxiques.

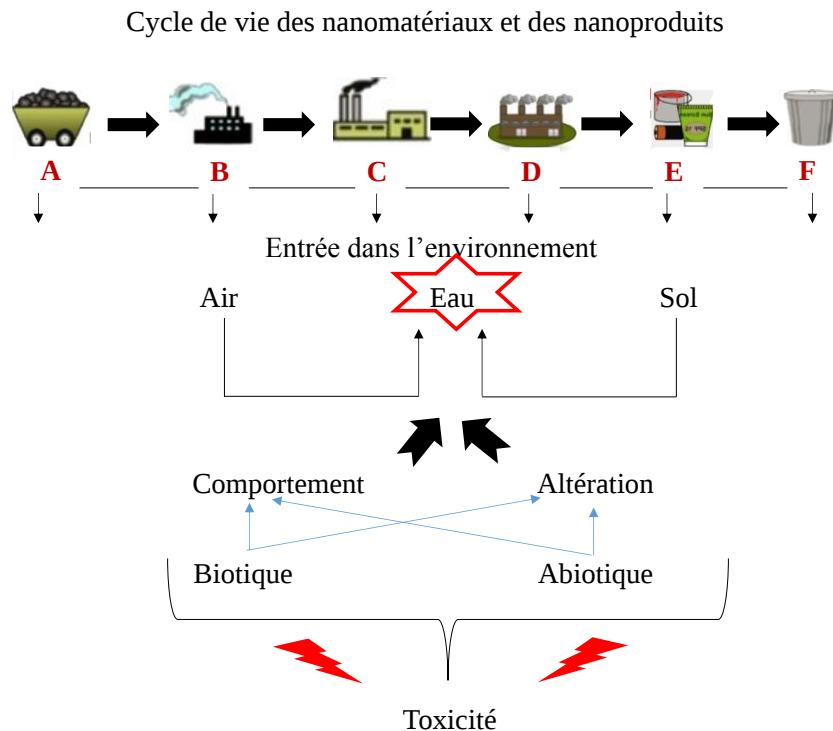


Figure 14 : Devenir des NM dans l'environnement (adapté selon Singh (2015)).

A : Extraction du composé, B : Production de NMs ; C : Formulation de NMs manufacturés ; D : Production de nanoproduit ; E : Utilisation du nanoproduit ; F : Résidus de dégradation.

En conséquent, une approche écotoxicologique en particulier dans les milieux aquatiques, est indispensable pour évaluer le comportement et le devenir des NM et nanoproduits au cours de leur cycle de vie (Klaine *et al.*, 2008). Au niveau des organismes, les NM peuvent être assimilés par les branchies et la surface épithéliale des organismes aquatiques ou encore entrer par voie directe (ingestion) ou trophique suite à l'alimentation des organismes avec une nourriture contaminée (Montes *et al.*, 2012).

Afin de comprendre le comportement et les effets des polluants contenant les NM à travers un gradient de salinité, des scénarios d'exposition faisant varier la salinité dans des conditions les plus réalistes d'un point de vue environnemental, sont développés dans le cadre du projet ANR NanoSALT dans lequel s'inscrit cette thèse.

Chapitre II : Démarche scientifique

La démarche a été développée sur le principe d'une complexification croissante des dispositifs d'exposition, en augmentant progressivement non seulement la taille et le nombre de compartiments des systèmes, mais aussi le nombre de facteurs de stress. Les outils de caractérisation physico-chimique des milieux, les espèces modèles et les réponses biologiques utilisées le long de ces gradients de complexité seront également décrits.

A. Complexité de l'exposition

L'environnement est constamment soumis à l'exposition à de nombreux stresseurs potentiels susceptibles d'avoir des effets sur les organismes qui s'y développent. L'écotoxicologie a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes d'exposition et les effets des contaminants sur ces organismes tout en tenant compte des possibles conséquences sur les écosystèmes. La complexification du milieu d'exposition est alors indispensable pour permettre d'approcher au mieux les conditions environnementales et ainsi permettre l'étude écotoxicologique dans des conditions les plus réalistes possible.

1. Exposition multi-stress : définition, concept

Dans un contexte de changements environnementaux multiples, les effets de différents paramètres abiotiques et biotiques peuvent être considérés et étudiés mais les réponses biologiques des organismes vivants ne peuvent pas être simplement considérées comme l'addition de réponses individuelles à chaque paramètre. Chacune des variations de ces facteurs est qualifiée de facteur de stress et lorsque de nombreux facteurs de stress sont simultanément testés ; le terme d'approche en « multi-stress » est employé. Cette approche peut être définie comme l'étude de différents scénarios considérant de multiples facteurs de stress pouvant être en interactions les uns avec les autres.

Cette thèse étudie les effets croisés de deux paramètres : les changements de salinité des milieux aquatiques et l'entrée des NM dans ces derniers, leur devenir et leurs effets biologiques. En effet, les changements de salinité des milieux peuvent entraîner des altérations particulières au niveau des NM. En retour, un stress supplémentaire induit par les NM peut amplifier les conséquences des variations de salinité du milieu et ainsi générer des phénomènes de stress de manière inattendue.

La mise en place de l'étude croisée de la salinité et de l'exposition des organismes à des NM a également été abordée en incluant les influences du régime alimentaire (présence ou absence d'algues), de la durée de l'exposition, à court (2 à 7 jours) et à plus long terme (jusqu'à 28 jours) et des espèces utilisées (*C. fluminea* ou *S. plana*).

La principale difficulté réside non seulement dans le concept d'exposition mais également la compréhension des mécanismes physico-chimiques et biologiques se produisant simultanément dans le milieu. De manière générale, il n'existe pas de méthodologie particulière permettant d'étudier un système complexe. La compréhension de l'approche en multi-stress implique toujours de s'approcher au plus près du milieu naturel en considérant des échelles spatio-temporelles représentatives du milieu étudié.

2. Outils mis en place pour étudier le multi-stress

Les tests d'écotoxicité peuvent être réalisés à différents niveaux de complexité. Le test de toxicité aiguë dit « test simple » est basée sur l'évaluation de paramètres simples comme la mortalité des organismes ou l'inhibition d'une fonction, en considérant la concentration de contaminant. Il permet alors de déterminer de nombreux paramètres tels que la concentration induisant 50 % de mortalité (CL50), ou inhibant 50 % de la croissance (CI50), ou encore la concentration à laquelle aucun effet n'est observé (NOEC).... Le même principe peut être appliqué sur une période plus longue (test de toxicité chronique). L'approche en multi-stress requière donc des tests au laboratoire ou en extérieur (incluant le milieu naturel) plus complexes. Les tests peuvent alors être définis selon la complexité physico-chimique et biologique comme étant des microcosmes ou des mésocosmes. De nombreuses définitions existent pour qualifier les études en micro et mésocosmes basées principalement selon le niveau trophique, la taille du milieu d'exposition et sa disposition (intérieur, extérieur, *in situ*). On peut également considérer les systèmes expérimentaux selon différents lieux d'exposition : au laboratoire (Auffan et al., 2014; Bour et al., 2015b; Garaud et al., 2016a), en milieu semi-ouvert (Buffet et al., 2014b; Cleveland et al., 2012) ou *in situ* (Khaksar et al., 2015).

Dans cette thèse, deux types d'échelles d'expériences ont été retenues comprenant l'approche en microcosmes et en mésocosmes. Ces deux approches avaient pour objectif d'une part de mieux comprendre les effets de chaque facteur de stress en complexifiant de plus en plus les milieux d'expérience (Tableau 2) et d'autre part de répondre à la problématique de l'évaluation du risque environnemental.

Le tableau 2 présente l'ensemble des conditions expérimentales testées durant cette thèse. La démarche était basée sur le développement de milieux expérimentaux progressivement de plus en plus complexes afin de mieux appréhender les réponses des organismes aux différents facteurs de stress que sont la salinité, les nanoproduits altérés ou non et les nanomatériaux standardisés, le temps d'exposition et le régime alimentaire.

- En effet, la première expérience réalisée en microcosme a permis de tester l'effet croisé du gradient de salinité, du régime alimentaire et du temps d'exposition sur les deux espèces.
- Dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental, les milieux des microcosmes ont été progressivement complexifiés par l'ajout de nanoproduits ou nanomatériaux standardisés.
- Par la suite, le réalisme environnemental de l'exposition a été augmenté et les expériences ont été menées à l'échelle du mésocosme d'eau douce ou marin en présence d'une source alimentaire d'algues unicellulaire et de sédiment afin d'étudier les effets croisés à moyen terme (7, 14, 21, 28 jours) de la salinité, de la contamination chronique des milieux par des nanoproduits à deux étapes clés de leur cycle de vie (avant et après utilisation) ou des nanomatériaux.

Tableau 2 : Ensemble des conditions expérimentales testées durant cette thèse.

Dispositif expérimental		Microcosme					Mésocosme	
Métal		Aucun		Argent			Dioxyde de cérium	
Espèces		<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>	<i>S. plana</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>
Salinités (psu)		1,5/15	30/15	30/15	1,5/15	30/15	1,5/15	30/15
Nanomatériaux				x	x	x	x	x
Nanoproduit					x	x	x	x
Nanoproduit vieilli							x	x
Nourriture	Non	x	x	x	x	x		
	Oui	x	x		x	x	x	x
Temps d'exposition	2	x	x					
	7	x	x	x	x	x	x	x
	14						x	x
	21						x	x
	28						x	x

De manière pratique, les expériences en microcosme menées durant cette thèse ont permis de réaliser des répliques des dispositifs expérimentaux en milieu simple (colonne d'eau uniquement). La figure 15 représente les expositions menées en microcosme (exposition à la colonne d'eau) selon quatre types de traitements (Contrôle, nanoproduits, NM-300K et solution de stabilisation des NM-300K).



Figure 15 : Dispositif d'exposition des organismes dans l'expérience menée sur les nanoproduits d'argent (pansement ActicoatTM).

Plusieurs études ont également été menées sur des dispositifs de type mésocosme d'eau douce développés préalablement à ces travaux de thèse durant le précédent programme ANR MESONNET (2010-2015). Lors de ce travail, des adaptations ont été réalisées afin de faciliter la récupération des organismes au sein du mésocosme aux différents pas de temps d'exposition (7, 14, 21 et 28 jours). En effet, les organismes étudiés étant endobenthiques, il a été nécessaire de confectionner des paniers dans lesquels étaient répartis les individus, permettant un échantillonnage générant le minimum de perturbation du milieu, en limitant notamment la remise en suspension du sédiment (Figure 16).



Figure 16 : Dispositifs expérimentaux en mésocosme d'eau douce.

La figure 17 permet de mettre en évidence les adaptations réalisées durant cette thèse pour permettre la reproduction des marées au sein des mésocosmes marins. Une unité expérimentale est composée d'un mésocosme où sont placés les organismes et un bac de rétention qui permet de récupérer l'eau circulante durant la mise en place de la marée basse mais également permettre le stockage de l'ensemble des sondes afin qu'elles soient toujours immergées. Ceci est régulé par la mise en place de minuteurs qui permettent d'activer automatiquement les pompes permettant de réaliser les marées hautes et basses à raison de deux cycles de 12h par jour.

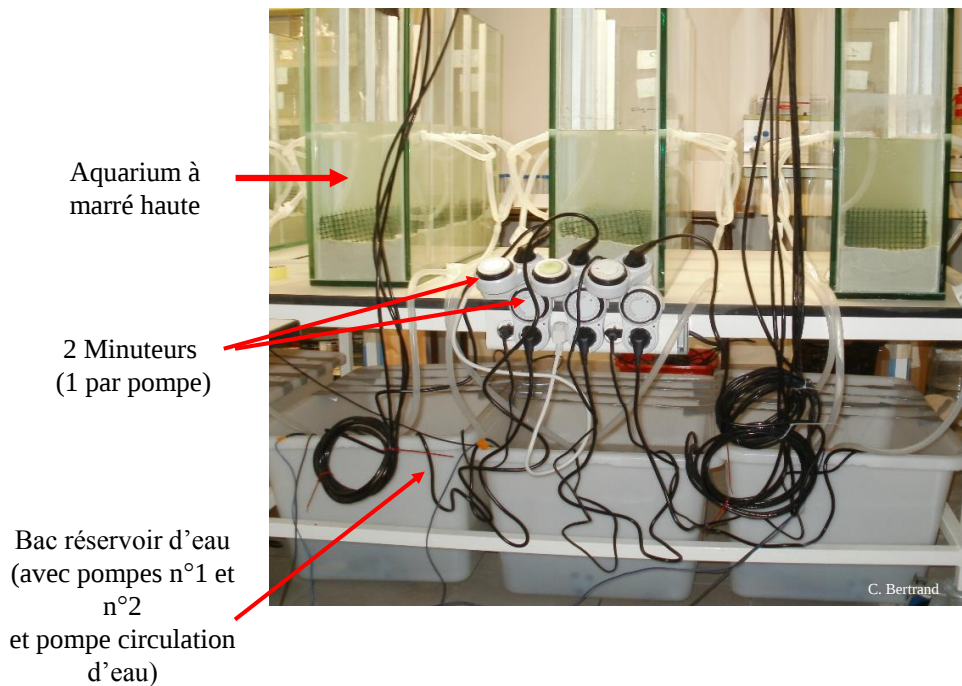


Figure 17 : Dispositifs expérimentaux des mésocosmes marins.

B. Modèles biologiques

Dans cette étude, deux bivalves endobenthiques ont été étudiés *Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana* appartenant respectivement aux milieux aquatiques d'eau douce et de zones estuariennes.

1. *Corbicula fluminea*

Corbicula fluminea, également appelée palourde asiatique, appartient à la classe des bivalves vivant à l'interface entre le sédiment et la colonne d'eau.

Embranchement : Mollusca

Classe : Bivalvia

Ordre : Eulamellibranchiata

Sous Ordre : Heterodonta

Super Famille : Corbiculacea

Famille : Corbiculidae

Genre : *Corbicula*

Espèce : *fluminea*



Corbicula fluminea

a. Répartition géographique et site de prélèvement

Avant la dernière période de glaciation (de -110000 à -10000 ans avant notre ère), *C. fluminea* était une espèce présente en Amérique du Nord, en Europe et sur le continent asiatique (Araujo et al., 1993). Les changements climatiques durant cette période glaciaire ont restreint la zone de répartition des Corbicules à l'Asie, et ceci, jusqu'au siècle dernier. Sa migration vers de nouveaux sites a ensuite été observée, en premier lieu, sur la côte Pacifique des États-Unis au début des années 1920 (Counts, 1981). Cette espèce est donc devenue invasive à partir du début du siècle dernier. Dans cette perspective, le choix du terme « d'invasion » ou de « recolonisation » du milieu est donc soulevé par la communauté scientifique (Pfenninger et al., 2002). Par conséquent, la présence de ces organismes à l'ère glaciaire et leur retour durant la dernière centaine d'années, met en évidence une possible évolution du climat ou des changements abiotiques de l'environnement. Ces changements seraient survenus de manière positive pour la recolonisation de certains espaces par cet organisme. Il est cependant indiscutable que l'homme a très largement contribué à cette nouvelle migration et/ou réimplantation des organismes.

Cependant, les mécanismes de recolonisation ou d'invasion dans le reste du globe ne sont pas réellement connus. L'hypothèse émise par les chercheurs, serait que les immigrants chinois auraient emporté les Corbicules comme mets dans d'autres parties du monde ou encore que ces organismes seraient arrivés de manière accidentelle suite aux transports de marchandises par bateaux. Depuis cette époque, son aire de répartition n'a cessé de s'étendre. Elle est donc retrouvée du Sud de l'Asie à la mer Méditerranée ainsi qu'au niveau des côtes africaines et à l'Est de l'Australie (Figure 18) (Kramer-Wilt, 2008). Les grandes variations de salinité comprises entre 0 et 22 psu (Evans et al., 1977) tolérées par cette espèce pourraient expliquer partiellement sa large distribution géographique.

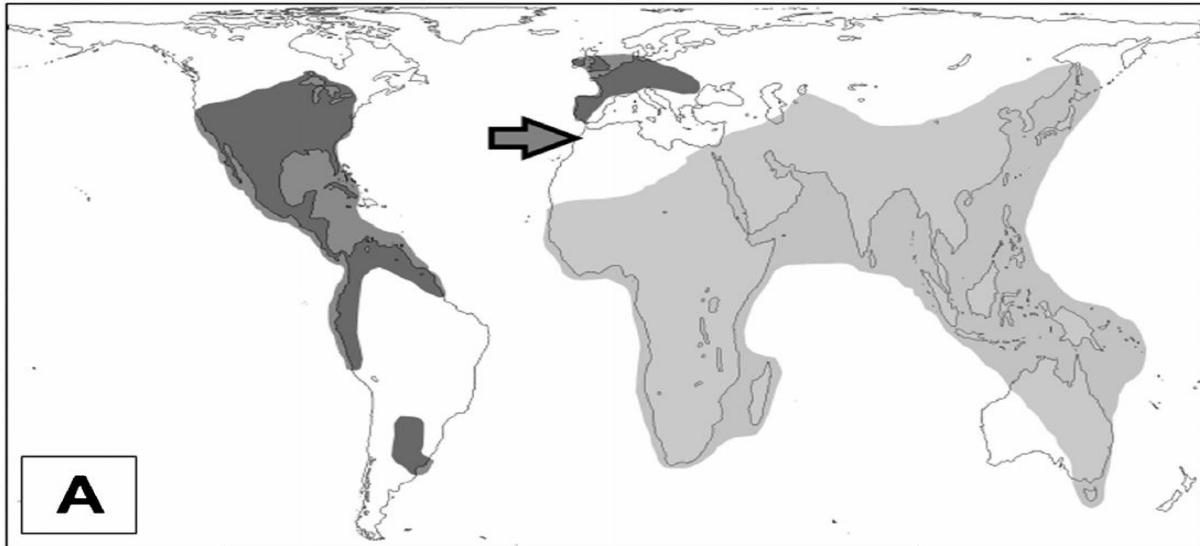


Figure 18 : Carte de l'aire de répartition du genre *Corbicula*, en gris les espèces natives et en noir les espèces introduites (Clavero et al., 2012).

De plus, l'augmentation du transport maritime (et donc du déballastage des bateaux), la commercialisation des produits de la mer (aquariophilie, fruits de mer, appâts vivants pour pêcheurs) tend à accroître ce phénomène d'introduction des *Corbicules* dans des milieux jusque-là vierges (Counts, 1981).

Toutefois, quelle que soit la définition retenue entre la recolonisation ou l'invasion, ceci n'élimine pas les impacts économiques et écologiques de l'introduction d'une nouvelle espèce dans l'écosystème. L'une des principales causes de dommages économiques engendrés par cet organisme est le biofouling. Il est défini comme étant la présence d'une grande quantité d'organismes vivants répartis en couche sur une surface artificielle en contact permanent ou fréquent avec l'eau. Ceci a donc pour conséquence de bloquer le passage et l'utilisation correcte de la surface envahie (Isom, 1986). Dans ce contexte, les structures bloquées par ces organismes sont alors moins efficaces, ce qui entraîne des répercussions économiques. Ce problème a un coût extrêmement élevé et concerne de nombreuses surfaces, telles que les canaux d'irrigations, les conduits, mais également les structures impliquées dans les captages d'eau réalisés pour la production d'énergie, les activités industrielles ou encore, l'alimentation en eau des populations humaines.

Dans cette étude, cette espèce d'eau douce a été échantillonnée sur la Moselle au site d'Argancy (Latitude 49° 19'48"58, Longitude 6° 19'81.11) (Figure 19).

Ce site est situé sur la Moselle en aval de la confluence avec deux rivières, tout d'abord la Meurthe (4300 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) proche de Nancy puis de la Seille (3000-3500 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) proche de Metz qui drainent des bassins de substrats riches en sels apportant ainsi à la Moselle des eaux déjà fortement minéralisées.

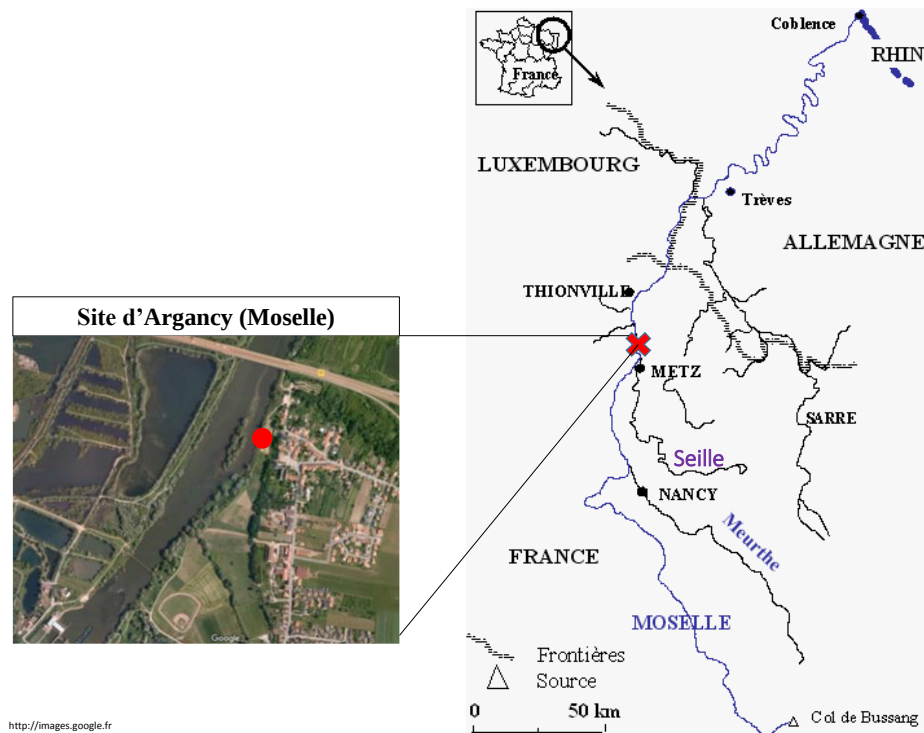


Figure 19 : Site de prélèvement de *C. fluminea*.

Selon le système d'information sur l'eau Rhin-Meuse (S.I.E.R.M), les paramètres écologiques et chimiques sont respectivement qualifiés de médiocre et bon. Cependant, le long du cours d'eau de la Moselle, la salinité croissante est liée à l'apport de chlorures d'origine anthropique et naturelle (Beisel et al., 2011). Les prélèvements ont eu lieu à différentes périodes de l'année (juin et septembre 2014). L'ensemble des valeurs de la température, pH et salinité mesurés lors des prélèvements des organismes a été indiqué dans chacun des manuscrits de publication.

b. Morphologie et anatomie *C. fluminea*

Selon Pfenninger et ses collaborateurs (2002), il existe de nombreuses espèces de Corbicules qui sont différenciées par leur morphologie, telles que la forme de la coquille, la couleur et la biologie de reproduction (Rajapogal et al., 2000; Renard et al., 2000; Sousa et al., 2008). Renard et ses collègues (2000) ont étudié les variations à l'échelle génétique et phylogénétique. La différenciation entre *C. fluminea* et *C. fluminalis* est effectuée à partir de la morphologie des stries à la surface de la coquille (Figure 20) (Araujo et al., 1993).

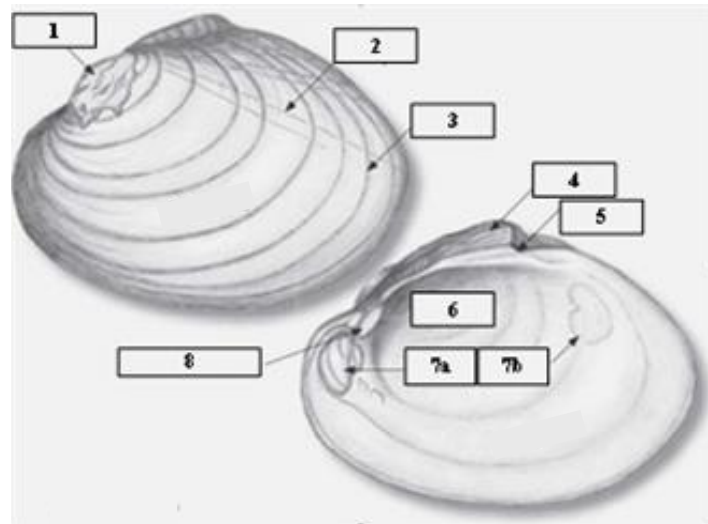


Figure 20 : Schéma de coquilles du genre *Corbicula*

1. Umbo, 2. Rainure de coquille, 3. Côtes d'accroissement, 4. Charnière de coquille, 5. Dents latérales, 6. Zone de cavité, 7a. Insertion du muscle adducteur antérieur, 7b. Insertion du muscle adducteur postérieur, 8. Dents cardinales. (Nedea et al., 2009).

Sa durée de vie est comprise entre deux et trois ans. Selon McMahon (2002), sa taille, qui correspond à la longueur de la coquille, est d'environ 25 mm à l'âge adulte, mais peut atteindre 50 à 60 mm. Elle est composée de carbonate de calcium et possède des arêtes concentriques. La coquille du bivalve a une couleur externe entre le jaune/vert/marron et une couleur interne bleuâtre à reflet nacré (Kramer-Wilt, 2008).

2. *Scrobicularia plana*

Scrobicularia plana est un bivalve endobenthique vivant à l'interface entre le sédiment et la colonne d'eau.

Embranchement : Mollusca

Classe : Bivalvia

Ordre : Veneroida

Sous Ordre : Heterodonta

Super Famille : Tellinoidea

Famille : Semelidae

Genre : *Scrobicula*

Espèce : *plana*



Scrobicularia plana

a. Répartition géographique et site de prélèvement

S. plana est présente sur les côtes maritimes et dans les estuaires ; elle tolère de grandes variations de la salinité comprises entre 20 et 30 psu (Verdelhos et al., 2015a). Elle vit dans le sédiment vaseux et sablonneux, riche en matière organique. Cette espèce présente une large distribution, dans la Mer du Nord, la Manche, la façade Atlantique (de la Norvège vers le Sénégal) et en Mer Méditerranée. Elle est présente dans une profondeur de sédiment d'environ vingt centimètres maximum (Inventaire national du patrimoine naturel, 2003).

Dans cette étude, cette espèce estuarienne a été échantillonnée dans la Baie de Bourgneuf (Latitude 1°59'04'80'', Longitude 47° 01'50.35'') (Figure 21).

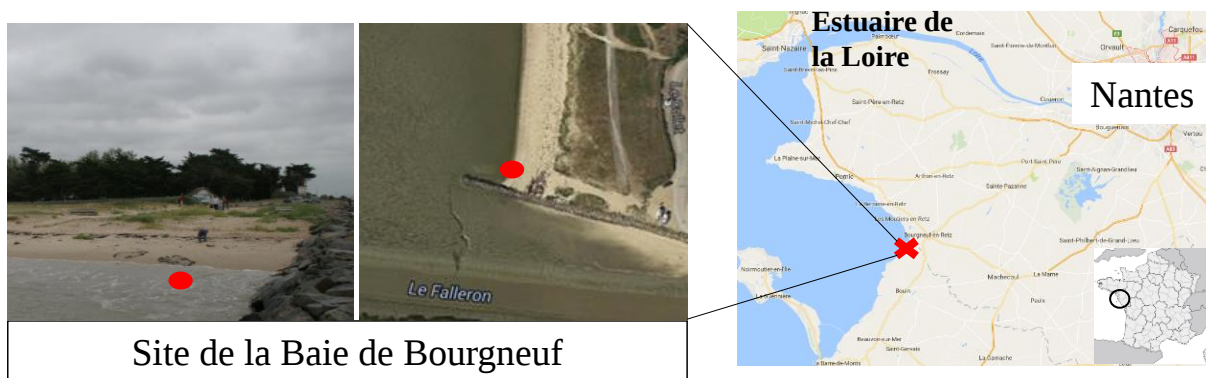


Figure 21 : Site de prélèvement *S. plana*.

Selon le dernier rapport des eaux du Marais Breton et du bassin versant de la Baie de Bourgneuf réalisé par le Schéma d'Aménagement et Gestion de l'Eau (SAGE), les données biologiques classent ce bassin dans un état moyen au niveau de la qualité écologique. Pour ce qui est des analyses physico-chimiques du site, elles montrent une légère altération de la qualité de l'eau (carbone organique dissous, oxygène dissous et phosphore) produit d'un léger impact anthropique (rejets humains, élevages) (SAGE du Marais et du bassin versant de la Baie de Bourgneuf and Observatoire de l'eau du bassin de la Baie de Bourgneuf, 2016). Le sédiment collecté dans la baie de Bourgneuf est classé comme relativement indemne de pollution selon le suivi de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). De même que pour l'espèce *C. fluminea*, différentes campagnes de prélèvements ont eu lieu à différentes périodes de l'année (février, juin 2014 et janvier 2015). L'ensemble des valeurs de la température, du pH et de la salinité mesurés lors des prélèvements des organismes a été indiqué dans chacun des manuscrits de publication.

b. Morphologie, anatomie de *S. plana*

S. plana possède une coquille ovale, mince et extrêmement fragile. La couleur de la coquille est blanche à grise et peut mesurer au maximum 65 mm de long. La morphologie de cet organisme met en évidence, à la surface de la coquille, des stries de croissance concentriques et fines. Sa durée de vie moyenne est de cinq ans (Sola, 1997).

Cet organisme appartient également à la classe des bivalves ; c'est pourquoi les organes constitutifs sont les mêmes que ceux de *C. fluminea* et seront donc développés par la suite.

L'une des spécificités de *S. plana* est la longueur des siphons qui peuvent atteindre une taille correspondant à six fois la taille de la coquille de l'organisme. En effet, l'organisme s'enfouit profondément dans le sédiment pour se nourrir. Il doit pouvoir recueillir à la surface du sédiment la matière organique, les algues unicellulaires et les bactéries dont il a besoin comme sources d'éléments nutritifs. Dans ce contexte, il est donc possible d'observer à la surface du sédiment des trous entourés de marques en forme d'étoiles formés par les siphons de *S. plana* (Figure 22). Elle est ubiquiste des environnements estuariens ; néanmoins une grande variation de densité peut être observée allant de quelques individus à des milliers au m² (Sola, 1997).

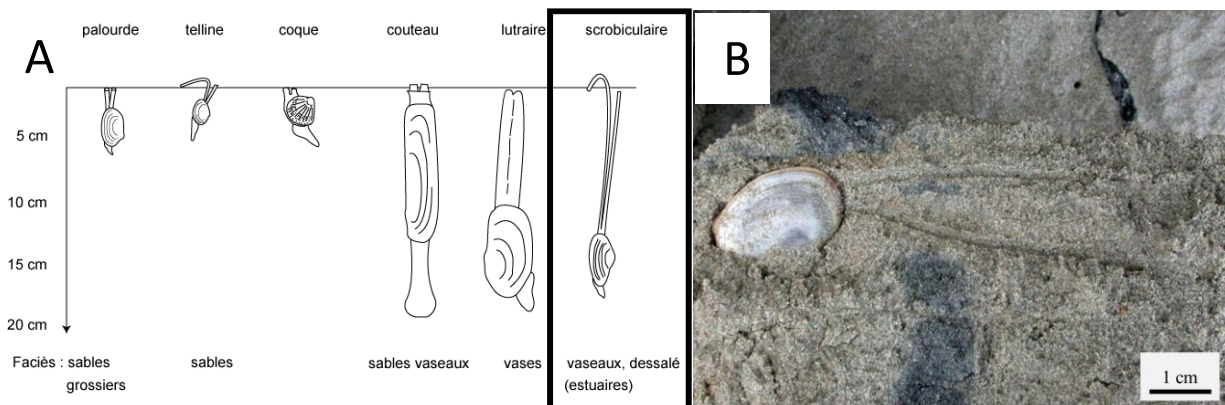


Figure 22 : A. Comparaison de la taille des organismes de milieux marins en fonction de la taille des siphons (http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/cotes/c_basses2.htm, consulté le 25/06/2015), B. photographie de *S. plana* et trace des siphons en surface de sédiment (googleimage).

3. Physiologie des bivalves

C. fluminea et *S. plana* sont tous les deux des bivalves, c'est pourquoi la physiologie des deux organismes sera ici développée conjointement à l'exception du mode de reproduction.

Leur organisme est constitué d'un corps mou maintenu dans une coquille, comme l'ensemble des bivalves. La coquille est recouverte de périostacum, comme de nombreux organismes aquatiques, afin de les protéger de la dissolution dans les eaux acides. La formation de la coquille est assurée par le manteau.

Les bivalves maintiennent l'ensemble de leurs tissus isolés du milieu dans la coquille grâce à la présence de deux muscles antérieurs et postérieurs adducteurs et rétracteurs du pied permettant de fermer la coquille (Figure 23).

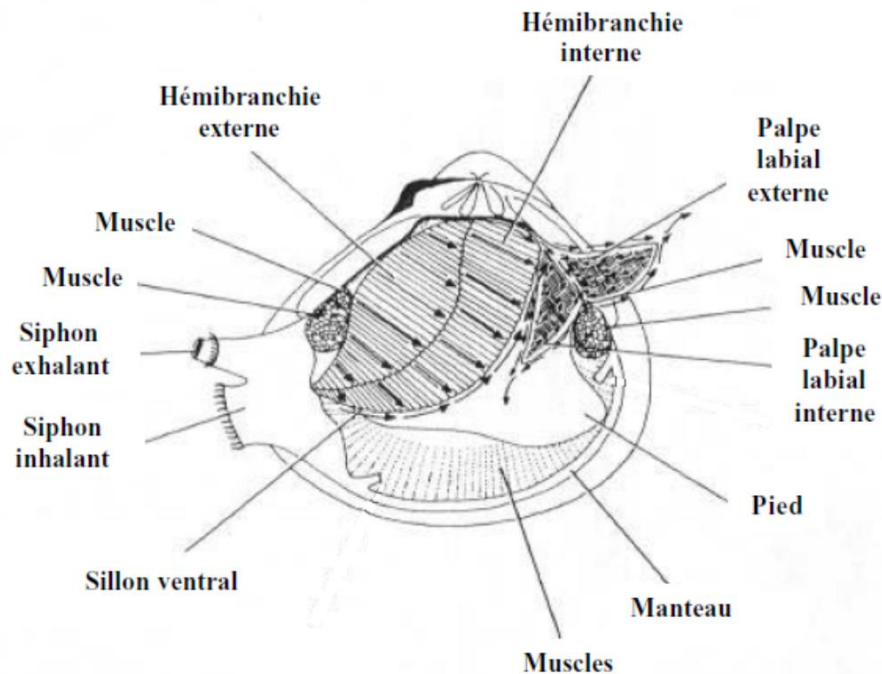


Figure 23 : Exemple d'une coupe longitudinale d'un bivalve, *Corbicula fluminea* (Vidal, 2001)

Le pied est un muscle qui permet l'enfouissement de l'organisme dans le sédiment, et ne laisse dépasser que les deux siphons en surface (Britton et Morton, 1979). De plus, le pied est un tissu d'aspect spongieux qui contient la majeure partie du liquide dans lequel baignent les tissus : l'hémocœle.

Le bivalve est constitué d'un manteau maintenant l'ensemble des tissus dans la partie interne de la coquille. Le corps mou est constamment maintenu dans l'eau. Le manteau assure la formation de la coquille et donne naissance, à son extrémité, aux siphons.

Les deux siphons (inhalant et exhalant) sont visibles au niveau de la partie post-latérale du manteau. L'eau entre par le siphon inhalant, circule dans la cavité palléale, traverse les branchies (cténidies) par les pores filamenteux. Les deux cténidies sont repliées sur le reste des tissus mous. Leur rôle est important dans la capture des éléments nutritifs en piégeant les particules de taille maximale de l'ordre du micromètre (algues unicellulaires, le phytoplancton, les bactéries et la matière organique). Elles sont également indispensables dans les échanges gazeux (diffusion de l'oxygène présent dans l'eau vers le système circulatoire). L'eau continue de circuler entre les cavités entrant dans la partie supra-branchiale où sont présentes les hémibranchies. Suite à cette circulation dans l'organisme, l'eau est expulsée par le siphon exhalant.

L'entrée de l'eau entraîne le battement des cils latéraux situés sur les branchies. La fermeture des valves a pour conséquence la fermeture de la circulation et donc l'isolement de l'organisme du milieu extérieur.

4. Régime alimentaire des deux espèces

L'eau transporte des particules comprenant de la matière organique, des bactéries, des algues unicellulaires et du phytoplancton. *S. plana* filtre le milieu dans lequel elle vit au rythme des marées. En effet, *S. plana* est capable de se nourrir de matière en suspension lors des marées hautes (régime suspensivore) et de particules à la surface du sédiment, constituant le biofilm, lors des marées basses (déposivore). *C. fluminea* n'est pas confrontée à la marée mais est également suspensivore.

Suite à la circulation de l'eau dans l'organisme, les particules arrivent dans les héli-branchies et les cils à la surface des filaments. Des cils sont également présents à la surface du pied. Dans les zones où le sédiment est riche en ressources nutritives, le pied peut donc permettre le cheminement des éléments vers les palpes labiaux (Way et al., 1990). Cette zone est le lieu de la sécrétion du mucus qui a pour rôle de permettre le tri des particules assimilables par l'organisme. Chez *S. plana*, les particules comprises entre 4 à 40 μm sont facilement assimilables (Hughes, 1969) tandis que chez *C. fluminea*, l'alimentation filtrée ne peut dépasser une taille maximale de 20-25 μm (Boltovskoy et al., 1995). Les palpes labiaux sont reliés aux branchies et à la bouche ; ils permettent la pénétration des petites particules dans le sillon ventral des héli-branchies et le rejet des grosses particules dans la cavité du manteau. Parmi les petites particules dirigées dans les héli-branchies, seuls les éléments nutritifs seront ingérés par la bouche. Les particules nutritives sont conduites de la bouche vers l'œsophage, puis de l'estomac à la glande digestive permettant l'assimilation des nutriments. L'estomac est le lieu de tri des éléments ; d'une part les petites particules sont absorbées, les autres sont dirigées vers l'intestin qui est intimement lié au pied de l'organisme. Le stylet cristallin, composé de mucopolysaccharides et d'enzymes, a pour rôle d'assurer la digestion des particules tout en les broyant. Après cette étape, l'ensemble des éléments de dégradation et non-assimilés sont conduits de l'intestin au rectum puis à l'anus qui communique avec le siphon exhalant, déversant ainsi les fèces (déchets azotés et autres) à l'extérieur de l'organisme (Britton et Morton, 1982). L'ensemble des particules non-utilisables provenant de la cavité du manteau sera également dirigé vers le siphon exhalant afin de les rejeter dans le milieu extérieur sous forme de pseudo-fèces (Morton, 1982).

5. Place des deux espèces dans le réseau trophique

Ces deux espèces s'enfouissent dans le sédiment afin d'être à l'abri des prédateurs. Il est important de souligner que suite à ce mécanisme ces organismes sont faiblement prédatés.

En effet, en milieu marin, l'huître pie (*Haematopus ostralegus*), principal prédateur des *S. plana* avec l'homme, est responsable d'un faible pourcentage de la mortalité de ce bivalve. Quelques poissons et crabes peuvent aussi se nourrir de *S. plana*. En eau douce, l'espèce *C. fluminea* est très faiblement prédatée. Cependant, les zones riches en *C. fluminea* sont également souvent remplies de coquilles vides de cet organisme.

6. Cycle de vie des deux espèces

C. fluminea est une espèce hermaphrodite. Les gonades recouvrent la glande digestive. Dans les premiers stades du développement, les organismes se différencient et commencent le développement de l'ovogénèse, comprenant le développement des follicules ovariens. En parallèle au développement du système ovarien, la spermatogénèse se met en place formant ainsi les tubes séminifères. Les organismes sont donc composés des deux appareils reproducteurs. Suite à la maturation du système reproducteur, les organismes sont capables de se reproduire, soit par ovogénèse durant l'année entière (ralentissement en période hivernale), soit par spermatogénèse selon les saisons, en fonction des variations de température (au printemps et en automne). La figure 24 illustre le cycle de vie de *C. fluminea*.

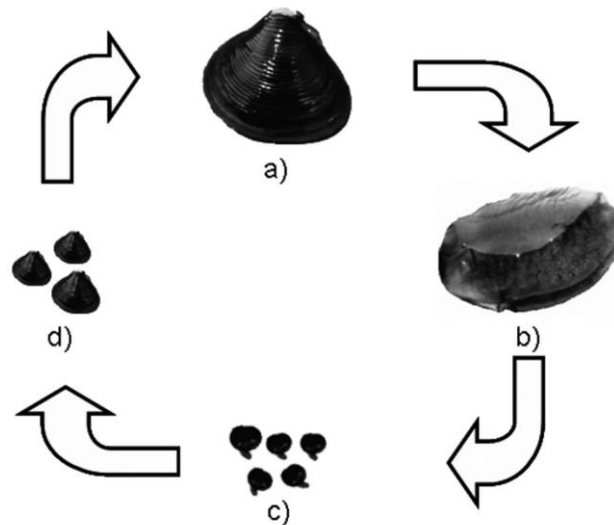


Figure 24 : Schéma représentant le cycle de vie de *C. fluminea*

a) organisme adulte, b) larves contenue dans le système branchiale, c) organismes juvéniles en présence de pieds, d) organismes adultes.

Lors des périodes de reproduction, les spermatozoïdes sont libérés par les gonopores; ils cheminent par la chambre supra-branchiale et sont expulsés par le siphon exhalant. Ils sont alors capables de féconder un autre bivalve, en pénétrant dans la chambre infra-branchiale.

Toutefois, les organes reproducteurs mâles et femelles sont fortement liés ; ceci entraîne parfois des phénomènes d'autofécondation. Après la fécondation, les œufs, sphériques et riches en éléments nutritifs, sont incubés dans les branchies durant une à deux semaines. Les larves sont stockées dans les branchies jusqu'au stade juvénile atteignant une taille d'environ 250 μm (Morton, 1982). Par la suite, les juvéniles sont libérés dans le milieu, ils sont déjà constitués d'une coquille et l'ensemble des tissus mous sont présents.

A la différence de la corbicule, *S. plana* est une espèce gonochorique. Les individus comportent donc des sexes séparés et la fécondation se fait de manière externe après libération des gamètes dans le milieu aquatique. Chez cette espèce aussi, les facteurs environnementaux (température, ensoleillement, source alimentaire) influencent le déclenchement de la maturation des gamètes et de la ponte (Santos et al., 2011). Dans le cas de *S. plana*, les seuils de température pour la reproduction des mâles sont plus faibles que ceux exigés par les femelles (Hughes, 1970). Les différents stades du cycle de vie *S. plana* sont présentés sur la figure 25.

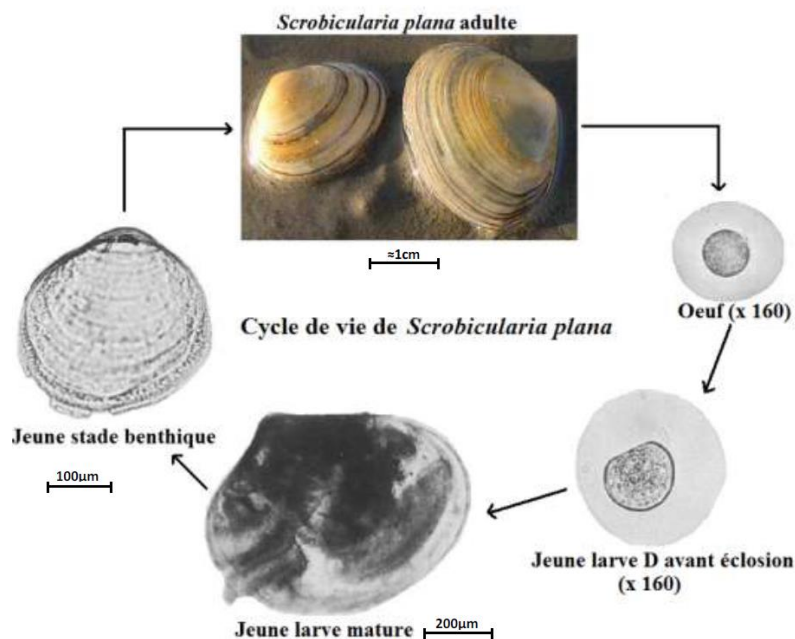


Figure 25 : Illustration du cycle de vie de *S. plana* (Fossi-Tankoua, 2011)

En France, le cycle de reproduction a été défini (Mouneyrac et al., 2008) et comporte une période de ponte s'étalant généralement de mai à juillet suivi d'un temps de repos sexuel pouvant aller de novembre à janvier. Les larves éclosent au bout de 72 à 96 h post fécondation. Les larves véligères développent un vélum qui leur permet de nager et de se nourrir pendant une phase de vie planctonique qui dure environ 3 semaines. Après cette période, la formation du pied permet aux organismes d'alterner entre la phase nageuse et le déplacement sur le sédiment.

La poursuite de leur développement est possible lorsque le substat est favorable, auquel cas elles se sédentarisent (Frenkiel et Mouëza, 1979). Selon les conditions du milieu, la maturité sexuelle est atteinte à partir de 2 à 3 ans ce qui correspond à une longueur de coquille d'au moins 2 cm (Raleigh et Keegan, 2006).

7. Rôle bio-indicateurs des bivalves dans l'écosystème

Une espèce est dite bio-indicatrice lorsqu'elle répond à plusieurs critères. *C. fluminea* et *S. plana* sont des espèces classées comme des espèces bio-indicatrices de la pollution du milieu pour les raisons suivantes (Fossi-Tankoua et al., 2011; Sousa et al., 2008) :

- Tout d'abord, elles ont une large distribution dans le géographique, et sont souvent présentes en forte densité (jusqu'à 2500 organismes au m² pour la corbicule dans certaines rivières anglaises) (Morton et Tong, 1985). Ce sont des organismes sédentaires, ubiquistes dans l'environnement, présents dans le sédiment, faciles à collecter et à maintenir au laboratoire. De surcroît, ces deux espèces, endobenthiques, vivant à l'interface entre la colonne d'eau et le sédiment peuvent résister à un certain degré de pollutions. Elles s'adaptent largement à différents types de substrats ; cependant, *S. plana* vit préférentiellement en milieu vaseux, alors que *C. fluminea* peut aussi bien se développer en milieu composé de sable et de graviers qu'en milieu vaseux.
- Ces deux espèces filtrent de grands volumes d'eau pour extraire les éléments nutritifs dont elles ont besoin mais également pour réaliser des échanges gazeux. Elles sont classées comme des dépositivores, suspensivores (Hughes, 1969). Elles constituent donc de bons modèles pour mesurer l'accumulation, dans leurs tissus, des contaminants présents à la fois dans la colonne d'eau et le sédiment.
- Leurs tailles (2,5 cm en moyenne) et leurs durées de vie (en moyenne 3 à 4 ans) sont des informations permettant de réaliser des études sur la dynamique des populations dans une zone donnée. De plus, la mesure d'une large batterie de biomarqueurs peut être effectuée au niveau individuel suite à la dissection de ces organismes. La taille des organes en particulier la glande digestive est suffisamment importante pour que l'étude des différents marqueurs soit réalisée au niveau individuel. Ceci permet de réduire le nombre d'organismes pour les mesures biologiques. En effet, la glande digestive est un des organes cibles car il est impliqué dans les activités métaboliques et la détoxification (Amiard et al., 2013).
- *Corbicula fluminea* est une espèce, lotique et lentique, représentative des écosystèmes continentaux, tolérant des variations de salinité comprise entre 0 à 13 psu selon Morton et Tong, (1985). Cette espèce peut également tolérer après acclimatation progressive des salinités pouvant atteindre de 22 psu (Evans et al., 1977). *S. plana*, espèce représentative des côtes maritimes et des estuaires, subit des variations de salinité aux rythmes des marées, comprises entre 10 et 35 psu (Verdelhos et al., 2015b).

- Ces organismes ont une grande capacité d'adaptation au milieu. Leur mode de reproduction respectif leur confère une grande efficacité de reproduction, permettant d'obtenir des niveaux de densité importants dans l'écosystème où ils vivent. Cependant, il est indispensable de tenir compte de la période de prélèvement afin de pouvoir comparer les variations des teneurs énergétiques fortement dépendantes de la gamétogénèse. C'est un avantage pour l'utilisation de ces organismes au laboratoire ; leur forte densité et leur grande vitesse de reproduction donnent la possibilité d'échantillonner de grandes quantités d'organismes sans menacer leur présence dans l'écosystème.

8. Choix de ces deux organismes modèles

Premièrement, *C. fluminea* et *S. plana* sont deux bivalves endobenthiques. Ils ont donc conservé de nombreux systèmes fonctionnels communs. L'activité du système digestif et de filtration du milieu sont analogues. Leur présence entre la colonne d'eau et le sédiment ont permis à ces organismes d'être classés comme des espèces bio-indicatrices du milieu. Les deux espèces sont largement répandues et sédentaires. Elles sont tolérantes à de nombreuses variations abiotiques (salinité, température, teneur en oxygène dissous). Dans la majorité des cas, *C. fluminea* et *S. plana* sont capables de bioaccumuler les polluants organiques et les métaux lourds (Solé et al., 2009).

En second lieu, l'eau est la ressource essentielle à la vie mais également le réceptacle ultime des contaminants. Les composés organiques et métalliques peuvent être rejetés dans le compartiment aquatique, parfois très chargé en particules, comme c'est le cas dans les estuaires. Dans cette zone, l'accumulation des contaminants est accrue en raison de la forte richesse en matières organiques et en éléments nutritifs. Le passage et la complexification des contaminants dans la colonne d'eau donnent ainsi lieu à des dépôts de polluants dans le sédiment. Par ailleurs, de nouvelles sources de contaminants sont actuellement émergentes ; c'est le cas par exemple des nanomatériaux (NM). Ils sont très largement utilisés dans différents secteurs, et selon les estimations par modélisation pourraient être présents à des concentrations susceptibles d'avoir des effets sur ces organismes.

Finalement, la principale différence notoire entre ces deux organismes au regard de ce travail de thèse est le milieu auquel ils appartiennent. *C. fluminea* vit en eau douce et *S. plana* en milieu estuarien et marin. La différence du lieu de vie de l'organisme, couplée à leur aptitude à tolérer des variations de salinité, permet de relier ces deux organismes le long d'un gradient longitudinal.

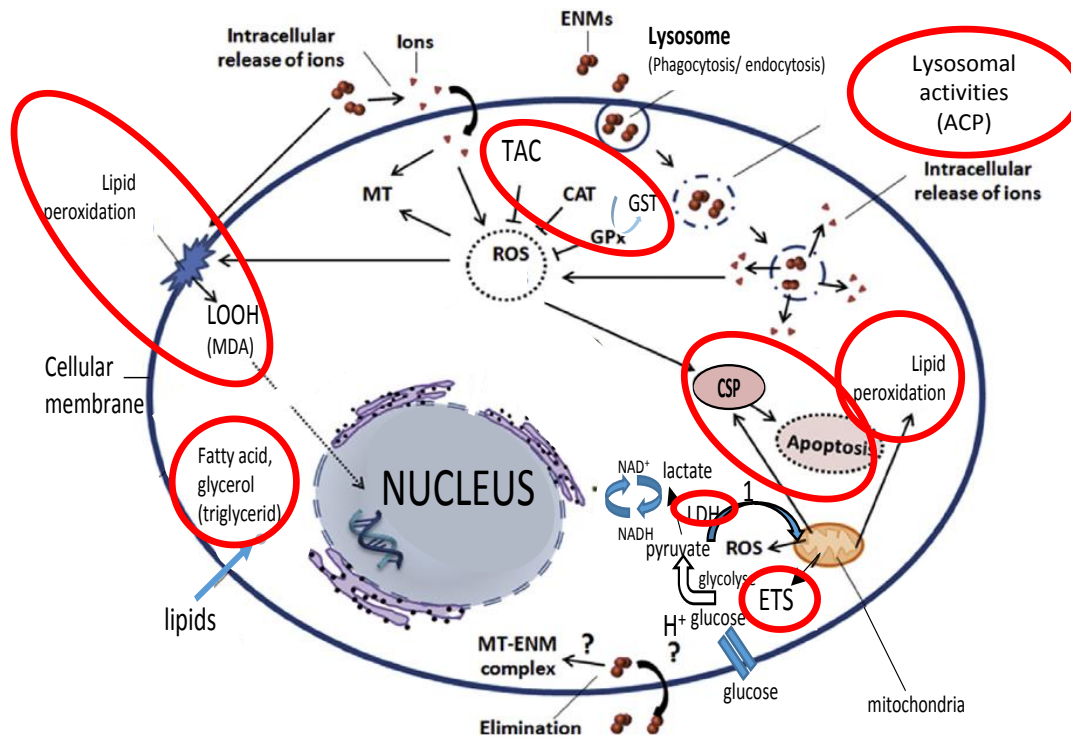
Ce travail de thèse a pour objectif d'évaluer le comportement des NM en suivant le continuum aquatique, allant de l'eau douce à l'eau de mer sur ces espèces euryhalines et endobenthiques. Cette approche n'a encore jamais été réalisée et pourrait ainsi apporter des informations sur le comportement des NM dans le milieu de l'eau douce à l'eau de mer.

Dans ce cadre, suite à la caractérisation du milieu, il serait alors possible à l'aide de ces deux espèces aquatiques d'estimer les effets écotoxicologiques.

La conservation de ces milieux est règlementée depuis les années 1970 au niveau européen pour les cours d'eau mais également au niveau des mers et océans à l'aide de conventions internationales. Dans les années 2000, la directive cadre sur l'eau (DCE) et la directive cadre stratégie pour le milieu marin (DCSMM) ont eu pour objectifs de permettre la préservation et la restauration de l'état des systèmes aquatiques continentaux ou marins.

C. Méthodes pour le dosage des marqueurs du métabolisme biologique

De nombreuses définitions des biomarqueurs sont présentes dans la littérature, celle retenue pour ce manuscrit est la suivante : « *tout changement observable au niveau de l'individu et mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, révélant une exposition présente ou passée à un ou à des contaminants, peut être défini comme un biomarqueur* » (Lagadic et al., 1997). La figure 26 présente les différents mécanismes de toxicité des NM pouvant être mis en place dans la cellule de bivalve comprenant (i) la perturbation membranaire, (ii) la formation d'espèces réactives de l'oxygène et la production du stress oxydatif, (iii) l'induction de l'apoptose et de nécrose, (iv) l'oxydation et la dénaturation des protéines et d'autres biomolécules (Canesi et Corsi, 2016; Rocha et al., 2015). Cette figure groupe ainsi l'ensemble de la batterie de biomarqueurs présentée dans cette thèse et détaillée dans cette section.



Adapted from Rocha et al, 2015

Figure 26 : Schéma illustrant le mode d'action des nanomatériaux manufacturés (ENMs) sur les principaux biomarqueurs au niveau cellulaire.

TAC= total antioxidant capacity ; CAT= catalase ; GPx= glutathion peroxydase ; GST= glutathion-S-transférase ; Mt= métallothionéine ; ROS= espèce réactive de l'oxygène ; CSP= Caspase ; LOOH= hydroperoxide lipidique ; MDA= malondialdéhyde ; LDH= lactate déshydrogénase ; ETS= electron transport système, adapté selon Rocha et al (2015). Le cercle rouge met en évidence les biomarqueurs testés durant cette thèse.

1. Biomarqueurs énergétiques et structurels

Les différents facteurs environnementaux peuvent influencer la disponibilité, la qualité des ressources alimentaires pour les organismes. De plus, l'ensemble de la mise en place des mécanismes de défense requiert l'utilisation d'énergie. Dans ce contexte, il est donc indispensable d'étudier les biomarqueurs des réserves énergétiques, mais aussi par ce biais de déterminer les effets au niveau structurel des cellules.

a. Cholestérol

Le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols et entrant dans la composition des membranes cellulaires. La synthèse du cholestérol est réalisée dans le cytoplasme des cellules hépatopancréatiques.

Chez les invertébrés, les stérols circulent dans l'hémolymphe et permettent de maintenir la fluidité membranaire (Hazel, 1995). Le cholestérol fait partie des substances organiques vitales pour les organismes et joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, d'où son utilisation en tant que biomarqueur des réserves énergétiques. Dutta et Haghighi (1986) ont mis en évidence l'inhibition de la synthèse du cholestérol par les métaux lourds chez certains poissons. Un stress toxique peut supprimer l'activité de nombreuses enzymes responsables de la transformation des lipides. La conséquence est la perturbation des métabolismes lipidiques, entraînant une diminution du taux de cholestérol.

b. Triglycérides

La composition en acides gras des triglycérides assure la fluidité des lipides stockés dans le cytoplasme (van Dooremalen et Ellers 2010). Les triglycérides sont utilisés comme source d'énergie et d'acides gras essentiels pour les bivalves aux premiers stades du développement. Ils sont stockés sous forme de gouttelettes dans la glande digestive et leur utilisation est corrélée avec les cycles saisonniers.

Durant les périodes d'abondance de nourriture (été), les triglycérides sont stockés pour pouvoir maintenir l'activité du métabolisme durant les périodes d'hiver et au moment de l'initiation de la gamétogénèse (Gosling, 2003). Ils sont donc indispensables pour le métabolisme énergétique des organismes ainsi qu'en période de reproduction.

c. Système de transport d'électrons (ETS)

La respiration cellulaire chez les eucaryotes se fait au niveau d'une chaîne enzymatique mitochondriale appelée Système de Transport d'Electrons (ETS pour Electron Transport System). L'ETS permet le passage d'électrons sur une série de complexes protéiques (déshydrogénases intermédiaires et cytochrome) présents dans la membrane interne des mitochondries.

L'ATP synthase présente en bout de chaîne est responsable de la phosphorylation oxydative, et permet la formation d'adénosine-5'-triphosphate (ATP), source majeure d'énergie (Cammen *et al*, 1990). Dans la mitochondrie, deux électrons et deux protons sont consommés pour la transformation de $\frac{1}{2} O_2$ en eau. Cette mesure de consommation requiert un accepteur d'électrons, le 5 phenyl tetrazolium chloride (INT). Les premières mesures d'activité ETS ont été réalisées dans le phytoplancton et le zooplancton marin. L'ETS correspond à la mesure de l'activité respiratoire totale et permet d'estimer la variation du métabolisme de la respiration au niveau des mitochondries et des systèmes de transporteurs d'électrons microsomaux.

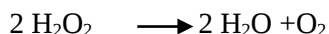
2. Biomarqueurs impliqués dans les processus d'osmo-régulation

Les deux organismes étudiés sont identifiés comme organismes euryhalins, c'est-à-dire qu'ils sont capables de tolérer des changements de salinité. L'un des principaux mécanismes entrant en jeu correspond au maintien de la concentration osmotique dans l'organisme par le transport actif ou passif des ions au travers de la membrane cellulaires des branchies mais également à l'augmentation du stress oxydatif (Rivera-Ingraham et al., 2016). Ainsi les tissus branchiaux exposés aux contaminants mais aussi l'ensemble des organes des bivalves peuvent subir des modifications des ATPase dépendantes du sodium et du potassium (Na/K ATPase) définies comme étant des protéines qui permettent le passage d'ions, mais aussi de molécules au travers des membranaires des cellules (Medler et al., 1999). Des essais de développement de la mesure des Na/K ATPase sur les deux espèces ont été réalisés afin de déterminer les modifications des ratios de concentration en sodium et potassium suite aux stress à différents facteurs. Cependant, aucune méthode satisfaisante n'a pu être mise au point durant cette thèse. Dans la littérature, Carregosa et al. (2014a) mettent en évidence d'important changement de concentration en ions sodium, magnésium et calcium suite à l'acclimatation de l'espèce *Venerupis philippinarum* le long d'un gradient de salinité (compris entre 0 et 42 psu). Ces changements ont permis aux organismes de maintenir leur niveau d'homéostasie malgré le facteur de stress auxquels ils étaient soumis.

3. Biomarqueurs du stress oxydant

a. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme du système antioxydant qui neutralise la toxicité des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et qui intervient dans les réactions physiologiques normales de tous les organismes aérobies (Mueller et al, 1997). La catalase est une enzyme permettant la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en une molécule d'oxygène (O_2).

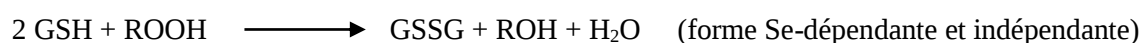


Cette enzyme est classée comme un biomarqueur de défense parce que son activité augmente avec la présence de polluants. De nombreuses classes de polluants, tels que les métaux traces et les composés organiques sont connus pour entraîner une formation de ROS. Le rôle physiologique de la catalase est fondamental dans la neutralisation du peroxyde d'hydrogène qui peut réagir avec des métaux pour former un radical HO^* .

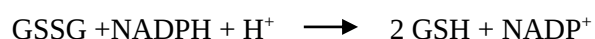
En réduisant la concentration en peroxyde d'hydrogène (et ses sous-produits), la catalase est indiquée comme l'une des principales défenses antioxydantes des organismes marins (Abele et al, 2011). Selon Vale et ses collaborateurs (2014), en présence de nanoparticules de TiO_2 , une augmentation significative de l'activité de la catalase se produit après 3 jours d'exposition. De plus après 8 jours d'exposition, ils observent une diminution de l'activité de la catalase (niveau identique au contrôle). Ceci pourrait être expliqué par (a) une réponse adaptative au stress suite à l'utilisation d'autres mécanismes de défense (induction de protéines de stress ou une activité antioxydante non-enzymatique), ou (b) un épuisement des défenses de l'organisme à cause de différents stress. De nombreuses études montrent des effets de l'activation de la catalase suite à l'exposition aux nanoparticules métalliques (Garaud et al., 2016a; Pan et al., 2012; Zhang et al., 2011).

b. Glutathion peroxydase (GPx)

Les glutathion peroxydases (GPx) sont une large famille d'enzymes classées en deux groupes : sélénium (Se) dépendantes et Se-indépendantes, localisées dans différents compartiments cellulaires (cytosol, matrice mitochondriale, membranes). La Se-dépendante réagit avec une grande variété d'hydroperoxydes, incluant H_2O_2 et les peroxydes organiques. Les Se-indépendantes quant à elles n'interagissent qu'avec les formes réduites des hydroperoxydes organiques.



La mesure de l'activité de la glutathion peroxydase est largement utilisée comme biomarqueur de défense antioxydante. De plus, elle permet d'évaluer les effets d'une exposition à des composés chimiques (insecticides organochlorés, composés hydrocarbonés) chez les mollusques (Amiard-Triquet and Rainbow, 2009). Le principal rôle de cette enzyme est de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs. Cette enzyme couplée à la catalase permet d'éliminer une grande partie du peroxyde d'hydrogène pouvant être présent dans les différents compartiments cellulaires. La glutathion peroxydase réduit H_2O_2 et les hydroperoxydes organiques (ROOH) en présence d'un co-facteur : le GSH (Glutathion à l'état réduit) et est dosée en mesurant l'absorbance obtenue suite à la consommation du substrat NADPH.



Le GSH est également utilisé par l'activité de la glutathion-S-transférase (GST), ce qui signifie qu'une modification de la concentration en GSH dans la cellule n'est pas uniquement associée à une activité de GPx.

Aucun effet significatif n'a été observé suite à l'exposition aux nanoparticules de TiO₂ (concentration d'exposition 1 mg/L) sur le bivalve *C. fluminea* (Vale, 2014). En revanche, McCarthy et ses collègues (2013), ont mis en évidence des variations de GSH suite à l'exposition de *C. virginica*, à des nanoparticules d'argent de taille comprise entre 20-30 nm, à des concentrations comprises entre 0,002-20 mg/L. D'autres études ont montrées des variations de l'expression génétique de la GPx suite à l'exposition aux nanoparticules d'argent sur *Chironomus riparius* (Nair et al., 2013).

c. Capacité antioxydante totale (TAC)

Les antioxydants sont impliqués dans la prévention de la formation et l'élimination des radicaux libres. Ces derniers peuvent avoir un effet toxique sur la viabilité cellulaire. Il existe trois catégories de molécules antioxydantes, (i) les enzymes du système antioxydant (GPx, Superoxyde dismutase, catalase...), (ii) les petites molécules non enzymatiques (ascorbate, acide urique, GSH...) et les protéines (transferrine...). La somme des activités antioxydantes est regroupée dans la mesure de la capacité totale antioxydante (TAC pour Total Antioxidant Capacity), encore appelée activité totale antioxydante. L'information fournie par cette mesure d'activité renseigne sur la capacité globale de l'organisme à neutraliser les ROS, la résistance aux attaques oxydatives et aux stress oxydatifs (biovision.com, consulté le 18/06/2015). Cette approche permet également d'intégrer une plus large connaissance des produits antioxydants. En effet, cette technique permettrait de détecter les synergies entre les antioxydants (moléculaires ou protéiques) connus, et d'autres antioxydants non connus ou présents en faibles concentrations (Bartosz, 2003).

4. Mécanismes de détoxification

a. Glutathion S-transférase (GST)

La glutathion S-transférase (GST) intervient dans les réactions physiologiques normales de l'organisme au niveau de la phase II de détoxification. Les GST sont localisées dans le cytosol, les mitochondries et les microsomes, en particulier dans la glande digestive et les branchies chez les mollusques. Cette enzyme a été classée comme biomarqueur de défense et appartient aux enzymes multifonctionnelles qui interviennent dans la biotransformation des composés organiques (Amiard-Triquet and Rainbow, 2009).

En effet, la GST fixe des ligands sur les polluants ayant pénétré dans les cellules, afin de les rendre plus hydrophiles et de favoriser leur élimination de l'organisme.

La GST est présente dans les organismes aquatiques, sous différentes isoformes, et permet d'évaluer la possible exposition à une pollution chimique (Lagadic, 1997). Chez les bivalves, la GST est capable de se conjuguer fortement avec le substrat 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) afin de permettre son dosage par spectrométrie. L'augmentation de l'activité de la GST traduit une exposition des organismes à des polluants (Amiard et Amiard, 2008). Une augmentation de l'activité de la GST a été observée suite à l'exposition de *S. plana* à des AgNP (10 nm, 10 µg/L) (Buffet *et al*, 2013).

b. Métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines non enzymatiques de faible poids moléculaire, thermorésistantes, grâce à la présence de deux domaines (α , β) condensés sur eux-mêmes. La forte teneur en cystéines des MT (20-30 % des acides aminés totaux), entraîne la présence de groupements thiols sur les chaînes latérales. Cette forte concentration en cystéines augmente l'affinité pour les métaux essentiels, tels que le cuivre et le zinc, et des métaux non essentiels comme le cadmium, le mercure, le plomb et l'argent (Amiard *et al*, 2006), mais aussi avec les ROS, comme les radicaux hydroxyles. Les MT semblent jouer un rôle dans l'homéostasie cellulaire et le métabolisme en régulant les éléments métalliques essentiels (Cu et Zn). Cependant, les métaux non essentiels (Cd, Ag, Hg) et les ROS peuvent perturber l'association créée entre les MT et les métaux essentiels. Lors de cette compétition, l'élément essentiel va être libéré et un nouveau complexe va être mis en place entre la MT et un ROS ou un métal non essentiel. Ce phénomène a plusieurs conséquences : (1) la libération de l'élément essentiel dans le cytosol va perturber la stœchiométrie intracellulaire et engendrer une toxicité (2) la synthèse de nouvelles MT (les autres étant occupées pour la chélation des composés toxiques) (figure 27).

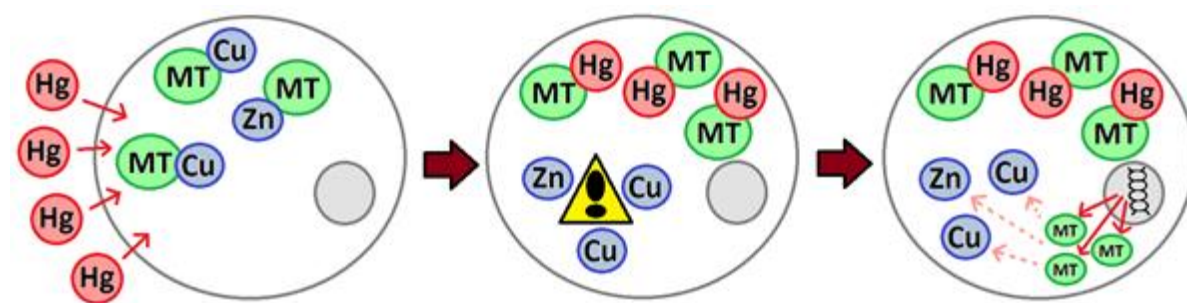


Figure 27 : Schéma représentant le mode d'action des métallothionéines (MT) dans le cytoplasme dans le cas d'une contamination au mercure (Hg).

La mobilisation des MT par les métaux, ainsi que leur production peuvent donc être couplées au stress oxydatif (Bauman *et al*, 1991). De plus, les MT ne sont pas habituellement saturées par un seul métal, mais plutôt par de nombreux atomes (Cu, Zn, Hg, Ag) présents dans le milieu (Amiard and Cosson,

1997). Dans ce cas, les MT interviennent de manière indirecte, dans le processus de détoxification de l'excès de métaux (essentiels ou non) au niveau intracellulaire. En définitive, l'induction de la synthèse des MT par la présence de métaux a donc été envisagée comme étant un des outils pour le contrôle des réponses biologiques des organismes aquatiques exposés à une pollution métallique (Geffard *et al*, 2001). L'augmentation de la production des lipoperoxydes, liée à la présence de ROS, est souvent associée à l'augmentation des MT. Il faut noter que suite à l'exposition des bivalves *S. plana*, à une concentration de 10 µg/L AgNP, aucune différence significative de variation de la concentration en MT n'a été observée (Buffet *et al*, 2013). Cependant, plusieurs études ont montrées des inductions de métallothionéines suite à l'exposition aux nanoparticules métalliques (Buffet *et al*., 2011; Griffitt *et al*., 2008; Pan *et al*., 2012).

c. La phosphatase acide (ACP)

La phosphatase acide est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des composés phosphatés. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et déphosphoryle les esters orthophosphoriques organiques par l'action de la transférase. Cette enzyme agit comme un marqueur de la détection des lysosomes dans la fraction cytosolique pouvant survenir suite à la présence de contaminants dans le milieu. L'activité enzymatique de la phosphatase acide a été étudiée sur différents organismes et sous l'influence de différents métaux (Blasco *et al*, 1993).

5. Biomarqueurs de comportement

Les changements de comportement d'un organisme peuvent être des indicateurs de stress environnemental et affecter directement la survie de l'organisme. Au-delà de cette échelle individuelle, les modifications du comportement peuvent aussi fournir des renseignements sur l'efficacité d'un organisme à accomplir sa fonction au sein de l'écosystème. Dans cette thèse, deux organismes endobenthiques ont été retenus. Le marqueur comportemental sélectionné est l'enfouissement dans le sédiment. Cet enfouissement est en effet révélateur de plusieurs mécanismes, intervenant aux deux échelles citées précédemment.

A l'échelle de l'individu, il peut s'agir d'un mécanisme de protection vis à vis des contraintes environnementales. Ainsi, pour *S. plana*, bivalve marin, l'enfouissement résulte d'une adaptation nécessaire au rythme des marées, avec la dessiccation et les variations thermiques que cela implique. Pour la corbicule, le rôle de l'enfouissement est moins clair.

Le sédiment peut servir de refuge quand la température de l'eau baisse, mais il est également fréquent d'observer des individus restant en permanence à la surface du substrat (notamment quand la granulométrie de ce dernier augmente).

D'une manière plus générale, la modification du comportement d'enfouissement peut être liée à la présence de contaminants (Amiard-Triquet, 2009; Cooper and Bidwell, 2006). L'enfouissement peut alors soit s'accroître, pour échapper aux flux de contaminants, ou au contraire se ralentir, l'organisme fermant alors ses valves en réponse au facteur de stress. L'interprétation est basée sur l'étude de la vitesse de cinétique d'enfouissement des organismes.

A l'échelle de l'écosystème, ce comportement d'enfouissement est fortement associé aux mécanismes de bioturbation des sédiments. Cette bioturbation est essentielle dans les échanges à l'interface eau-sédiment. Il a été démontré en milieu marin, que l'activité de la macrofaune bioturbatrice augmentait de 2 à 25 fois la modification des flux à l'interface eau-sédiment (Pratihary et al., 2009). La bioturbation est un processus qui intègre l'ensemble des modifications physiques, chimiques et biologiques des sédiments par tout type d'organisme. En d'autres termes, la bioturbation correspond à la dispersion des particules sédimentaires résultant du remaniement par la faune benthique. L'activité de la faune bioturbatrice influence la séquestration et la distribution verticale de la matière organique, les taux et les voies de minéralisation (en agissant sur l'oxygénation du sédiment), les mouvements des solutés et par conséquent, les flux de composés dissous à l'interface eau-sédiment (Waldbusser et al., 2004; Welsh, 2003) y compris les polluants (Banta and Andersen, 2003; Petersen et al., 1998). L'enfouissement, sans être une mesure directe de la bioturbation, en constitue néanmoins un bon proxy.

6. Biomarqueur de neurotoxicité : inhibition de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholine est un neurotransmetteur impliqué dans le transfert de l'influx nerveux indispensable pour la contraction des muscles et comme médiateur chimique (Periasamy et al., 2009). Sa régulation est assurée par une enzyme : l'acétylcholinestérase (AChE) ; la réaction d'hydrolyse entraîne la formation de choline et d'acétate à partir d'acétylcholine. Les changements de l'activité enzymatique peuvent traduire des altérations du comportement et de l'activité musculaire des organismes, suite à l'exposition à des contaminants de nature organique ou métallique (Gagné, 2014). Dans ce contexte, il est défini comme un biomarqueur de neurotoxicité chez les organismes aquatiques. La diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase bloque le mouvement entre l'acétylcholine et son récepteur, ayant pour conséquence la dépolarisation de la membrane. Dans le cas où cette situation serait prolongée, l'ensemble de la membrane post-synaptique sera dépolarisée et les synapses des jonctions musculaires seront bloquées pouvant entraîner la tétanie de l'organisme. De plus, une hypothèse soulevée par Bocquené et ses collègues (1997, in Lagadic et al, 1997), serait que cette enzyme joue également un rôle de médiateur chimique de l'activité neuronale comme dans l'ouverture des canaux K^+ et l'inactivation des canaux Na^+ directement par l'AChE.

De plus, l'acétylcholine, libérée par les fibres parasympathiques aboutissant au cœur, permet de ralentir le rythme cardiaque en augmentant la conductance au potassium (K^+).

Il est rapporté dans la littérature que les nanoparticules d'oxydes métalliques (TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3) entraînent une plus faible réduction de l'activité enzymatique AChE que les nanoparticules de métal et les nanotubes de carbone (Wang *et al*, 2009).

Une étude a été réalisée, sur l'oxyde de fer superparamagnétique, très utilisé en nanomédecine comme agent de contraste. L'étude portant sur le cerveau du poisson zèbre a mis en évidence une inhibition de l'activité AChE et une induction de l'apoptose (de Oliveira *et al*, 2014).

7. Les indicateurs de dommages cellulaires

a. Apoptose :

Il existe deux processus distincts aboutissant à la mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose. Suite à une exposition à des conditions défavorables, les cellules peuvent subir une apoptose qui résulte de changements morphologiques cellulaires (condensation de la chromatine nucléaire, rétrécissement cellulaire, désintégration nucléaire, formation de corps apoptotique) pouvant conduire à la mort programmée de la cellule. Cependant, dans les conditions plus extrêmes, la nécrose est alors mise en place et correspond à la dégradation de l'ADN des cellules entraînant leur mort et pouvant échapper à la régulation par l'organisme (Risso de Faverney *et al*, 2001). La Caspase-3 est une protéase apoptogène.

La nomenclature a défini le **C** comme représentant la cystéine du centre actif de la protéase ; le terme **aspase** se réfère à la spécificité de clivage des substrats par les protéases suite à la présence d'un acide aspartique. Le rôle des caspases est d'activer les molécules, permettant la destruction cellulaire au moment de l'apoptose. (Risso-de Faverney *et al.*, 2001).

La mesure de l'activation de la caspase-3 dans les cellules peut résulter d'une large variété de stimuli physiologiques et chimiques. Cette méthode a donc pour but d'évaluer l'induction de l'apoptose.

b. La lipopéroxydation

- Hydroperoxyde lipidique (HPL)

Les phospholipides sont les constituants essentiels de la membrane cellulaire et sont produits lors d'un stress oxydant, en réponse à la présence de ROS. La principale forme des dommages due au stress oxydant est la lipopéroxydation (Alves de Almeida *et al.*, 2007).

Les hydroperoxydes lipidiques (HPL) sont les premiers sous-produits de ce processus ; ils sont issus d'acides gras insaturés et se transforment en différents aldéhydes cytotoxiques, tel que le malondialdéhyde (MDA) (Figure 28).

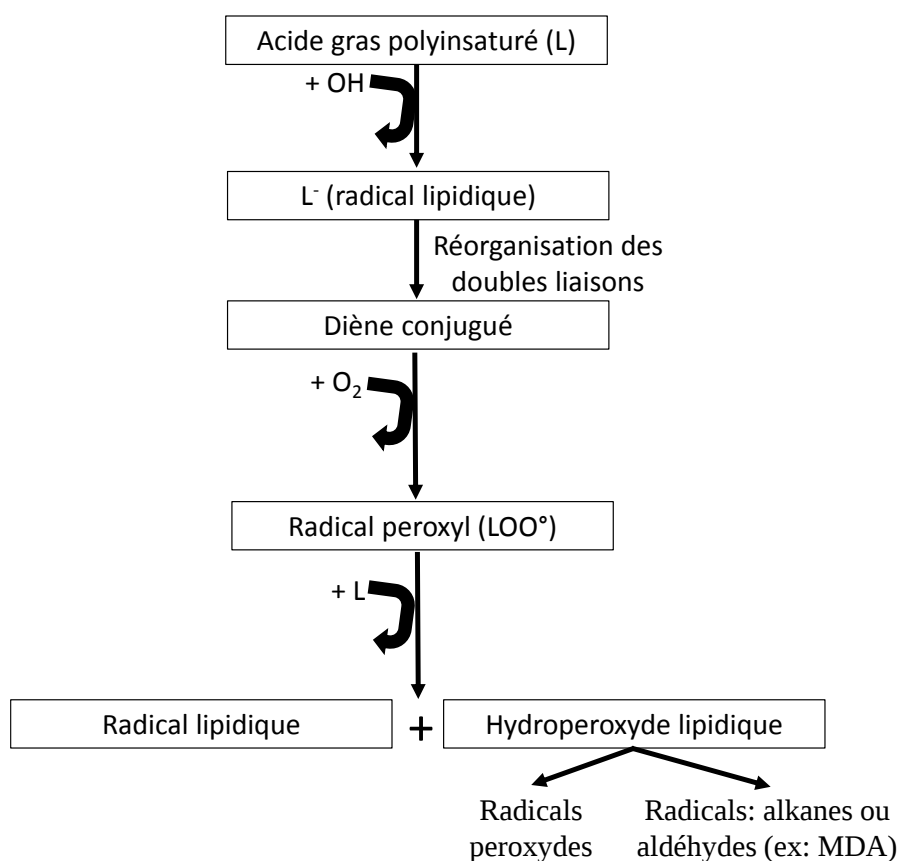


Figure 28 : Schématisation de la chaîne de la peroxydation lipidique. (adapté de Alves de Almeida et al., 2007)

- Thiobarbituric réactive substances (TBARS)

La lipopéroxydation est provoquée par une dégradation oxydative des lipides membranaires, suite à la non-neutralisation des ROS par le système antioxydant enzymatique. L'acide thiobarbiturique réagit avec les produits issus de la dégradation oxydative. On nomme alors toutes ces substances réactives à l'acide thiobarbiturique TBARS. Le taux de lipopéroxydation est obtenu suite à la mesure du malondialdéhyde (MDA), qui est le produit terminal de la dégradation des lipides. L'une des critiques réalisée sur ce type de dosage est qu'il est peu spécifique, car l'acide thiobarbiturique peut réagir avec des composés autres que le malondialdéhyde (Durou et al, 2007). Il est défini comme étant un biomarqueur de dommage oxydatif.

A titre d'exemple, aucun effet n'a été observé suite à l'exposition de *S. plana*, 10 µg/L, d'AgNP (Buffet et al, 2013), les défenses antioxydantes que sont la catalase et la superoxyde dismutase sont suffisantes pour prendre en charge les dommages dans cette étude.

c. Lactate déshydrogénase LDH

La lactate déshydrogénase est une enzyme qui intervient dans le métabolisme anaérobie pour permettre la dégradation du glycogène et du glucose ; elle peut également traduire une perturbation du métabolisme causée par des polluants (Lagadic *et al*, 1997). Cette enzyme peut transformer de manière réversible le lactate en pyruvate en condition anaérobie. Ce paramètre, pratiquement présent dans tous les tissus est largement utilisé en toxicologie humaine et dans la chimie clinique pour le diagnostic des dommages cellulaires. Cependant, l'utilisation de cette enzyme comme critère d'évaluation dans les tests de toxicité chez les invertébrés aquatiques a été à peine explorée. Des modifications de l'activité normale de la LDH ont été mises en évidence suite à des expositions à un métal lourd ou à des variations de saturation en oxygène (Diamantino *et al*, 2001). Les travaux de Buffet *et al*. (2013), n'ont montré, aucun effet sur l'activité de la LDH suite à l'exposition de *S. plana* à des AgNP (10µg/L).

8. Etat de santé général de l'individu : Indice de condition

Il existe de très nombreux indices de conditions, calculés à partir de paramètres physiologiques sur les organismes étudiés. Ces indices apportent des connaissances larges sur des effets non spécifiques de stress au niveau de l'individu, de la population et de la communauté. Certains paramètres, tels que le taux de remplissage de la coquille, le rapport du poids des tissus mous sur le poids total ou la longueur de la coquille, donnent des informations sur la croissance des organismes ou l'évolution de la population au sein de différents sites d'étude. La variation de la salinité d'un milieu en présence d'organismes euryhalins, soulève le problème de la concentration de l'eau dans les tissus. L'indice de condition permet alors d'évaluer la masse d'eau présente dans les organismes selon la salinité dans laquelle ils se trouvent durant l'acclimatation (Lagadic *et al*, 1997). Il est préconisé d'utiliser les masses sèches des tissus pour calculer l'indice de condition, comme dans cette thèse afin de s'affranchir des fluctuations de la teneur en eau des tissus (Lucas and Beninger, 1985). Quelques indices sont couramment utilisés, comprenant la mesure du poids sec (PS), du poids total sec (PTS) et du poids frais (PF) et calculés selon la formule :

$$IC = \frac{PS}{PST}$$

D. Caractérisation du milieu d'exposition

L'étude des NM et nanoproduits dans le milieu d'exposition en présence et en absence des organismes est indispensable afin de comprendre leur devenir et leur comportement. En effet, le comportement et le devenir des NM est très largement régi par les variations physiques et chimiques du milieu dans lequel ils évoluent (Navya and Daima, 2016).

Dans cette thèse, l'ensemble des caractérisations des NM et nanoproduits a été réalisé par le laboratoire partenaire CEREGE (Université Aix en Provence). Préalablement aux expositions en présence d'organismes, des études portant sur l'évaluation du devenir des métaux et la formation d'agrégats le long du gradient salin ont été effectuées en milieu exempt d'organismes. Des techniques de détection telles que le DLS (Dynamic Light Scattering) ont permis de déterminer le diamètre hydrodynamique et la cinétique d'agrégation des NM. Dans le cadre de cette thèse, l'ensemble des milieux d'études en présence des deux espèces exposées aux NM et nanoproduits (argent et de dioxyde de cérium) ont été suivis à l'aide (i) des sondes multi-paramétriques et (ii) de la mesure des métaux (totaux ou sous formes labiles) dans le milieu et dans les organismes dans l'objectif de mieux appréhender le devenir des NM (spéciation, bio-disponibilité, bioaccumulation).

a. Paramètres physico-chimiques du milieu

Durant chaque expérience et tout particulièrement durant l'exposition à long terme (28 jours) réalisée en mésocosme, la mesure des paramètres physico-chimiques par les sondes multiparamétriques comprenant le pH, la salinité, la température, le niveau d'oxygène dissous, la conductivité et le potentiel rédox (ODEON system, Ponsel) a été effectuée. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans les manuscrits de chaque expérience. La principale remarque générale suite à l'étude de ces paramètres est qu'aucune dérive des paramètres n'a été observée durant les différentes expositions (micro et mésocosmes) illustrant la réplicabilité des unités du dispositif expérimental.

b. Métaux totaux

Les dosages des métaux totaux ont été réalisés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (terme anglais Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) au sein du laboratoire MMS sur le site de Nantes. Les dosages ont été réalisés sur des échantillons de la colonne d'eau (stabilisés en milieu acide nitrique) et de la glande digestive (après digestion des tissus par l'acide nitrique) pour estimer les concentrations en métaux ici totaux (en $\mu\text{g/L}$ d'échantillons ou $\mu\text{g/g}$ de tissus secs). Le dosage des métaux totaux (cérium) dans la fraction sédimentaire des mésocosmes et dans la glande digestive a été réalisé par un prestataire (n° SIRET: 41984961700032) par ICP-MS. L'analyse est effectuée en ionisant l'échantillon par une torche à plasma. Par la suite, les ions composant l'échantillon sont séparés et quantifiés par spectrométrie de masse l'ICP-MS.

c. Mesure des formes labiles

Afin d'estimer la libération des ions par les NM dans le milieu d'exposition, deux types d'outils ont été utilisés : les échantillonneurs passifs disposés dans la colonne d'eau et le sédiment et l'ultra-filtration sur membrane.

- L'échantillonneur passif

La technique utilisée est basée sur l'utilisation de gradient de diffusion en couches minces (terme anglais Diffusive Gradient of Thin film ; DGT). Les dispositifs sont déposés dans le milieu avant l'entrée des NM et restent présents dans ce dernier durant l'ensemble du temps d'exposition. Cet outil est composé d'un gel chélatant (ou membrane de Chelex) qui au contact des ions métalliques les complexe et d'un gel diffusif (membrane d'hydrogel) qui joue le rôle de transporteur naturel des espèces métalliques présentes dans le milieu vers le gel chélatant. Ce dispositif permet de mesurer les formes labiles des métaux contenues dans la membrane de chelex par échantillonnage passif incluant ainsi les cations métalliques et les complexes facilement dissociables (Lucas et al., 2012; Zhang and Davison, 2001). Les dispositifs peuvent aussi bien être déposés dans l'eau ainsi que dans le sédiment comme le montre la figure 29. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet d'estimer la libération des ions métalliques des nanomatériaux, au cours du temps, durant la totalité de l'exposition. Ce dispositif a pour but de permettre de déterminer si les effets observés sont attribués au relargage des métaux ou à la forme nanoparticulaire de ces derniers. Dans cette thèse, les expositions en mésocosmes comprenant un compartiment sédimentaire ont requis l'utilisation de DGT spécifique afin d'estimer la libération des ions dans ce compartiment.

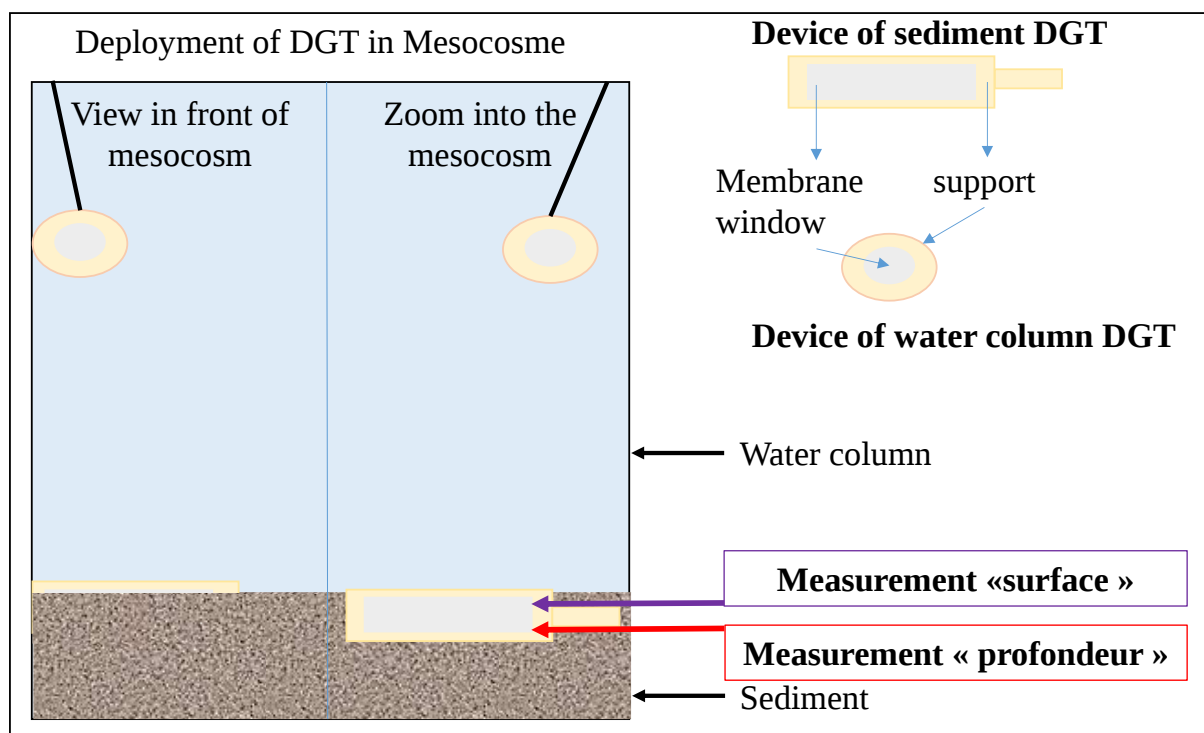


Figure 29 : Schéma du dispositif des DGT en mésocosme (en colonne d'eau et dans le sédiment)

- L'ultrafiltration sur membrane

Cette technique requiert l'échantillonnage régulier du milieu. L'objectif de cet outil est de mesurer sur chaque prélèvement effectué, les formes labiles des métaux après leur passage au travers d'une membrane de 3 kDa (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Dutscher) incluant ainsi uniquement les formes solubles (sans retenir les métaux sous formes nanométriques). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet le suivi ponctuel et régulier de l'exposition.

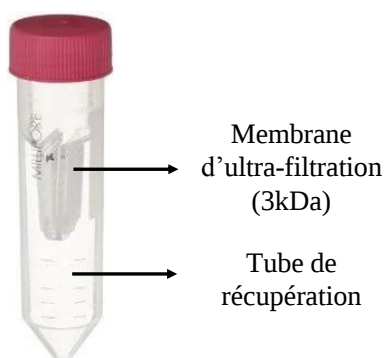


Figure 30 : Dispositif d'ultra-filtration en tube Amicon™ (source : www.popscreen.com)

E. Outils statistiques

Dans cette thèse, l'approche multi-stress a pour objectif d'évaluer les réponses biochimiques, physiologique et comportementales de différents groupes de conditions d'exposition (facteurs de stress) défini selon le type de traitements (NM ou contrôle), la durée d'exposition (2, 7, 14, 21, 28 jours), le régime alimentaire (nourris ou non), la salinité testée (1,5 ; 15 ; 30 psu) et l'espèce choisie (*C. fluminea* et *S. plana*). Ce type de schéma expérimental couplé à la mesure d'une large batterie de biomarqueurs conduit à l'acquisition d'une large banque de données à différentes échelles biologiques. La difficulté est de déterminer quels sont les outils statistiques disponibles pour permettre de répondre aux diverses questions scientifiques en conservant l'ensemble des paramètres testés. C'est l'un des principaux enjeux de la statistique dans le domaine de l'écotoxicologie. Il correspond aux développements de nouvelles méthodologies pour analyser les données obtenues à partir d'un faible groupe d'échantillons. Les méthodes d'étude des résultats dans cette thèse peuvent être séparées en deux groupes : les tests considérant chaque réponse biologique (enfouissement, biomarqueurs) de manière indépendante et les tests intégrant les différentes réponses obtenues. L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R (R core team, version 3.1.0, 2014) et les différences ont été considérées significatives lorsque le seuil de p -value était inférieur à 0,05 (p -value < 0,05).

a. Réponses indépendantes

Dans un premier temps, l'approche Bayésienne a été utilisée pour étudier les réponses obtenues lors de l'enfouissement des organismes. La cinétique d'enfouissement a été évaluée en utilisant un modèle général non linéaire (GNLM) qui définit α comme étant le taux d'enfouissement (min^{-1}). En effet, lorsqu'un des organismes s'enfouit dans le sédiment, il ne peut plus être considéré comme étant présent. De ce fait, la distribution binomiale développée initialement par Buffet et collaborateurs (2014a) permettant d'évaluer la probabilité d'absence de l'enfouissement des organismes sur l'ensemble du temps d'exposition (6h) a été effectuée sur les données recueillies. Les résultats ont alors été présentés sous forme de courbe incluant ainsi la moyenne des points produits suite à l'utilisation du GNLM à l'aide des valeurs observées. Un tableau de valeur y est associé incluant ainsi la moyenne du taux d'enfouissement pour un groupe d'exposition donné (α en min^{-1}) et l'intervalle de confiance associé (95 %).

Les réponses des biomarqueurs sont étudiées statistiquement suite à l'évaluation de la normalité et de l'homoscédasticité des résultats en utilisant le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene respectivement.

Selon que les données obtenues soient paramétriques ou non, différents tests ont été effectués (tests-t, Kruskal-Wallis et Mann-Whitney), le but étant de calculer statistiquement la différence d'une réponse avec une seule variable indépendante, c'est-à-dire d'étudier un seul facteur de stress (traitements, durée d'exposition, régime alimentaire, salinité testée). L'Analyse de la variance (terme anglais *analysis of variance* ; ANOVA)) permet d'étudier plusieurs facteurs de stress permettant ainsi d'aborder la prise en charge du concept de multi-stress. L'ANOVA permet de faire des évaluations jusqu'à 4 facteurs, cependant l'interprétation des réponses au niveau biologique n'est pas toujours possible.

b. Réponse intégrative

L'approche globale basée sur la mesure d'une batterie de biomarqueurs a nécessité l'établissement de méthodes simples pour résumer les réponses des biomarqueurs de manière intégrée appartenant à la famille des statistiques multivariées. L'une des plus connue est l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Elle permet de mettre en évidence les différences entre les variables dépendantes (facteurs de stress) à l'aide de certaines variables dépendantes (biomarqueurs). Elle permet aussi de sélectionner les variables dépendantes les plus pertinentes pour caractériser la présence d'un ou plusieurs facteurs de stress. Cependant, cet outil présente certaines limites, liées notamment à la représentation graphique des jeux de données impliquant un grand nombre de variables indépendantes.

L'analyse des résultats obtenus a également été abordée à l'aide de l'analyse discriminante linéaire (*Linear Discriminant Analysis* ; LDA) dont les visées sont d'une part de séparer les groupes (combinaison des facteurs de stress testés) mais également de déterminer la batterie la plus simple de biomarqueurs permettant de réaliser cette séparation des groupes. L'une des principales limites est que le nombre de biomarqueurs retenus est dépendant du nombre de réplicats mesurés (nombre d'individus utilisés). Cette dernière a été mise en place sur les données acquises durant cette thèse mais les résultats n'ont pas été présentés par la suite en utilisant cet outil.

Lorsque le nombre de réplicats devenait trop faible (avec moins de réplicats que de variables dépendantes), le jeu de donnée a été analysé en utilisant la régression des moindres carrés partiels (*Partial Least Squares regression*, PLS) couplée à l'analyse discriminante (*Discriminant Analysis*, DA) nommée PLS-DA. Cette analyse permet d'établir une relation entre la batterie de biomarqueurs et les facteurs de stress tout en conservant uniquement une batterie de biomarqueurs restreinte grâce à la sélection des VIP (terme anglais *Variable Importance in the Projection*). Les biomarqueurs sont sélectionnés pour le modèle uniquement lorsque les valeurs des VIP étaient supérieures à 1 (Eriksson et al., 1999). L'ensemble des conditions d'exposition est alors placé sur un plan factoriel combinant deux axes, tandis que les variables indépendantes sont placées sur un cercle de corrélation donnant ainsi la corrélation de chaque variable avec l'axe de la PLS-DA.

Par la suite, des tests Hotelling T^2 utilisant le risque de correction de Benjamini et Hochberg ont été effectués afin de mesurer des différences statistiques entre les groupes d'exposition et les facteurs de stress étudiés (Benjamini and Hochberg, 1995).

Le dernier outil abordé durant cette thèse est l'IBR (Integrated Biomarker Response ; IBR) qui est largement utilisé dans le domaine de l'écotoxicologie (Beliaeff and Burgeot, 2002; Devin et al., 2014). A la différence des autres outils proposés précédemment, l'IBR permet d'obtenir, après indication de la réponse attendue pour chaque biomarqueur (activation ou inhibition), une valeur d'indice traduisant de manière globale l'état de l'organisme en intégrant de 4 à 9 biomarqueurs. La principale difficulté est de déterminer préalablement la réponse attendue (augmentation ou diminution en réponse au stress) pour chaque paramètre dosé, ce qui est en écotoxicologie un grand défi. En effet, cette réponse peut dépendre de la nature, de la dose du contaminant et du temps auxquels sont réalisées les mesures.

1^{ère} Partie :

Influence de la salinité sur les réponses écophysiological des modèles biologiques étudiés.

Cette partie est dédiée à l'étude de différents facteurs de stress incluant la variation de la salinité, le type de régime alimentaire (nourris ou non nourris), le temps d'exposition (2 et 7 jours) sur les deux espèces de bivalves (Corbicula fluminea; Scrobicularia plana) sélectionnées.

Ce chapitre III présente les résultats acquis et valorisés sous forme d'un article accepté sous réserve de corrections mineures dans le journal international Ecological Indicators.

Dans le contexte des changements globaux, l'influence des modifications de la salinité dans les écosystèmes aquatiques représente un défi important pour la société. Les différentes sources de salinisation (naturelles ou anthropiques) amplifient l'introduction de sels au niveau des rivières, causant ainsi une augmentation de la salinité dans les zones estuariennes et côtières. Dans cette étude, deux espèces de bivalves endobenthiques, C. fluminea et S. plana ont été choisies en raison de leur large tolérance aux variations de la salinité (organismes euryhalins). Ces organismes permettent ainsi d'étudier les effets physiologiques des changements de salinité sur un continuum de l'eau douce à l'eau de mer. Les objectifs étaient d'étudier l'impact de la salinité aux niveaux physiologique, biochimique et comportemental, en exposant les deux espèces à une salinité proche de la limite de leur gamme de tolérance, 15 psu, et à la salinité mesurée sur le terrain lors des échantillonnages (1,5 psu et 30 psu pour C. fluminea et S. plana respectivement), en présence ou en absence de nourriture, durant 2 et 7 jours. Au-delà de l'évaluation de la survie et des indices de conditions, une batterie de biomarqueurs a été mesurée. Les réponses biologiques étudiées relèvent des fonctions de défenses et de dommages de l'organisme. Des mesures (i) d'activités enzymatiques appartenant aux défenses antioxydantes et antitoxiques, (ii) des métabolismes mitochondriaux et respiratoires, (iii) des contenus en réserves énergétiques et des marqueurs structuraux ont été réalisées sur les glandes digestives des bivalves. Ces réponses ont été associées à l'évaluation du comportement d'enfouissement des deux espèces.

L'absence de mortalité durant la période d'acclimatation et d'exposition aux différentes salinités (1,5 et 15 psu pour C. fluminea ; 15 et 30 psu pour S. plana) est à noter. Le spectre de salinité tolérable par les organismes repose, la plupart du temps, sur ce seul paramètre. Par la suite, l'exposition des deux espèces modèles au seul paramètre de la salinité mais également à d'autres métriques telles que le temps d'exposition et le régime alimentaire, ont permis d'étudier les réponses physiologiques et comportementales aux niveaux sub-individuel et individuel.

L'évaluation de l'indice de condition a ainsi été réalisée car il représente un marqueur de l'état de santé général des deux organismes. Quelle que soit la salinité d'exposition, aucune variation de l'indice de condition des bivalves d'eau douce n'a été observée. En revanche, malgré l'exposition continue des organismes marins au rythme des marées en milieu naturel, une réduction de l'indice de condition a été observée lors de l'exposition à la condition hypo-saline (15 psu) par comparaison à la salinité du terrain (30 psu), probablement liée à l'augmentation de l'activité du métabolisme énergétique nécessaire au processus d'osmo-régulation mis en place par les organismes.

Des impacts négatifs de l'exposition en condition hyper-saline pour C. fluminea et en condition hypo-saline pour S. plana ont été mis en évidence sur le comportement, se traduisant par l'absence totale d'enfouissement des organismes. Le mécanisme d'enfouissement nécessite l'ouverture fréquente des valves des organismes. L'absence d'enfouissement pourrait donc être reliée à un comportement d'isolement vis-à-vis du milieu extérieur, ce qui semble confirmé par les observations visuelles faites durant l'expérience. Le comportement d'isolement du milieu par la fermeture des valves est néanmoins une solution sur le court terme. En effet, la fermeture prolongée des valves des organismes a pour conséquence l'augmentation de l'accumulation des produits toxiques de dégradation issus du métabolisme, de l'anoxie mais aussi de l'osmolarité. A plus long terme, cet isolement prolongé est susceptible d'influencer la réduction du taux de filtration et d'induire ainsi un retard de croissance chez les organismes. L'approche multi-marqueurs, réalisée en parallèle de l'étude comportementale des deux bivalves vivants sur le continuum eau douce-eau de mer, a permis de clairement séparer les réponses des deux espèces. Aux niveaux sub-individuel et individuel, les paramètres structuraux et énergétiques semblent être des biomarqueurs appropriés pour évaluer le stress salin sur ces deux bivalves. Chez les deux espèces, aucun effet combiné du temps d'exposition et de la salinité testée n'a été observé, tandis que l'absence de nourriture combinée à des variations de salinité semblerait induire une réduction du taux de métallothionéines et de l'activité de la caspase-3 chez S. plana et C. fluminea respectivement, en comparaison avec les organismes nourris. Ainsi, bien que sur le court terme seules les réponses sub-individuelles semblent en capacité de mettre en évidence une situation de stress, nos résultats indiquent que l'exposition des deux espèces à une salinité correspondant à leur limite de tolérance pourrait entraîner, à plus long terme, une dégradation de l'état général des organismes et contribuer en conséquence à la mise en danger des populations.

Chapitre III:

Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*

Carole Bertrand^{†‡}, Simon Devin[†], Catherine Mouneyrac[‡], Laure Giambérini[†]

(Acceptée dans Ecological Indicators (11/2016),

DOI : 10.1016/j.ecolind.2016.11.029)

[†]Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC, CNRS UMR 7360), Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, F-57070 Metz, France

[‡]LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

Abstract

The influence of global climate change will potentially alter the salinity of aquatic ecosystems. This represents a tremendous challenge for societies worldwide. Different sources of salinization (natural or anthropogenic) amplify the introduction of salt in rivers and streams, causing an increase of salt flowing down to estuarine and coastal areas. In this study, *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* have been selected because of their large tolerance for salinity variation (euryhaline organisms). They will allow the study of effect on the whole spectrum of salinity from fresh to marine waters respectively. The aim was to study the impact of experimental salinity stress at physiological, biochemical and behavioral levels by exposing both species to a salinity close to their limit range of tolerance, 15 practical salinity unit (psu), and at their field salinity (1.5 psu and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively) in the presence or absence of food during 2 and 7 days of exposure. Negative impacts of hyper saline condition for *C. fluminea* (15 psu) and hypo saline condition for *S. plana* (15 psu) have been measured at biochemical, physiological and behavioral levels. At sub-individual and individual levels, structural and energetic parameters and behavioral impairments seemed to be suitable biomarkers to assess salinity stress on *C. fluminea* and *S. plana*. After exposure to the limit of salinity tolerance (15psu) for both organisms, fitness modifications could appear, and may participate in endangering populations.

Highlights:

- Salinity tolerance is generally only assessed through mortality or condition index
- Two euryhaline species were exposed to their range limit of salinity tolerance
- Physiological and behavioral responses evidenced a marked effect of salinity variation
- Salinization may threaten even euryhaline species

Keywords: *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, ecophysiology, salinity, biomarkers.

1. Introduction

Global change is predicted to induce major ecological impacts in the next century, on every ecosystem. Aquatic ecosystems are particularly threatened, undergoing acidification, multiple sources of pollution, temperature and salinity changes (Field et al., 2014). Global climate changes present tremendous challenges for the worldwide societies. The alteration of salinity levels in the aquatic environment can have a natural origin (primary salinization such as weathering of rocks, wind and rain depositing salt) and anthropogenic sources (secondary salinization such as salt mining, industrial discharges or road de-icing). All these sources amplify the introduction of salt in rivers and streams, leading to an increase in the amount of salt flowing down to estuarine and coastal areas (Cañedo-Argüelles et al., 2013). On the other hand, in estuary and coastal areas undergoing tidal events, freshwater inputs coming from rivers or extreme precipitations could induce hyposaline stress (Levinton et al., 2011).

Aquatic organisms are able to tolerate only defined ranges of water salinity and so the input of salt in freshwater induced by the anthropogenic sources combined with climate change has been defined as one of the most important stressors for freshwater ecosystems. These changes may have social and economic consequences (safe drinking water, water used for irrigation in agriculture) and affect biodiversity and ecosystem functioning (Reid et al., 2005). Estuarine organisms are continuously subjected to wide variations of salinity depending on the season, the river flow and the tidal rhythm. A growing attention is paid in ecotoxicology to the fresh waters – marine water continuum, with the variations of physico-chemical conditions that affect the fate and ecotoxicity of toxicants (Nôges et al., 2016). Benthic bivalves are defined as good aquatic bioindicators that represent both water column and sediment (Carregosa et al., 2014). *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* belonging to this group have been widely used as sentinel organisms in biomonitoring programs of freshwater and coastal areas respectively (Mouneyrac et al., 2008; Sousa et al., 2008, Fossi-Tankoua et al., 2011). They both have a key role in ecosystem structure and functioning, and get a wide geographical distribution. Both species are infaunal benthic organisms that can either feed in suspended particles or remove organic matter from the sediment by pedal feeding. Therefore, considering these organisms as ecosystem engineers (bioturbation activity), they have various impacts on habitat structure, biomineralization, oxygenation and benthic and planktonic community structures (Karatayev et al., 2007).

In the present work, we focused on these two euryhaline bivalves, *C. fluminea* and *S. plana*, presenting an overlap in their range of salinity tolerance, and encompassing the whole spectrum of salinity in fresh and estuarine/marine waters. The global aim was to understand biochemical, behavioral and physiological consequences of salinity changes on those two species in the framework of biomonitoring.

To extract the particular assemblage of halite, sulfates, carbonates and clays, several mines were opened 150 years ago in the Lorraine region (Fanlo and Ayora, 1998). Additionally, the artificial increase in salinity caused by human activity is widely documented in Europe, where potassium and sodium industries are highly developed. Consequently, an increase of salinity has been measured in the Moselle River caused by runoff events and the proximity of two tributaries that flow on salt bedrock. This combination of geological factors and anthropogenic activities led to a high salinity (1.5 practical salinity unit (psu)) for a freshwater ecosystem. *C. fluminea* tolerates a range of salinity between 1 to 13 psu (Morton and Tong, 1985) and after acclimatization they may survive at the maximal salinity of 24 psu (Evans et al., 1977). In estuarine and coastal areas, organisms are regularly subjected to huge variations of salinity under the influence of tidal change and run-off from rivers. *S. plana* optimal salinity is 20- 30 psu and their lowest tolerance limit is 5 psu (Verdelhos et al., 2015). Despite a general acceptance of osmoregulatory mechanisms set up by freshwater and estuarine bivalves to cope with salinity variations, there is little evidence of salinity effects at the biochemical (Carregosa et al 2014) and behavioral levels. Several experiments showed in freshwater organisms that hyper salinity variations induced a reduction of survival rate and modification of behavior responses such as valve closure leading to soft tissues isolation and the activation of anaerobic metabolism (Ferreira-Rodríguez and Pardo, 2016; Evans et al., 1977; Gosling 2003). Decrease of water content and modification of uptake of L- and D-alanine (Matsushima and Yamada, 1992; Koyama et al., 2015) have been observed on freshwater organisms under hypersaline stress. These studies have shown that euryhaline organisms have a high capacity to cope with salinity variation, due to metabolic changes. In estuarine organisms, studies conducted to define the impacts of hyposaline variation showed an increase of oxygen uptake and a reduction of filtration rate (Hamer et al., 2008; Navarro, J.M., 1988; Navarro and Gonzalez, 1998; Akberali, H.B., 1978) and negative correlation between acetylcholinesterase activity and valve closures (Freeman and Rigler, 1957; Pfeifer et al., 2005). Hyper salinity induced oxidative stress in the bivalve *Venerupis philippinarum* revealed by the induction of defence biomarkers as catalase, total antioxidant capacity, glutathione-S-transferase. In order to maintain the ionic equilibrium through osmoregulation processes, it can be hypothesized that organisms exposed to a gradient of salinity will rapidly mobilize their energetic reserves such as glycogen and protein contents (Carregosa et al., 2014).

Therefore, the purpose of this study was to investigate ecophysiological impacts of salinity stress by laboratory exposure of the *C. fluminea* and *S. plana* to a salinity of 15 psu, close to their limit range of tolerance. Both species were also exposed to 1.5 or 30 psu, corresponding respectively to their optimum salinity medium. We made the hypothesis that bivalves exhibited biochemical, physiological and behavioral responses to cope with the higher oxidative-stress and energy demand resulting from hyper and hypo saline conditions for *C. fluminea* and *S. plana*, respectively.

Biomarkers at the subindividual level involved in oxidative-stress defences (CAT, TAC, glutathione peroxidase: GPx, GST, metallothionein: MT), cellular damage (lipid hydroperoxides: LOOH acid phosphatase: ACP), apoptosis induction (caspase-3 like: CSP) and energy and structural demand (protein: Prot, triglycerides: Trigly, cholesterol: Chol, electron transfer system: ETS, lactate dehydrogenase: LDH) have been quantified in bivalves exposed to different salinity regimes in the presence or absence of food during 2 and 7 days of exposure. At the individual level, behavioral biomarker (burrowing activity) has been measured.

2. Materials and Methods

2.1 Chemical compounds used

All chemical reagents were purchased from Sigma Aldrich (Chemical Co, St Louis, MO) and Thermo-Scientific (Waltham, Massachusetts) products. To provide replication of medium for all experiments, tests were conducted using artificial seawater Tropic Marine® (Tropicarium Buchshlag Dreieich Germany) (Mouneyrac et al., 2002).

2.2 Collection and acclimatization of organisms

C. fluminea and *S. plana* organisms were collected in June 2014 at Argancy in the Moselle River (49° 19'48'58''W, 6° 19'81.11 N, France) and in the intertidal mudflat located on the French Atlantic coast (1° 59'04'80''W, 47° 01'50.35'' N, Bay of Bourgneuf, France), respectively. Physico-chemical parameters of surface water of the collection sites were measured with the multiparameter system ODEON (Ponsel, Caudan, France) in the Moselle river (pH: 7.5; salinity: 1.5 psu; conductivity: 2.38 mS cm⁻¹) and in the Bay of Bourgneuf (pH: 8.1; salinity: 31.2 psu; conductivity: 30.88 mS cm⁻¹). Only 15 to 20 mm ranging shell length bivalves were selected, avoiding potential influence of sexual maturity. Animals were then transported to the laboratory in plastic coolers alongside sediment extracted from the site. Bivalves were placed into aerated artificial seawater (Tropic Marine®) at 1.5 psu or 30 psu for *C. fluminea* or *S. plana* respectively, during three days in a temperate controlled room at 15°C (temperature measured at the time and site of collection).

2.3 Experimental design

The experimental design is illustrated in Figure 1.

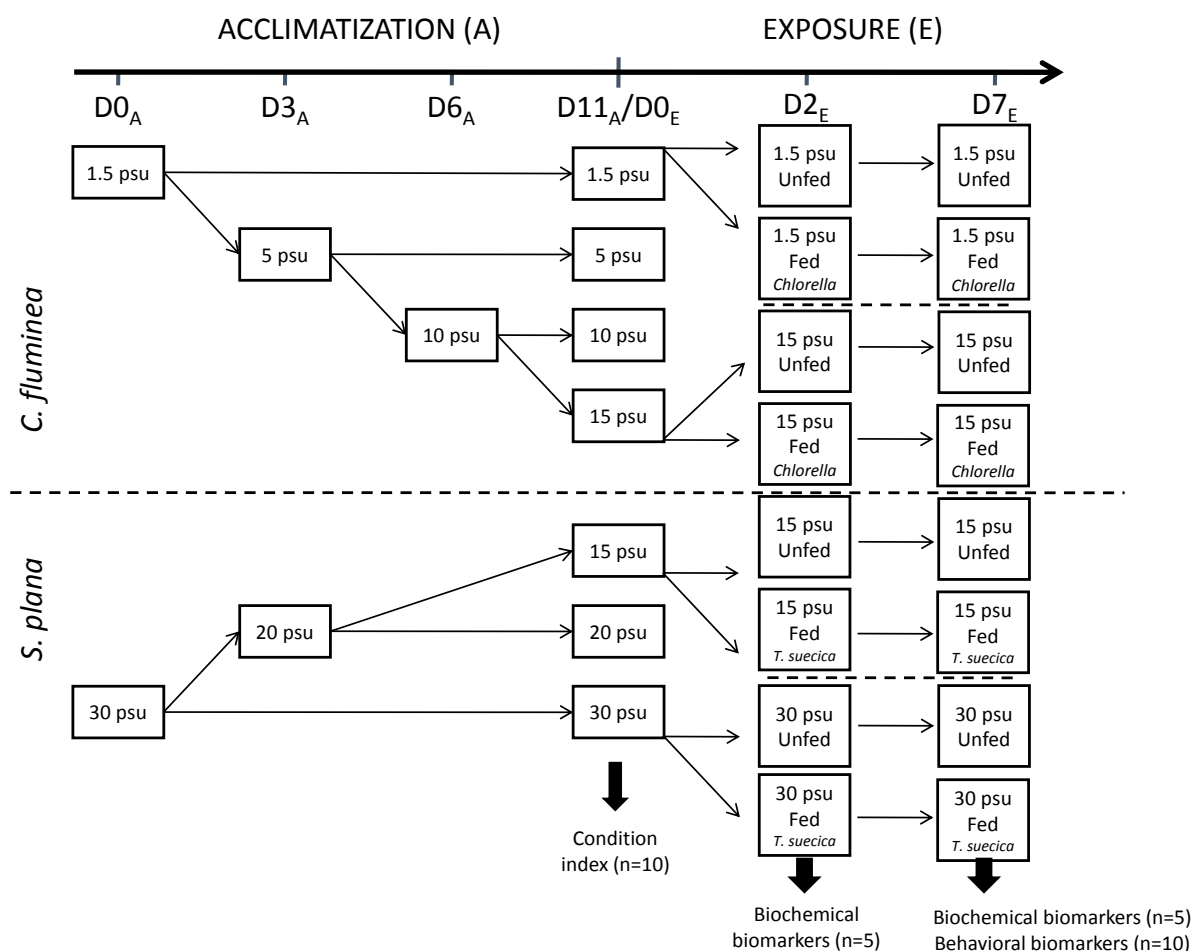


Figure 1: Flowchart of the exposure protocol of both organisms (*C. fluminea* and *S. plana*).

From the field salinity, 1.5 and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively, bivalves were progressively transferred, by a 3-day step by step acclimatization, placing them into plastic tanks (50 L) with artificial seawater at salinity of 5, 10 and 15 psu for *C. fluminea* and 20 and 15 psu for *S. plana* under continuous aeration. For each bivalve species, a control group of organisms was kept in artificial water adjusted to the field salinity: 1.5 psu for *C. fluminea* and 30 psu for *S. plana*.

Bivalves (n=10 for each species and per tested salinity) were introduced into beakers (3L) containing artificial water at both tested salinities (*C. fluminea*: 1.5 and 15 psu and *S. plana*: 15 and 30 psu) and aerated 2 hours/ day to maintain oxygen levels near saturation. Salinity, pH, conductivity, oxygen rate were measured every day. The species were exposed during 2 and 7 days under two diet conditions (unfed or fed). *S. plana* and *C. fluminea* were fed with unicellular algae, *Tetraselmis suecica* and *Chlorella sp.* respectively at 10^5 cells/ mL.

2.4 Mortality and biological indices

Mortality (inability to close the valves upon mechanical stimulus) was monitored daily during the whole experiment period.

At each exposure salinity for both organisms (1.5, 5, 10, 15 psu and 30, 20, 15 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively), a group of organisms (n=10) has been stocked during 11 days (acclimatization period), to determine the condition index (CI). Briefly, the soft tissues of clams were weighed and dried into a drying oven (45°C - 2 days) to measure their dry weight after acclimatization. To calculate biological indices, dry weight of tissues is generally used, avoiding variations of water amount in soft tissues. This amount might be related to various factors, physiological (e.g. osmoregulation) and/or contamination (Lucas and Beninger, 1985). Bivalves CI have been calculated with this formula: $CI = (\text{total dry tissue weight} / \text{total dry weight}) \times 100$.

2.5 Biochemical biomarker analysis

Biomarkers have been measured in the digestive gland of bivalves since this organ is heavily involved in metabolism activities of the tested physiological functions. At each sampling date (2 and 7 days), the digestive glands of clams were dissected, weighed and placed in liquid nitrogen. Then, samples were stored at -80°C until biochemical analysis. Biomarker measurements were conducted using the automated chemistry analyzer Konelab 20 Xti (Thermo Scientific). Antioxidant and antitoxic defences (TAC, GPx, GST, CAT, ACP), structural and energetic parameters (Trigly, Chol, Prot, LDH, ETS), cellular damages (LOOH) and apoptosis induction (CSP) were measured using protocol developed by Garaud et al. (2016) and adapted for both species *C. fluminea* and *S. plana* (Bertrand et al., 2016). Details of analysis methods are fully described in Garaud et al., 2016 ; Bertrand et al., 2016. To determine metallothioneins (MTs) in the digestive gland (n=5 per treatment), differential pulse polarography (DPP) analysis was used as explained in details in Mouneyrac et al. (2002).

2.6 Behavioral experiments

At the end of the experimental time (7 days), burrowing tests were conducted on organisms following the methodology described by Bonnard et al. (2009). The sediment used for burrowing experiments was an artificial sediment mixture composed of 90% of quartz (0.05/2mm), 9% of kaolinite (2-10µm) and 1% of CaCO₃. Artificial sediment was homogenized by hand and mixed with water at each tested salinity (1.5 or 15 psu for *C. fluminea* and 30 or 15 psu for *S. plana*). The artificial sediments were prepared one day before experimentation to allow for sedimentation of the particle in the water column and to stabilize the temperature of the system (15°C). Bivalves (n=10 per treatment) were placed at the sediment surface in the dark. Number of burrowed individuals was assessed during 6 hours at different time intervals (Bertrand et al., 2016).

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using R (R Core Team, 2014). To measure the homoscedasticity and normality, the results were tested using Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. In case one assumption was not verified, the results were log-transformed using the version of the data.

To evaluate combined effects of food, time and salinity, a three-way Anova with an interaction term was performed using a threshold of $p < 0.05$ considered as significant. If neither the raw data nor the log-transformed one achieves the conditions for a parametric test, Kruskal-Wallis test was used.

To describe the burrowing kinetics of individuals over time a generalized nonlinear model fully described in Buffet *et al.*, (2014) was applied on the burrowing data.

To evidence the difference of biomarker responses between each species, a principal component analysis (PCA) was performed. Indeed, it is indispensable to use statistical tools to complement the interpretation of the results (Mahdizadeh Khasraghi *et al.*, 2015; Valipour *et al.*, 2015). To describe biochemical and physiological modifications for both species in our exposure condition, Partial least-squares Discriminant Analysis (PLS-DA) was carried out. Such analysis allowed describing the relationships between the whole battery of biomarkers (independent variables) and exposure conditions (dependent variables).

Important biomarkers were selected based on the VIP (Variable Importance in the Projection) values, with a threshold value of 1, according to Eriksson *et al.*, (1999). Exposure conditions were then plotted on a factorial plane combining the two first axis of the PLS-DA, while variables were plotted on a correlation circle, giving the correlation of each variable with the axis of the PLS-DA. Only variables with $VIP > 1$ were plotted. Finally, Hotelling T^2 tests with a Benjamini and Hochberg risk correction (Benjamini and Hochberg, 1995) were performed between exposure conditions, to assess the effect of the three studied factors on the biomarker battery.

3. Results

3.1 Mortality and condition index

No mortality was observed for both species during the acclimatization period (11 d) or during the whole duration of the experiment (7 d) for all tested salinities.

No significant differences (data not shown) of the CI of *C. fluminea* were observed between all tested salinities (1.5, 5, 10 and 15 psu) after the acclimatization period of 11 days (Kruskal-wallis test, $p=0.31$). CI of *S. plana* after the acclimatization period (11 days) at the three salinities (15 psu, 20 psu, 30 psu) is illustrated on Figure 2.

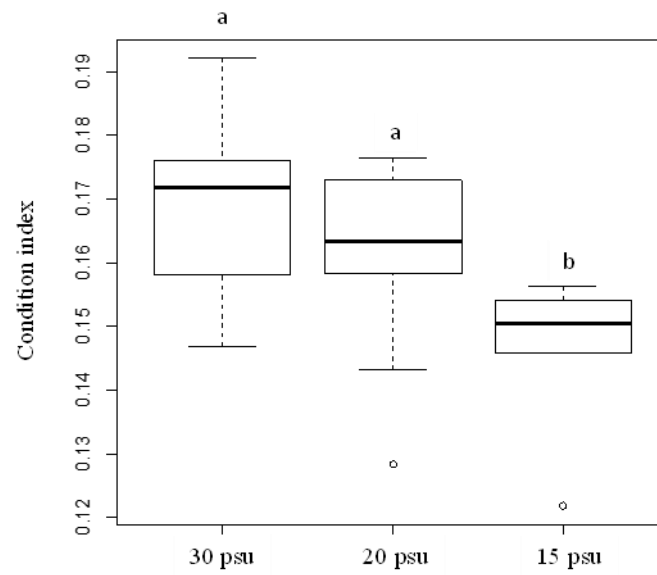


Figure 2: Condition index of *Scrobicularia plana* after 11 days of acclimatization at three salinities (30 psu, 20 psu or 15 psu).

No significant differences of the CI of *S. plana* were observed between 30 psu and 20 psu (Kruskal-Wallis test, $p=0.82$). In contrast, at the end of the acclimatization period (11 days) at the lowest tested salinity (15 psu), CI of *S. plana* was significantly (Kruskal-Wallis test, $p=0.01$) lower compared with 30 and 20 psu.

3.2 Biochemical biomarker analysis

Detailed biomarker results are described in supplementary data (Table S1). The results of the three-way ANOVAs performed on each biomarker for both species are shown in Table 1.

Table 1: Results of three-way ANOVAs (p values) performed on each biomarker. Modification of data were done for ETS (¹: Kruskal-Wallis test) and GST (²: log- transformed data).n.s: not significant

	<i>C. fluminea</i>			<i>S. plana</i>		
	Time	Food	Salinity	Time	Food	Salinity
Trigly	n.s.	n.s.	<0.001	0.03	n.s.	n.s.
Chol	n.s.	n.s.	<0.001	n.s.	n.s.	0.012
Prot	n.s.	n.s.	<0.001	n.s.	0.048	n.s.
ETS	n.s. ⁽¹⁾	n.s. ⁽¹⁾	n.s. ⁽¹⁾	n.s.	n.s.	n.s.
ACP	0.004	n.s.	0.03	n.s.	n.s.	n.s.
GST	n.s.	n.s.	0.03	n.s.	0.042 ⁽²⁾	n.s.
TAC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDH	n.s.	n.s.	0.01	0.042	n.s.	0.021
CSP-3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.043	n.s.
CAT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MT	0.019	<0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LOOH	n.s.	n.s.	n.s.	0.003	n.s.	n.s.

C. fluminea was mainly impacted by salinity, with 6 biomarkers exhibiting significant differences between 1.5 and 15 psu. For Trigly, Chol and Prot concentrations, an overall significant decrease at the highest salinity was observed. The same trend was evidenced for ACP and GST activities, while an increase in LDH activities was observed at 15 psu. Food and exposure time effects were less pronounced, with only one and two significant differences respectively. Unfed individuals exhibited lower MT concentrations. ACP activity was lowered at 7 days of exposure. MT concentrations were also affected by exposure time, but the pattern was less evident, with an increase at 7 days only at 1.5 psu, and contrasted results at 15 psu.

In the meantime, *S. plana* seemed to be less affected by salinity shift, with only two biomarkers that increased significantly at the lowest salinity of 15 psu, Chol concentrations and LDH activity. Food and exposure time induced significant shifts of three biomarkers. Prot concentration and GST activity increased in unfed organisms, while CSP-3 activity was higher in fed organisms. Finally, LOOH activity decreased between 2 and 7 days of exposure, while Trigly concentrations increased with time. The general trend for LDH activity was also an increase at 7 days, even if not observed for unfed organisms at 15 psu.

An integrative approach was then developed to consider all the biomarkers studied at once. We first focused on inter-species differences through a PCA. All the quantified biomarkers were well represented on the correlation circle (Figure 3), excepted CSP-3, ETS and CAT.

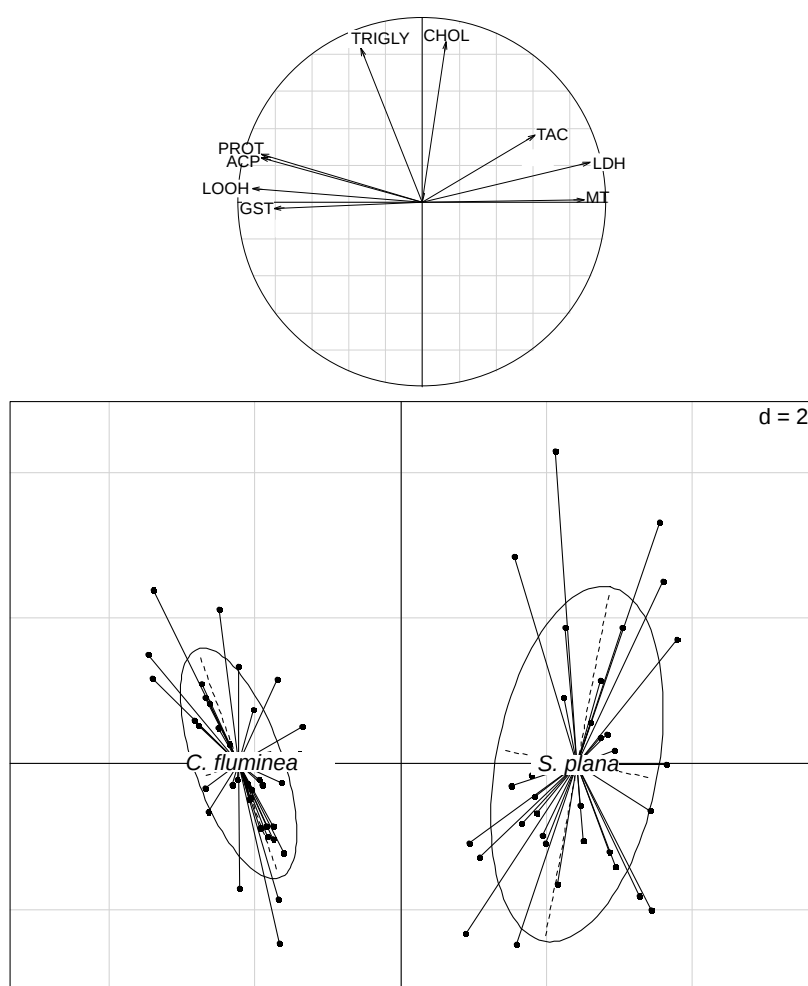


Figure 3 : Principal component analysis of the biomarker responses in *C. fluminea* and *S. plana* exposed for 2 and 7 days to different salinities (1.5; 15; 30 psu) under two diets (fed and unfed regime).

The factorial plane represents individuals regrouped according to the species, all the other sources of variability being included within each ellipse. It thus evidenced that the factor species account much more than salinity, time and food in explaining the dataset overall variance. The first axis (F1) and the second axis (F2) explained 48.6 % and 15.4 % of the variance respectively. The two species were well separated along the F1 axis, with *C. fluminea* exhibiting higher ACP, GST, LOOH and Prot values than *S. plana*. The latter got higher basal levels for MT, LDH and TAC.

Given these inter-species differences, separated PLS-DA were performed for each species and results of Variable Important in the Projection (VIP) were reported in Table 2.

Table 2: Results of Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) conducted with experimental groups under two salinity conditions (1.5 and 15 psu or 15 and 30 psu) for both species *C. fluminea* and *S. plana*- Variable Important in the Projection (VIP) in curve bold reflecting the most important predictor biomarkers.

	<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>
Biomarker	VIP	VIP
Prot.	1.28	1.07
Trigly.	1.27	1.00
Chol.	1.26	1.13
LOOH	0.63	1.29
ETS	0.14	0.59
ACP	1.31	0.70
GST	0.73	1.14
TAC	0.46	0.71
CSP-3	0.68	1.04
LDH	0.69	1.15
MT	1.71	0.84
CAT	0.63	1.09

For *C. fluminea*, the most important biomarkers (VIP > 1) (Table 3) were structural and energetic parameters including Prot, Trigly, and Chol, coupled with antioxidant defences (MT) and cellular damage (ACP) (Figure 4).

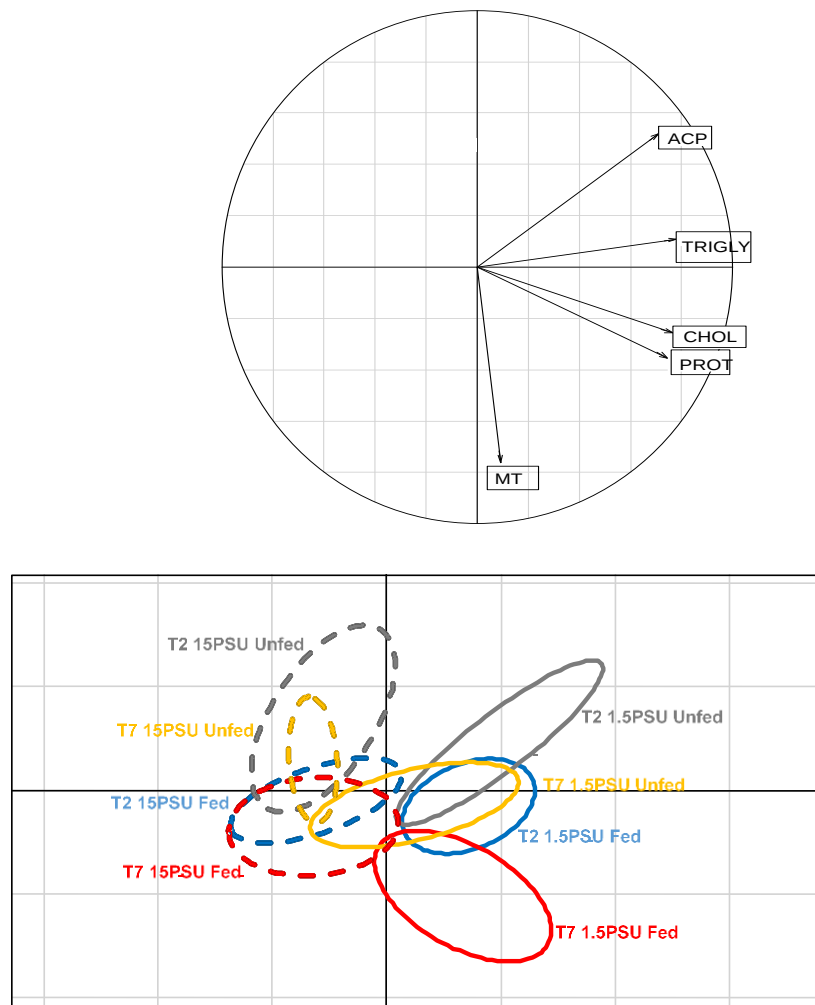


Figure 4: PLS-DA of *C. fluminea* exposed to two salinities (1.5 and 15 psu) to two diets (fed and unfed condition) after 2 and 7 days of exposure.

The factorial planes evidenced an overall pattern related to salinity on the first axis and to food on the second axis. Hotelling T^2 showed only a significant salinity effect between organisms exposed during 2 days under unfed condition at 1.5 psu compared to 15 psu. The biomarker responses were similarly affected by the diet condition (fed or unfed) for each salinity and exposure time combination.

For *S. plana*, the most important biomarkers ($VIP > 1$) (Table 2) were also the structural and energetic parameters including Prot, Trigly, Chol and LDH, coupled with antioxidant defences (GST, CAT), cellular damage (LOOH) and apoptosis induction (CSP-3) (Figure 5).

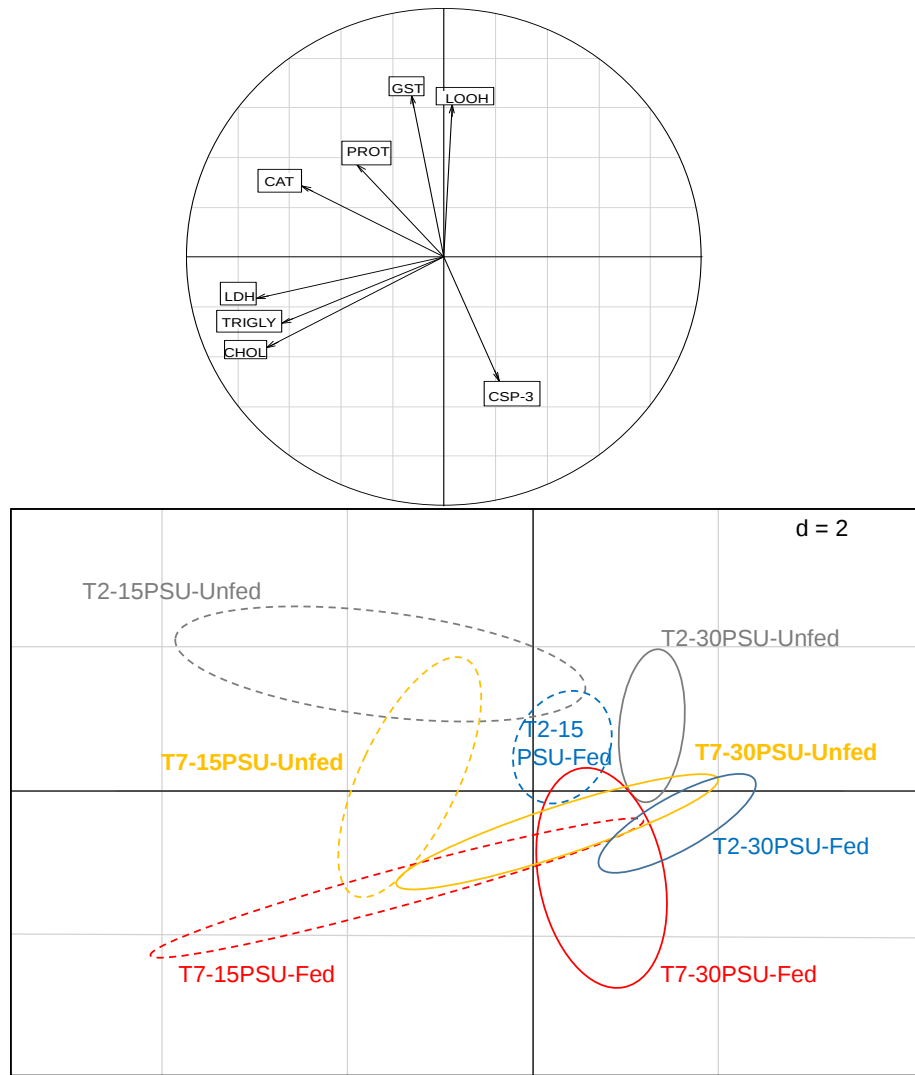


Figure 5: PLS-DA of *S. plana* exposed to two salinities (30 and 15 psu) to two diets (fed and unfed condition) after 2 and 7 days of exposure.

The factorial planes evidenced an overall pattern related to salinity on the first axis and to food on the second axis as previously observed in PLS-DA of *C. fluminea*. Hotelling T^2 evidenced no significant differences according to exposure time between organisms exposed at the same salinity and under the same diet regime. Food condition modified biomarker responses at T2 only. Finally, salinity influence has been significantly measured by Hotelling R^2 between fed organisms exposed during 2 days at 30 psu compared to 15 psu. Unfed organisms exhibited higher levels of GST and LOOH, and a lower CSP-3 activity.

3.3 Behavioral biomarker

The burrowing kinetics of both species measured after 7 days of exposure to the different treatments are illustrated on Figure 6.

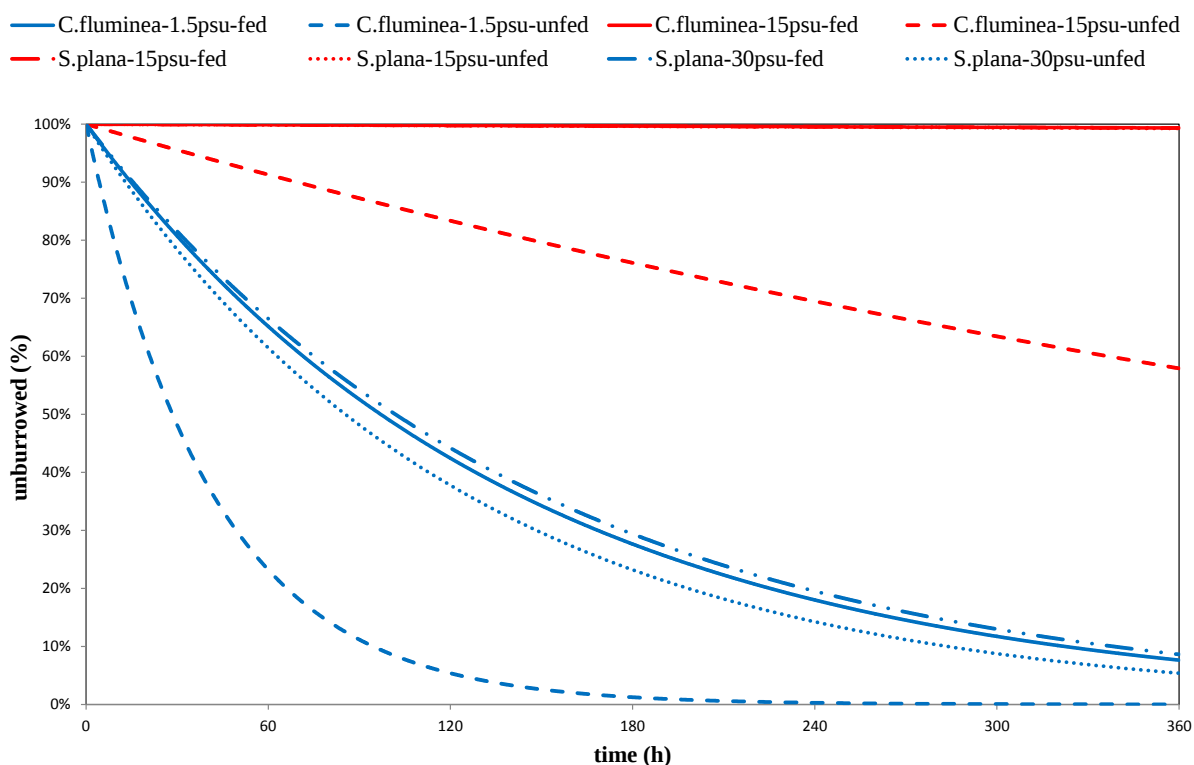


Figure 6: Burrowing kinetics after 7d for *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* exposed at each salinity (1.5/ 15 psu and 15/ 30 psu respectively) and at each diet condition (fed and unfed) describing the proportion of unburrowed individuals over time. In blue. Optimal salinity (1.5 and 30 psu *C. fluminea* and *S. plana* respectively) and in red stressed of salinity (15 psu for both species).

Compared to their respective optimal salinity, in both species, the stressed salinity of 15 psu reduced significantly the burrowing kinetics of bivalves. Greater significant burrowing activity was shown in unfed *C. fluminea* at 1.5 psu and 15 psu vs fed specimens. It must be duly noted that no burrowing activity was observed for fed *C. fluminea* at 15 psu and fed and unfed *S. plana* at 15 psu.

4. Discussion

In the present work, a synthetic overview of the salinity effects on clam biology was assessed using different statistical approach including PCA and PLS-DA to: i) clearly differentiate both species responses (*C. fluminea* and *S. plana*), ii) identify biochemical, physiological and behavioral effects of salinity changes and iii) understand the combined effect of exposure time and food status (fed or unfed) with salinity.

4.1 Responses at individual level (mortality, condition index and behavior)

No mortality after the acclimatization period or during the whole exposure period to hypo or hyper saline conditions for *C. fluminea* and *S. plana* has been observed. As previously suggested by Evans et al. (1977), salinity tolerance determined by mortality assessment (incapacity of shell closure) might not be a relevant criterion of the real physiological state of body. Consequently, (eco) physiological responses after an acclimatization period to a gradient of salinity were determined using the condition index (CI). This method ascertains the apparent health and the physiological activity (reproduction, growth) of the species. In *C. fluminea*, no difference of CI was observed. The ability to deal with salinity stress may depend on different adaptations including osmoregulation systems (Signoret and Brailovsky, 2004). These clams tolerated a hyper saline condition (15 psu) which can be explained by physiological vestige of brackish water ancestry (Evans et al., 1977). Although *S. plana* underwent tidal rhythm inducing salinity variation, total tissue content decreased significantly according to hypo saline condition (15 psu) compared to optimal salinities (30-20 psu). (Hamer et al., 2008) showed also a trend of the CI decline in *Mytilus galloprovincialis*. The lower CI could be linked to an increase of energy cost activities to cope with salinity changes.

Burrowing activities highlight behavioral escape responses to a salinity variation. Absence of burrowing activities has been detected after an exposure to the limit of salinity tolerance (15 psu) in both organisms. Previous studies from Fossi-Tankoua et al. (2011) showed also a potential influence of hypo saline condition on burrowing responses in *S. plana*. Schoffeniels and Gilles (1971) explained that shell closing mechanism operates to maintain a hyperosmotic state in estuarine bivalves such as *S. plana*. Modifications of behavioral responses may inform on the environmental stress and could be connected to the survival rate of the organisms. Indeed, reduction of burrowing kinetic may be linked with increase of predation risk and consequently on the population maintenance. At individual levels, shell closure represents only a solution for a short period to protect tissues and organs from salinity variations. A prolonged segregate from the environment has for consequence an increase of osmolarity, anoxia and accumulation of waste products (substrate and metabolic acidification) into the shell (Sokolova et al., 2000; Vinu Chandran, 2002). These mechanisms might also reduce the feeding rate inducing a reduction of organisms' growth. Moreover, burrowing kinetic for *C. fluminea* at both tested salinity are largely influenced by the absence of feeding during the experiment. The rapid burrowing kinetic of the unfed *C. fluminea* at both salinities tested highlighted particular questions such as how different diets may impact behavioral responses on bivalves. Furthermore, behavioral responses is limited by the lack of knowledge on influence of suspension and deposit feeding (Vaughn and Hakenkamp, 2001). Conducting future experiments on behavioral responses would be of particular interest.

4.2 Responses at sub-individual level (biochemical biomarker)

Mechanisms such as reduction of total tissue content as energetic reserves in *S. plana* and reduction of burrowing activity for both species allowed coping with salinity variation.

Projection of biomarker responses using PCA for both species exposed for 2 and 7 days to different salinities (1.5; 15 and 30 psu) under two diet (fed and unfed) regimes permitted to clearly differentiate two response patterns according to the species. Although both endobenthic bivalves have been selected because of their niche similarity (trophic and habitat dimensions, *C. fluminea* as a freshwater counterpart of the estuarine *S. plana*) we observed that basal levels of biomarker responses were different for each specie tested. According to these information, biomarker approach has been evaluated separately for each species.

In *C. fluminea*, structural and energetic parameters (Prot, Trigly, Chol) were significantly more consumed at 15 psu compared to the field salinity (1.5psu) translating the energy cost of the stabilization of osmotic ratio.

A significant decrease of ACP activity was observed at 15 psu compared to field salinity (1.5 psu). The enzyme activity of ACP, mainly localized in lysosome, plays an essential role in the mechanisms of intracellular digestion (Seitkalieva et al., 2015). In the present study, *C. fluminea* dealt with hyper saline condition by closing its shell, causing anoxia condition. This mechanism was associated with a suppression of enzyme metabolism such as ACP and protein synthesis (Carregosa et al., 2014). No combined effect of exposure time and salinity variation was observed. Nevertheless, salinity variations (1.5 and 15 psu) were combined with food status effect. MT levels in unfed organisms were significantly reduced compared to fed ones.

For *S. plana*, we observed an absence of burrowing activities at 15 psu, whatever the feeding status is, which could have for consequence the conservation of levels of structural and energetic parameters (Prot, Trigly, Chol). As for *C. fluminea*, by closing their shell, the organisms generated anoxia conditions. Another biomarker used in this study, LDH enzyme activity located in the cytoplasm of the cells, notify the involvement of anaerobic glycolysis by reversible oxidation of lactate to pyruvate. Consequently, the increase of LDH activity observed at 15 psu compared to 30 psu could be related to the mobilization of anaerobic energetic resources using glycolysis pathway. For *S. plana* organisms exposed to hypo saline condition, we observed an induction of CAT responses. CAT is an enzyme belonging to antioxidant defense mechanisms catalyzing the dismutation of H_2O_2 to H_2O and O_2 and is able to cope with oxidative processes (Jourmi et al., 2015). Higher CAT values under hypo saline condition (salinities 7 and 14 g/L) for *V. corrugate* have been observed compared to salinities of 21 and 28 g/L (Carregosa et al., 2014). This result revealed that hypo saline condition induced oxidative stress in *S. plana* by increased antioxidant enzyme activities such as CAT compared to organisms exposed to their field salinity (30 psu). No combined effect of exposure time and salinity variation has been observed. Nevertheless, salinity variations (30 and 15 psu) were combined with effect of food status.

CSP-3 activity in unfed organisms were reduced compared to fed ones, that could be explained by an apoptosis process that eliminate cells presenting important DNA damage and leaving only viable cells containing a low CSP-3 activity. Moreover, GST and LOOH activities were greater in unfed clams compared to fed organisms.

The results for both species exposed at their limit tolerance of salinity (15 psu) showed that salinity variation and combined effect of food status affected and modified their biochemical, physiological and behavioral mechanisms. *C. fluminea* exposed to hyper saline condition underwent modification at biochemical (Prot, Chol, Trigly, ACP) and behavioral (no burrowing activity) levels. Although *S. plana* underwent a tidal rhythm inducing regularly salinity variations, they were also affected by hypo saline condition at biochemical (Prot, Chol, Trigly, LDH, CAT), physiological (reduction of CI) and behavioral (no burrowing activity) levels. In order to cope with hypo or hyper saline conditions defined as stress condition, both organisms induced activation or depletion of biomarkers to survive under their limit of salinity tolerance. At sub-individual and individual levels, structural and energetic parameters and behavioral impairment respectively seemed to be suitable biomarkers to assess salinity stress (15 psu) on *C. fluminea* and *S. plana*. After exposure to this limit of salinity tolerance (15psu) for both organisms, fitness modifications including reduction of reproduction, growth and capacity in predator avoidance could appear. Conclusively, these fitness modifications may participate in endangering populations.

Conclusion

The rise of sea levels combined with the increase of storms could be listed as phenomena caused by global climate change in the aquatic environment (Durack and Wijffels, 2010). These environmental modifications could impact the salinity levels across the fresh-marine continuum (Durack et al., 2014) and consequently induce modifications of biological responses. The present study highlighted the effects of hypo or hyper saline conditions expected as a result of global climate change. Negative impacts on aquatic invertebrate species such as *C. fluminea* and *S. plana* have been reported. Both hypo and hyper salinity caused negative impact at biochemical, physiological and behavioral levels in the two euryhaline bivalves. In order to understand the importance of disturbance in organisms and the possible repercussions on population level, it remains indispensable to assess the behavior of organisms as a biomarker of stress (Amiard-Triquet, 2009) including condition index and burrowing activity associated with different target biomarkers such as structural and energetic parameters, antitoxic defenses and cellular damage. Despite an acclimatization period to salinity, modifications at sub-individual and individual levels have been measured as a mechanism to tolerate the salinity variation during a short exposure time (7d) (Dunlop et al., 2005). Consequently, it would be expected that during a longer period which is not an unrealistic experience, the resilience of the species may be reduced. The situation could also induce an increase of organism vulnerability to pollutants or other abiotic variations (Sokolova et al., 2000). Moreover, the reduction of burrowing activity can be linked with different parameters such as food seeking and predator avoidance (Little et al., 1990).

The present study reported that starvation condition for both organisms induced antioxidant responses. Knowing the important link of both these organisms in the food chain, these results showed a negative impact of the stress salinity (15 psu) on both organisms. Consequently, it will be indispensable to pay special attention to biotic and abiotic fluctuations such as food status and salinity during future research.

Acknowledgements. Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) for C. Bertrand PhD salary and running costs, CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR-10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology.

Bibliography

- Akberali, H.B., 1978. Behaviour of *Scrobicularia plana* (Da Costa) in water of various salinities. J.Exp.Mar.Biol.Ecol 33, 237–249.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J. 15, 87–110. doi:10.1080/10807030802615543
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J.R.Statist.Soc.B 57, 289–300.
- Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. doi:10.1002/etc.3428
- Bonnard, M., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J. 15, 11–26. doi:10.1080/10807030802614934
- Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Lopes, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibolini, M., Gilliland, D., Perrein-Ettajani, H., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. Chemosphere 100, 63–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.069
- Cañedo-Argüelles, M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.-J., 2013. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. Environ. Pollut. 173, 157–167. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.011

- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2014. Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 177-178, 1–9. doi:10.1016/j.cbpb.2014.08.001
- Chapman, P.M., Wang, F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 3–22.
- Dunlop, J.E., McGregor, G., Horrigan, N., 2005. Characterisation of impacts and a discussion of regional target setting for riverine ecosystems in Queensland, in: *Potential Impacts of Salinity and Turbidity in Riverine Ecosystems*, Aquatic Ecosystem Health Unit Water Quality and Monitoring Natural Resource Sciences. The National Action Plan for Salinity and Water Quality, p. 64.
- Durack, P.J., Wijffels, S.E., 2010. Fifty-Year Trends in Global Ocean Salinities and Their Relationship to Broad-Scale Warming. *J. Clim.* 23, 4342–4362. doi:10.1175/2010JCLI3377.1
- Durack, P.J., Wijffels, S.E., Gleckler, P.J., 2014. Long-term sea-level change revisited: the role of salinity. *Environ. Res. Lett.* 9, 114017. doi:10.1088/1748-9326/9/11/114017
- Eriksson, L., Johansson, E., Katteneh-Wold, S., 1999. Introduction to Multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA and PLs). *Umetrics Umea Seden* 225–246.
- Evans, L.P., Murphy, C.E., Britton, J.C., Newland, L.W., 1977. Salinity relationships in *Corbicula fluminea* (Müller 1774). *First Int. Corbicula Symp.* 193–214.
- Fanlo, I., Ayora, C., 1998. The evolution of the Lorraine evaporite basin: implications for the chemical and isotope composition of the Triassic ocean. *Chem. Geol.* 146, 135–154.
- Ferreira-Rodríguez, N., Pardo, I., 2016. An experimental approach to assess *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) resistance to osmotic stress in estuarine habitats. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 176, 110–116. doi:10.1016/j.ecss.2016.04.017
- Field, C.B., Barros, V.R., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Abdrabo, M.-K., Adger, N., Anokhin, Y.A., Anisimov, O.A., Arent, D.J., Barnett, J., 2014. Summary for policymakers. *Clim. Change 2014 Impacts Adapt. Vulnerability Part Glob. Sect. Asp. Contrib. Work. Group II Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Change* 1–32.
- Fossi-Tankoua, O., Buffet, P.-E., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C., Berthet, B., 2011. Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1253–1263. doi:10.1007/s11356-011-0479-3
- Freeman, R., Rigler, F., 1957. The responses of *Scrobicularia plana* (da Costa) to osmotic pressure changes. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 36, 553–567.
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016a. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* in press.

- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016b. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–10. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Gosling, E.M., 2003. Bivalve molluscs: biology, ecology, and culture, Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK. ed, Fishing news books. Fishing News Books, Oxford ; Malden, MA.
- Hamer, B., Jaksic, Z., Pavici-Hamer, D., Peric, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schroder, H.-C., Muller, W., Smoldaka, N., Batel, R., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.* 89, 137–151. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.015
- Jourmi, L. El, Amine, A., Boutaleb, N., Abouakil, N., Lazar, S., Antri, S. El, 2015. The use of biomarkers (catalase and malondialdehyde) in marine pollution monitoring: Spatial variability. *J. Mater. Environ. Sci.* 6, 1592–1595.
- Karatayev, A.Y., Padilla, D.K., Minchin, D., Boltovskoy, D., Burlakova, L.E., 2007. Changes in Global Economies and Trade: the Potential Spread of Exotic Freshwater Bivalves. *Biol. Invasions* 9, 161–180. doi:10.1007/s10530-006-9013-9
- Koyama, H., Okamoto, S., Watanabe, N., Hoshino, N., Jimbo, M., Yasumoto, K., Watabe, S., 2015. Dynamic changes in the accumulation of metabolites in brackish water clam *Corbicula japonica* associated with alternation of salinity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 181, 59–70. doi:10.1016/j.cbpb.2014.11.007
- Levinton, J., Doall, M., Ralston, D., Starke, A., Allam, B., 2011. Climate Change, Precipitation and Impacts on an Estuarine Refuge from Disease. *PLoS ONE* 6, e18849. doi:10.1371/journal.pone.0018849
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 380–385.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.
- Mahdizadeh Khasraghi, M., Gholami Sefidkouhi, M.A., Valipour, M., 2015. Simulation of open- and closed-end border irrigation systems using SIRMOD. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 929–941. doi:10.1080/03650340.2014.981163
- Matsushima, O., Yamada, A., 1992. Uptake of L- and D- Alanine by a brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, with special reference to their transport pathways and the salinity effect. *J. Exp. Zool.* 263, 8–17.
- Morton, B., Tong, K.Y., 1985. The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from Hong Kong. *Malacol. Rev.* 18, 91–95.

- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestoigammarus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Métais, I., Durou, C., Minier, C., Pellerin, J., 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 133–141. doi:10.1016/j.ygcen.2008.04.010
- Navarro, J.M., 1988. The effects of salinity on the physiological ecology of *Chloromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol* 122, 19–33.
- Navarro, J.M., Gonzalez, C.M., 1998. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture* 167, 315–327.
- Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Sci. Total Environ.* 540, 43–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.045
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J.W., 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the southwestern Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 320, 93–103. doi:10.1016/j.jembe.2004.12.020
- Reid, W.V., Millennium Ecosystem Assessment, World Resources Institute (Eds.), 2005. Ecosystems and human well-being: synthesis ; a report of the Millennium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington, DC.
- Schoffeniels, E., Gilles, R., 1971. Iono and osmoregulation in Mollusca, M.Florkin and B.T. Scheer. ed, Academic press. New York.
- Seitkalieva, A.V., Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2015. Phosphatases of echinoderms and bivalve mollusks of the Japan and Okhotsk seas. *Russ. J. Mar. Biol.* 41, 51–59. doi:10.1134/S1063074015010071
- Signoret, G.P., Brailovsky, D.S., 2004. Adaptive osmotic responses of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann) and *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus)(Decapoda, Palaemonidae) from the southern Gulf of Mexico. *Crustaceana* 77, 455–465.
- Sokolova, I.M., Bock, C., Pörtner, H.-O., 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I: Anaerobic metabolism and energetics. *J. Comp. Physiol. B* 170, 91–103.
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 44, 85–94. doi:10.1051/limn:2008017
- Valipour, M., Sefidkouhi, M.A.G., Eslamian, S., 2015. Surface irrigation simulation models: a review. *Int. J. Hydrol. Sci. Technol.* 5, 51–70.

- Vaughn, C.C., Hakenkamp, C.C., 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 46, 1431–1446.
- Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015. Behavioral and mortality responses of the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule* to temperature, as indicator of climate change's potential impacts. *Ecol. Indic.* 58, 95–103. doi:10.1016/j.ecolind.2015.05.042
- Vinu Chandran, R., 2002. Intracellular osmoregulation in the estuarine mollusc *villorita cyprinoides* Var. *cochinensis* (Mollusca: Bivalvia) Hanley. Cochin University of Science and Technology, India.

Supplementary data

Table S1: Biochemical biomarker data in the digestive gland and behavioral biomarker in both bivalve species (*C. fluminea*, *S. plana*) exposed to the different salinities tested (1.5 psu and 15 psu for *C. fluminea* or 15 psu and 30 psu for *S. plana*) after 2 and 7 days. Data are expressed as mean +SD.

Biomarkers			Time (days)	<i>Corbicula fluminea</i>				<i>Scrobicularia plana</i>			
				1.5 fed	1.5unfed	15 fed	15 unfed	15 fed	15 unfed	30 fed	30 unfed
Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot/min	2	67.92 ± 18.14	77.16 ± 14.32	64.58 ± 15.48	69.09 ± 9.34	120.54 ± 67.55	199.40 ± 137.30	95.01 ± 40.41	89.11 ± 19.96
			7	77.04 ± 5.46	63.77 ± 20.02	57.37 ± 21.81	62.38 ± 9.87	76.84 ± 36.17	154.13 ± 20.04	89.49 ± 62.06	109.00 ± 28.66
	TAC	μmol Teq/g prot/min	2	17.31 ± 4.00	17.55 ± 4.18	14.56 ± 6.72	17.94 ± 5.47	25.78 ± 3.97	27.00 ± 14.67	18.78 ± 8.68	18.92 ± 11.18
			7	16.50 ± 5.04	14.45 ± 2.56	17.56 ± 5.22	18.30 ± 3.66	26.92 ± 3.35	26.78 ± 4.30	28.51 ± 7.11	23.65 ± 3.98
	GST	μmol CDNB/ g prot/min	2	404.95 ± 84.42	384.40 ± 94.76	305.40 ± 84.28	321.31 ± 85.65	974.97 ± 462.93	606.80 ± 243.94	375.26 ± 377.75	361.50 ± 330.14
			7	361.44 ± 72.06	335.55 ± 120.74	345.82 ± 77.59	273.78 ± 46.68	221.19 ± 222.13	811.45 ± 1031.78	458.39 ± 272.10	348.82 ± 181.19
	ACP	μmol p- nit./ g prot/ h	2	64.55 ± 7.97	78.84 ± 16.57	51.97 ± 14.03	61.92 ± 11.66	183.75 ± 57.68	120.16 ± 35.57	128.68 ± 85.90	114.07 ± 37.42
			7	54.33 ± 9.79	53.64 ± 11.51	53.11 ± 13.54	48.93 ± 4.81	172.89 ± 82.09	165.64 ± 45.81	159.86 ± 48.70	120.08 ± 40.76
	MT	μg/ g dry wt	2	0.32 ± 0.09	0.23 ± 0.09	0.56 ± 0.08	0.54 ± 0.26	4.16 ± 1.59	5.25 ± 1.37	3.64 ± 2.30	3.82 ± 1.30
			7	0.94 ± 0.26	0.38 ± 0.11	0.64 ± 0.31	0.38 ± 0.15	5.95 ± 2.68	6.29 ± 0.97	6.11 ± 3.07	3.53 ± 1.42
Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	2	23.81 ± 2.74	22.52 ± 6.89	19.88 ± 4.19	20.71 ± 5.26	0.83 ± 0.19	0.83 ± 0.16	0.66 ± 0.21	0.82 ± 0.21
			7	22.16 ± 5.38	22.55 ± 6.42	16.76 ± 1.36	20.80 ± 3.53	0.62 ± 0.18	0.61 ± 0.16	0.51 ± 0.16	0.58 ± 0.22
	CSP3	μmol pNA/ g prot/h	2	7.05 ± 1.36	7.02 ± 3.27	5.45 ± 2.41	6.71 ± 3.62	5.54 ± 0.96	3.64 ± 1.92	8.47 ± 2.72	5.04 ± 2.40
			7	5.12 ± 3.63	5.89 ± 3.23	4.64 ± 1.91	6.27 ± 2.76	6.78 ± 2.61	5.10 ± 1.53	7.74 ± 6.85	5.96 ± 3.40
Structural and energetic parameters	Trigly.	mg/ g dry wt	2	15.36 ± 3.31	17.24 ± 3.04	11.44 ± 3.72	12.36 ± 1.25	9.16 ± 3.80	11.55 ± 3.50	8.84 ± 1.68	9.66 ± 3.17
			7	14.37 ± 1.24	13.90 ± 2.89	10.76 ± 1.59	12.74 ± 1.59	15.56 ± 6.42	12.46 ± 2.30	10.17 ± 5.04	14.08 ± 6.39
	Chol.	mg/ g dry wt	2	5.55 ± 0.73	5.6 ± 0.30	4.57 ± 0.80	4.26 ± 0.73	5.26 ± 0.87	5.35 ± 0.67	4.87 ± 0.49	4.37 ± 0.88
			7	5.52 ± 0.56	5.46 ± 0.49	4.40 ± 0.62	4.76 ± 0.44	7.44 ± 1.65	5.80 ± 1.45	4.17 ± 1.46	5.42 ± 1.98
	Prot.	mg/ g dry wt	2	236.99 ± 13.70	245.01 ± 11.15	217.95 ± 37.22	200.38 ± 17.51	139.30 ± 18.34	168.01 ± 47.39	133.25 ± 10.89	152.45 ± 16.36
			7	264.81 ± 16.75	228.36 ± 34.90	227.43 ± 31.22	207.89 ± 10.92	155.77 ± 8.51	145.15 ± 15.03	114.08 ± 16.65	143.06 ± 30.04
	ETS	μmol O ₂ /g/h	2	44.75 ± 15.54	49.66 ± 21.67	44.37 ± 13.97	56.61 ± 18.16	27.12 ± 8.33	27.88 ± 9.73	29.64 ± 7.69	36.28 ± 20.20
			7	48.34 ± 11.69	53.74 ± 19.74	50.89 ± 20.19	42.98 ± 14.11	26.31 ± 6.56	21.39 ± 10.52	33.99 ± 3.01	31.30 ± 7.81
LDH	μmol NAD H/		2	77.89 ± 29.60	92.04 ± 20.58	102.94 ± 9.79	91.61 ± 11.94	278.25 ± 36.07	338.86 ± 73.29	246.94 ± 27.99	226.39 ± 111.76

Points forts

Les conséquences de la variation de salinité sur les deux espèces euryhalines révèlent que :

- *la mortalité n'est pas un critère d'évaluation satisfaisant de l'effet de l'euryhalinité,*
- *des modifications peuvent survenir et être particulièrement marquées au niveau de l'indice de condition, du comportement et des marqueurs physiologiques,*
- *le temps d'exposition de 7 jours ne semble pas avoir d'influence sur ces réponses, contrairement à l'absence de nourriture,*
- *la salinité peut être identifiée comme un facteur de stress non négligeable,*
- *ce facteur sera d'autant plus pertinent à prendre en compte dans l'approche en multi-stress, qui sera discutée par la suite dans ce travail de thèse.*

2^{ème} Partie :

**Ecotoxicologie des nanomatériaux et
nanoproduits d'argent.**

Cette partie est consacrée à l'étude du devenir et des effets des nanoproduits et nanomatériaux d'argent (AgNM) sur les deux espèces (C. fluminea, S. plana) étudiées en microcosme le long du gradient de salinité eau douce-eau de mer. Grâce à ses propriétés antibactériennes et antifongiques largement documentées, l'argent est un des éléments le plus fréquemment inclus dans les nanoproduits. L'utilisation de ces nanoproduits dans une grande variété de domaines, tels que l'industrie du médical, des peintures et des revêtements, ainsi que dans de nombreux produits de consommation courante (textiles et cosmétiques), inquiète quant à leur comportement, leur devenir et leur écotoxicité dans l'environnement.

Le premier chapitre de cette seconde partie présente une étude valorisée sous la forme d'une publication parue dans le journal Environmental Toxicology and Chemistry (2016). Cette présente étude utilise des nanomatériaux d'argent standardisés (NM-300K, 20 nm) maintenus en suspension grâce à un agent de stabilisation (NM-300K DIS). L'objectif était d'une part d'examiner le comportement d'AgNM en milieu aquatique soumis à deux salinités caractéristiques des zones estuariennes (15 et 30 practical salinity unit (psu)) et d'autre part d'évaluer ses effets écotoxicologiques vis-à-vis du bivalve endobenthique, S. plana. Le protocole expérimental correspond à l'exposition de l'espèce marine en microcosme simple (exposition à la colonne d'eau). La bioaccumulation, ainsi que les effets sub-létaux d'AgNM (10 µg Ag/L), de son agent de stabilisation et du nitrate d'argent (Ag NO₃) (10 µg Ag/L), ont été évalués chez le bivalve, après 7 jours d'exposition en laboratoire. La libération d'Ag soluble provenant des AgNM dans les milieux expérimentaux a été quantifiée en utilisant des échantillonneurs passifs (Diffusive gradient in thin film ; DGT) et par ultrafiltration sur membrane (Amicon™). Une approche multi-biomarqueurs a été employée pour révéler les réponses des bivalves aux niveaux sub-individuel et individuel après exposition.

La dissolution des AgNM aux deux salinités testées après 7 jours d'exposition a été observée quelle que soit la méthode utilisée (DGT et Amicon™). Cependant, aucune influence significative de la salinité n'a été mesurée sur la dissolution des AgNM. La bioaccumulation de l'argent par les organismes était significativement plus élevée après exposition aux différentes formes d'argent à 15 psu en comparaison à celle des organismes exposés à 30 psu, possiblement expliquée par la spéciation de l'Ag différente à ces deux salinités. L'expérimentation a mis en évidence que l'Ag était moins bio-disponible à 30 psu qu'à 15 psu. L'étude sur les deux organismes endobenthiques définis comme tolérants aux variations de salinité a permis de reconnaître la salinité comme un facteur confondant sur la réponse des biomarqueurs. En effet, l'exposition à ce seul facteur a induit un stress oxydatif, des dommages cellulaires ainsi qu'une diminution des réserves énergétiques, pouvant alors masquer les effets d'autres facteurs de stress. L'enfouissement des organismes a été affecté suite à l'exposition aux deux formes d'Ag testées, mais aussi, de manière plus surprenante, suite à l'exposition à l'agent de stabilisation (NM-300K DIS), avec un ralentissement plus marqué à 15 qu'à 30 psu. Ce dernier résultat souligne qu'il est indispensable d'étudier le potentiel impact des agents de stabilisation ou des revêtements de surface utilisés pour la préparation des NM.

Les effets biologiques suite à l'exposition aux AgNM ont clairement été mis en évidence sur S. plana aux deux salinités. Une même batterie de biomarqueurs a été déployée à 15 et 30 psu : ETS (système du transport des électrons) ; GPX (glutathion peroxydase) ; GST (glutathion-S-transférase) ; TAC (capacité antioxydante totale) et TBARs (substances réactives à l'acide thiobarbiturique). A la salinité du terrain (30 psu), l'exposition des individus aux deux formes d'Ag testées, ainsi qu'à l'agent de stabilisation, a induit une réduction des capacités antioxydantes par comparaison avec les contrôles. Suite à l'exposition à des conditions d'hypo-salinité (15 psu), les effets observés étaient plus marqués et associés à l'augmentation des mécanismes d'apoptose et à la réduction des réserves énergétiques et structurales pour les organismes exposés aux deux formes de l'Ag. En conséquence, des effets au niveau de la population ou de l'écosystème ne peuvent être exclus au regard de ces premiers résultats. De fait, des organismes exposés plus longtemps aux AgNM sont plus sujets aux risques de la prédation via leur présence en surface du sédiment, et aux perturbations des fonctions écologiques (diminution de l'activité de bioturbation). De futures études devront être réalisées dans des conditions plus complexes et sur une période plus longue afin de confirmer ces présents résultats.

La seconde étude présente les résultats acquis et en cours de valorisation sous forme de publication en préparation pour une soumission dans un journal international. L'originalité de ces travaux a été de se focaliser sur un nanoproduct contenant de l'Ag, l'Acticoat™. Le pansement commercialisé Acticoat™ a été sélectionné en raison de sa large utilisation ces vingt dernières années dans le traitement des brûlures et des blessures en milieu hospitalier (Courtemanche et al., 2015). Dans notre étude, une attention particulière a été portée sur l'impact du vieillissement de ce pansement antimicrobien d'argent (Acticoat™) et un NM d'argent standardisé (NM-300K) et sa solution de stabilisation (Surnageant) à travers un gradient de salinité (1,5, 15 et 30 psu) sur les deux bivalves endobenthiques, Corbicula fluminea et Scrobicularia plana. Les expositions ont été réalisées en microcosmes soumis à deux régimes alimentaires (présence ou absence d'algues). La bioaccumulation de l'Ag dans les glandes digestives en présence ou en absence de source alimentaire (algues) pour les deux organismes a été déterminée ainsi que les effets sur les organismes par l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs (biochimiques et comportementaux).

La dissolution des NM-300K étudiée dans une expérience préalable par un laboratoire partenaire (CEREGE) montre une dissolution quasi-totale des AgNM sans influence significative du gradient de salinité testé (15 et 30 psu). Aussi, les impacts potentiels observés pourraient être attribués soit à la forme nanoparticulaire, soit à la libération d'ions Ag ou encore aux deux conjointement. Les résultats ont montré une libération d'ions d'Ag à partir de l'Acticoat™ qui est croissante le long du gradient de salinité (1,5 ; 15 et 30 psu). Chez C. fluminea, la concentration d'Ag était significativement plus élevée après exposition à l'Acticoat™ et NM-300K à 15 psu comparé à 1,5 psu. Les expériences réalisées ont mis en évidence une plus grande concentration d'argent pour les organismes exposés à l'Acticoat™ et aux NM-300K en présence d'algues.

Chez S. plana, la concentration d'Ag était significativement plus élevée après exposition à l'ActicoatTM et NM-300K en absence de nourriture à 30 psu. A 15 psu, la concentration d'Ag était plus élevée chez les bivalves exposés à l'ActicoatTM comparée aux autres conditions d'exposition quel que soit le régime alimentaire considéré. La bioaccumulation de l'Ag dans la glande digestive de C. fluminea a été observée uniquement à 1,5 psu quel que soit le régime alimentaire testé. La diminution de l'accumulation de l'Ag par les organismes mesurée le long du gradient de salinité pourrait être due à la formation de complexes d'Ag-Cl, comme le montre le diagramme de prédominance des espèces de l'Ag, ces formes étant moins biodisponible. De plus, les résultats de bioaccumulation semblent indiquer qu'une source alimentaire pour les deux bivalves, telle que les microalgues, induit une augmentation significative de la bioaccumulation suite à l'exposition aux deux formes d'Ag (ActicoatTM et NM-300K). Au niveau individuel, les deux espèces s'enfouissent dans le sédiment à la salinité du terrain (1,5 et 30 psu), néanmoins quelques modifications de la cinétique d'enfouissement sont observées selon les différents traitements (ActicoatTM, NM-300K, Supernageant) en comparaison au contrôle. Cependant, à la salinité correspondant à la limite de tolérance (15 psu) commune pour les deux espèces, aucun organisme ne s'enfouit, quel que soit le traitement (Contrôle, ActicoatTM, NM-300K, Surnageant). Ce même résultat a été décrit précédemment et suggère que l'absence d'enfouissement présente un risque potentiel aux niveaux des populations et des communautés en raison de l'augmentation du risque de prédation dans le cas où les organismes restent à la surface du sédiment. Les effets biologiques associés à l'Ag contenu dans l'ActicoatTM et NM-300K ont été mis en évidence sur les deux espèces le long du gradient de salinité par les réponses des biomarqueurs mesurés au niveau sub-individuel. L'approche intégrative appliquée à la batterie de biomarqueurs (Integrated Biomarkers Responses : IBR) a permis d'observer l'activation de certains mécanismes de défenses antioxydantes combinés à l'apparition de dommages cellulaires (traduisant des effets irréversibles) selon les conditions testées (ActicoatTM, NM-300K et Surnageant). De plus, les groupes expérimentaux de C. fluminea, après exposition aux deux formes d'Ag, semblaient plus affectés que les groupes de S. plana. Ce résultat pourrait éventuellement mettre en évidence une plus grande tolérance de l'espèce S. plana, prélevée en estuaire et régulièrement exposée à des conditions de multi-stress liées aux fluctuations naturelles de la salinité, de la température, du taux d'oxygène dissous ou de pH en comparaison aux organismes d'eau douce (C. fluminea) soumis à des conditions plus stables de leur milieu naturel.

En conclusion, l'étude du vieillissement des nanoproduits et des NM sous des conditions d'exposition les plus réalistes possibles (gradient de salinité, source trophique, faibles concentrations) semble indispensable pour comprendre leur comportement et leur devenir dans l'environnement aquatique et ainsi participer à l'acquisition de données pour l'évaluation du risque environnemental.

Chapitre IV: The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*

Carole Bertrand, Aurore Zalouk-Vergnoux, Laure Giambérini, Laurence Poirier, Simon Devin, Jérôme Labile, Hanane Perrein-Ettajani, Christophe Pagnout, Amélie Châtel, Clément Levard, Mélanie Auffan and Catherine Mouneyrac

(Publié dans Environmental Toxicology and Chemistry, 2016
DOI : 10.1002/etc.3428))

THE INFLUENCE OF SALINITY ON THE FATE AND BEHAVIOR OF SILVER STANDARDIZED NANOMATERIAL AND TOXICITY EFFECTS IN THE ESTUARINE BIVALVE *SCROBICULARIA PLANA*CAROLE BERTRAND,[†] § # AURE ZALOUK-VERGNOUX,[§] # LAURE GIAMBÉRINI,[†] LAURENCE POIRIER,[§] # SIMON DEVIN,[†] JÉRÔME LABILLE,^{||} # HANANE PERREIN-ETTAJANI,[†] # CHRISTOPHE PAGNOUT,[†] # AMÉLIE CHÂTEL,[†] # CLÉMENT LEVARD,^{||} # MÉLANIE AUFFAN,^{||} # and CATHERINE MOUNEYRAC*[†] #[†]ILaboratoire interdisciplinaire des environnements continentaux (LIEC), Université de Lorraine, Metz, France[‡]Laboratoire Mer, Molécules et Santé, Nantes, Angers, Le Mans Université, Université Catholique de l'Ouest, Angers, France[§]Laboratoire Mer, Molécules et Santé, Nantes, Angers, Le Mans Université (LUNAM), Université de Nantes, Nantes, France^{||}National Center for Scientific Research (CNRS), Aix-Marseille Université, Aix en Provence, France

#International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology (ICEINT), Aix en Provence, France

(Submitted 29 September 2015; Returned for Revision 30 October 2015; Accepted 5 March 2016)

Abstract: Because of their antibacterial properties, silver (Ag) engineered nanomaterials are included in many products. The present study used a standardized Ag nanomaterial (NM-300K, 20 nm) supplied with a stabilizing agent. The aim was to investigate the behavior of Ag nanomaterial in an estuarine-like medium at 2 salinities (15 psu and 30 psu). Uptake as well as sublethal effects of Ag nanomaterial (10 µg Ag/L), its stabilizing agent, and AgNO₃ (10 µg Ag/L) were assessed in the clam *Scrobicularia plana*, after 7 d of exposure. The release of soluble Ag from Ag nanomaterial in the experimental media was quantified by using diffusive gradient in thin films and ultrafiltration. A multibiomarker approach was employed to reveal responses of clams at subindividual and individual levels. The bioaccumulation of Ag was significantly greater at 15 psu versus 30 psu, which could be explained by differences in Ag speciation. In conclusion, the present study showed different impacts of Ag nanomaterial that were not always explained by the release of Ag ions in clams at both salinities; such impacts were particularly characterized by induction of oxidative stress, cell damage, and impairment of energetic levels. Burrowing of clams was affected by the stabilizing agent depending on the salinity tested, with stronger effects at 15 psu. Finally, the present study highlighted salinity-dependent changes in the physiology of estuarine bivalves. *Environ Toxicol Chem* 2016;35:2550–2561. © 2016 SETAC

Keywords: *Scrobicularia plana* Salinity NM-300K Behavior Biomarkers

INTRODUCTION

Estuaries are areas of high productivity, crucial in the life histories of many invertebrates, fish, and birds. The sustainability of these ecosystems is vital to the ecological and economic health of coastal regions. These systems regularly undergo changes in natural environmental conditions. Salinity is 1 of the main factors impacting estuarine organisms, particularly abrupt changes that promote a physiologically stressful environment [1]. Estuaries are also habitats that receive various toxic anthropogenic effluents. Thus, species living in these areas are generally able to cope with natural and chemical stress via biochemical, physiological, or behavioral responses.

As a result of their biocidal properties, silver nanoparticles (AgNPs) have been incorporated into an increasing number of consumer and medical products (e.g., clothing, cosmetics, household appliances, medical devices). As of October 2013, 1814 products containing engineered nanomaterials had been inventoried by the Woodrow Wilson International Center for Scholars (Washington, DC, USA); among them, 435 contained Ag [2], leading to a significant potential for the release of Ag engineered nanomaterials from these products into the environment [3]. Previous studies have already confirmed the release of Ag engineered nanomaterials into wastewater from

washing machines [4], clothing, toothpaste, and shampoo [5]. The predicted environmental concentrations (PECs) of AgNPs in aquatic environments have been estimated by modeling studies to be between 0.5 ng/L and 2 ng/L [6]. It is noteworthy that environmental exposure to NPs may be highly variable in both space and time and that the accurate determination of PEC levels requires more precise emission data and information on NP release to sewage treatment plants from consumption and use. The Ag concentration of 10 µg/L used in the present study is 3 orders of magnitude higher than the PECs currently modeled. However, the rising demand for nanosilver-based consumer products that is expected from 2014 to 2020 will amplify the potential release of Ag engineered nanomaterials in the environment [7].

It is estimated that 40 000 km³/yr of freshwater flows into the worldwide oceans through the main rivers. Consequently, engineered nanomaterials accidentally or not (through usage, end of life) released into the environment will flow directly into the rivers. They can be transported by water, sediments, and organisms and reach estuarine and marine areas. These releases into aquatic systems could have unintended detrimental ecological impacts [6]. There are currently a large number of uncertainties on how to extrapolate fate and effect data across ecosystems, biological species, and the physicochemical properties of engineered nanomaterials and nano-products. During the past decade, there was a strong push by research institutions and industry sectors to develop research on the ecotoxicology of engineered nanomaterials as well as their integration within the Registration, Evaluation, Authorization,

This article includes online-only Supplemental Data.

* Address correspondence to Catherine.mouneyrac@uco.fr

Published online 14 March 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/etc.3428

and Restriction of Chemicals (REACH; European Commission, Brussels, Belgium) regulatory framework. The Organisation for Economic Co-operation and Development established a list of priority nanomaterials, and consortia were tasked with providing environmental characterization and toxicological data for these materials for use in risk analysis [8]. At the European level, the Regulatory Testing of Nanomaterials (NANoREG) project has identified representative manufactured nanomaterials [9] that need to be prioritized for further ecotoxicological research, by linking the physicochemical properties of NPs to their behavior in the environment and the human body. These representative manufactured nanomaterials allow comparison of testing results, as well as the development of conclusive assessment of data, and pave the way for appropriate test method optimization, harmonization, and validation. They may serve as successful standards for testing. Among these representative manufactured nanomaterials, NM-300K nano-silver (Ag nanomaterial) was introduced by the European Commission Joint Research Centre to fulfill this function.

Although the impacts of NPs in freshwater media have been widely studied during the past decade, data for media characterized by a salinity gradient are scarcer. In 2014, Auffan et al. [10] assessed the biodistribution and in situ speciation of sublethal concentrations of AgNPs within *Fundulus heteroclitus* embryos in freshwater (0 psu) and estuarine water (10 psu). They found that the bioaccumulation was salinity dependent and was reduced by 2.3-fold at 10 psu compared to 0 psu. They also found that the biotransformation was salinity dependent. At 0 psu, a strong complexation of the AgNPs with the thiolated groups of proteins or enzymes of the chorion was responsible for the oxidation of $48 \pm 5\%$ of the Ag^0 into Ag(I)-S species. However, at 10 psu, the presence of Cl^- ions at the surface of the AgNPs significantly slowed down this oxidation.

In the present study, we decided to look further into the mechanisms of toxicity occurring at higher salinity (15 psu and 30 psu). Based on Auffan et al. [10], we hypothesized that at such a salinity (15–30 psu), Ag bioaccumulation would be different compared with freshwater because of varying dissolution rates as a function of salinity [11]. Experimental evidence also shows that dissolved Ag is less bioavailable at higher salinities than at lower ones, mainly because of differences in dissolved Ag speciation between salinities [12]. Our hypothesis was that differences in Ag speciation (in both NPs and dissolved species) between the 2 salinities tested would govern bioaccumulation in the bivalve *Scrobicularia plana* and consequently induce changes in related toxicity effects.

Toxicity tests mostly use either freshwater or marine organisms but not estuarine species. Because of its key role in the structure and functioning of ecosystems, the euryhaline bivalve species *S. plana* was selected in the present study to investigate the toxic impacts of Ag nanomaterial across a salinity gradient. This bivalve is a facultative suspension feeder (a filter-feeder during immersion periods), whereas it collects food by siphoning sediment during emersion periods. Moreover, *S. plana* has been previously recognized as a suitable model to investigate the toxic impacts of different engineered metal-based NPs [13].

One strategy to assess the toxic effects of contaminants including NPs is the use of a set of biomarkers at different levels of biological organization (Supplemental Data, Table S1). Oxidative stress is recognized as 1 of the most common effects of nanotoxicology [14]. Thus, at the subindividual level, antioxidant defenses (catalase [CAT], glutathione-S-transferase [GST], and glutathione peroxidase [GPx]) are of particular

interest when one is assessing the toxic stress endured by organisms exposed to NPs. Because the effects of antioxidant molecules (either enzymatic or nonenzymatic) are additive, the total antioxidant capacity can give a global view of oxidative stress endured by organisms [15]. Lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid substances (TBARs) are able to reveal whether this protective antioxidant effect has been overwhelmed. In addition, metallothionein (MT), a cysteine-rich protein, is involved in both antioxidant defense and metal detoxification [16]. The digestive cell lysosomes are involved in both intracellular digestion and pollutant accumulation and detoxification. Moreover, they play a role in defense against oxidative stress. Lysosomal responses have been shown in different bivalve species exposed to NPs [17] and can be evaluated by an increase in the acid phosphatase activity [18]. Toxic insult can also result in the injured cells dying by necrosis or apoptosis. The activation of caspase (CSP), a cysteine protease, representing the best recognized biochemical hallmark of both early and late stages of apoptosis, has been previously shown in bivalves exposed to metal-based NPs [13]. Moreover, defense against stress as a result of natural factors such as salinity or contaminants including NPs may be energy consuming, and lactate dehydrogenase (LDH) activity is particularly important when a considerable amount of energy is rapidly required. Physiological markers such as triglyceride, protein, and cholesterol levels, as well as activity of the electron transport system (ETS) are of considerable interest to evaluate the potential of animals to produce energy [19].

To date the exact mechanisms of the in vivo toxicity of AgNPs and the links between biomarkers at different levels of biological organizations (subindividual vs individual) remain poorly understood in aquatic organisms. In the present study, different aspects were considered to develop a better understanding of the ecotoxicity of the representative manufactured nanomaterial Ag NM-300K toward *S. plana* across a salinity gradient. Silver nitrate (AgNO_3) was tested as an ionic reference to evaluate the effects of Ag as a result of particles or Ag ions released from Ag nanomaterial. The role of the stabilizing solution (dispersant control) in the toxicity of Ag nanomaterial suspension has also been taken into account.

The first objective was to investigate the influence of salinity on the fate and behavior of Ag nanomaterials by evaluating their size distribution and potential release of Ag ions in artificial seawater at 2 salinities (15 psu and 30 psu). The second objective was to address the potential toxicity of Ag nanomaterial (but also its stabilizing agent and soluble Ag) toward *S. plana* exposed at 15 psu and 30 psu using a multimarker approach. Finally, to adapt and develop new suitable tools for environmental risk assessment of engineered nanomaterials, the responses of the whole set of biomarkers were synthesized through a partial least-squares (PLS) regression analysis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals used and NP characterization

A stock solution of AgNO_3 (1 g Ag/L, in 2% HNO_3 w/w, metal impurities certified <0.1 ppb) was purchased from Fluka Analytical. All other chemicals were purchased from Sigma Aldrich and Thermo-Scientific. The artificial seawater Tropic Marine (Tropicarium Buchschlag, Dreieich, Germany) was used to provide replication of the medium among all experiments [16].

The NM-300K suspension (Ag nanomaterial) containing AgNPs, and its dispersant solution (dispersant control), were

purchased from the Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (Schmallenberg, Germany). This Ag nanomaterial is 1 of the best characterized official representative manufactured nanomaterials from the European Commission Joint Research Centre. It is a suspension of AgNPs (nominal silver content of 10% w/w) with a stabilizing agent consisting of 4% (w/w) polyoxyethylene glycerol trioleate and 4% (w/w) polyoxyethylene (20) sorbitan mono-laurate (Tween 20). Transmission electron microscopy (TEM) analysis indicated a particle size of approximately 15 nm with a narrow size distribution (99%). A second peak of smaller particles of approximately 5 nm was identified using high-resolution TEM [9].

Suspensions of Ag nanomaterial (20 mg Ag/L) were prepared in Milli-Q water according to the recommendations from the European Commission Joint Research Centre [9]. The concentration of dissolved Ag in the Ag nanomaterial stock suspension was evaluated after ultracentrifugation at 400 000 g for 1 h (Ultra-centrifuge Beckman L60), and the liquid phase was analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; NexION 300x-PerkinElmer). The amount of ionic Ag in the Ag nanomaterial was measured at 1 mg Ag/L. To reduce the concentration of these dissolved Ag species, the Ag nanomaterial suspension was dialyzed at 3 kDa before exposure. Briefly, 10 mL of the Ag nanomaterial suspension were introduced into a dialysis bag (Float-A-Lyser® G2, Spectrum-labs-3kDa) and placed for 5 h in 2.5 L of Milli-Q water under slow agitation, and for 2 h in 250 mL of clean Milli-Q water. The dispersant control solution was prepared using the same protocol.

Time resolved homoaggregation of Ag nanomaterial in seawater

The aggregation state of Ag nanomaterial in the stock suspension (Milli-Q water) and in the artificial seawater at 15 psu and 30 psu was monitored over time by dynamic light scattering. A volume of 1 mL of seawater (15 psu or 30 psu) was first introduced into the measuring cuvette, and at time 0 an appropriate volume of the Ag nanomaterial stock suspension was added to reach 1 mg/L solid concentration. The cuvette was instantly homogenized by hand-shaking and put in the apparatus before the measurement sequence was launched. A maximum of 5 s elapsed before the first measurement began. The measurements were performed continuously for 120 min with the Malvern Nanoseries Nano-ZS system. Raw data were fitted with non-negative least-squares analysis, and the results were converted into volume-weighted size distribution. Each of the relative size distributions was calculated from the average of at least 5 reproducible size measurements, giving the minimal fit residual. From these time evolutions measured experimentally, the aggregation model SmolCalc [20] was used to extrapolate the NP aggregate size to 7 d. This was achieved first by optimizing the NP sticking efficiency so as to numerically fit the experimental size evolution measured over 120 min. More details on the model approach are given in the Supplemental Data, Figure S1 and Table S2.

Collection and acclimatization of organisms

Individuals of *S. plana* were hand-collected in the intertidal mudflat located on the French Atlantic coast (1°59'04"80"W, 47°01'50.35"N, Bay of Bourgneuf, France) in February 2014. This site has been documented to be relatively clean [21]. The physicochemical parameters of the seawater from the collection site were: pH 7.22; salinity 25.9 psu; and conductivity 30.5 mS cm⁻¹. Only bivalves with shell lengths ranging from

15 mm to 20 mm (1.00 ± 0.27 g wet wt) were selected, to avoid any potential influence of sexual maturity.

Animals were then transported to the laboratory in cool boxes with sediment from the collection site. Bivalves were immediately transferred into tanks (50 L) containing aerated artificial seawater (Tropic Marine) at 30 psu for 3 d in a temperature-controlled room at 15 °C (temperature measured in the sediment at the time of collection). Subsequently, some of the organisms remained at 30 psu, whereas others were transferred to 20 psu for 3 d and again transferred to the final tested salinity of 15 psu. Abiotic parameters (30 psu: pH 7.87 ± 0.01, temperature 14.6 ± 0.1 °C, salinity 29.3 ± 0.3 psu, dissolved oxygen 8.50 ± 0.1 mg O₂/L; 15 psu: pH 7.73 ± 0.01, temperature 14.7 ± 0.1 °C, salinity 14.72 ± 0.2 psu, dissolved oxygen 8.43 ± 0.1 mg O₂/L) were monitored every day using the multiparameter ODEON system (Ponsel) and remained constant throughout the acclimatization period.

Experimental design

Two groups of bivalves were considered according to the salinities tested (15 psu and 30 psu). Each group of bivalves, composed of 12 animals per replicate (3 replicates per treatment), was introduced into a 3.2-L glass beaker with 3 L of the test solution containing artificial seawater at 15 psu or 30 psu. For each salinity tested, 4 treatments were carried out for up to 7 d in the dark. The treatments were as follows: 1) control (with no contaminants); 2) AgNO₃ (10 µg Ag/L; 1.5 mL of AgNO₃ at 20 mg/L in 3 L); 3) Ag nanomaterial (10 µg Ag/L; 1.5 mL of Ag nanomaterial at 20 mg/L in 3 L); and 4) dispersant control (at the same concentration as was added with Ag nanomaterial). Media were renewed every other day during the 7-d exposure. Constant aeration was provided to maintain oxygen levels near saturation and to ensure circulation of Ag nanomaterial within the exposure tanks. Salinity, pH, conductivity, and oxygen rates were measured every 2 d with the multiparameter ODEON system. Invertebrates remained unfed during the whole experiment.

Ag quantification

In exposure media. Quantification of total Ag was measured in a 5-mL sample of a water column stabilized with 2% of HNO₃ w/w for each treatment (control, AgNO₃, dispersant control, Ag nanomaterial). To estimate the release of Ag ions from Ag nanomaterial, 2 different techniques were used: ultrafiltration using microfilter tubes (pore size 3 kDa; Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Dutscher) and diffusive gradient in thin film (Research Ltd.). The aim of the diffusive gradient technique is to measure the labile metal forms after they have passed through a hydrogel (Chelex membrane) by passive sampling (including metallic cations and easily dissociable complexes) in the exposure medium; the ultrafiltration system measured the soluble Ag forms (without enclosing nanoparticulate forms). Dissolved Ag ions were measured in the filtrate obtained after centrifugation (5000 g for 1 h) of Amicon tubes containing seawater samples (4 mL) from all treatments (control, AgNO₃, dispersant control, Ag nanomaterial). Then the filtrate was stabilized with 2% HNO₃ w/w. Labile Ag was estimated by using diffusive gradient. Three water diffusive gradient units were deployed in each aquarium (controls, AgNO₃, dispersant control, and Ag nanomaterial).

During the setting up of the diffusive gradient units in the tanks, 3 diffusive gradient units were deployed in the atmosphere close to the aquaria to evaluate potential contamination. They were considered blanks and were treated and

finally analyzed in the same conditions as the others. After 7 d of exposure, diffusive gradient units were removed from each aquarium and washed with Milli-Q water. The Chelex resins from diffusive gradient were placed in 1.5 mL of 1 M HNO₃ and left for more than 1 d, to remove Ag from the Chelex resin. Then Ag quantifications in all these neat or diluted solutions were performed by ICP-MS using rhodium (Rh) as the internal standard. Certified water (SRM 1640aE) was used to check the accuracy of the quantification ($7.986 \pm 0.108 \mu\text{g/L}$ for $8.081 \pm 0.046 \mu\text{g/L}$). The Ag masses accumulated in the diffusive gradient units were calculated as previously described by Buffet et al. [22].

In bivalves. The Ag concentrations were quantified after 7 d of exposure in the digestive gland of 5 bivalves sorted from each of the 3 replicates separately in the cytosol and in the insoluble fraction, which were prepared for MT quantification. The digestive gland of each bivalve was homogenized in 20 mM Tris, 10 μM β mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 150 mM NaCl adjusted to pH 8.6 (4 mL/g tissue). The cytosolic and insoluble fractions were separated by centrifugation at 30 000 g for 30 min at 4 °C. The tissue fraction of the digestive gland was digested by heating (90 °C) with suprapure HNO₃. The quantification of Ag was then performed using ICP-MS. The absence of a matrix effect was verified by standard addition analyses. All labwares were cleaned in a 10% HNO₃ bath for 24 h and rinsed 3 times with deionized water before use. The validity of analyses was checked by internal quality control with a standard reference material (Oyster tissue SRM 1566B, US National Institute of Standards and Technology). Three measurements were achieved, and the results ($0.67 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$) were in agreement with the certificate of analysis ($0.67 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$). The total concentration ($\mu\text{g/g}$ dry wt) in the digestive gland of clams was calculated by adding concentrations of Ag in the cytosol and the insoluble fraction.

Behavioral experiments

After 7 d of exposure, bivalves underwent burrowing tests according to the methodology described by Bonnard et al. [23]. The sediment used for burrowing experiments was collected from the sampling site. Natural sediment was homogenized by hand and adjusted at both salinities tested (15 psu and 30 psu) 1 d before experimentation. The 15 bivalves used for Ag quantification in biological tissues were placed at the sediment surface, and the number of burrowed individuals was counted every 5 min during the first hour, every 10 min during the second hour, and then every 20 min until 6 h of testing was complete.

Biological indices and biochemical markers

Biological indices. Mortality (inability to close the valves after mechanical stimulus [24]) was registered every 24 h during the 7 d of the experiment. At the end of the experiment, the digestive glands of clams were dissected, weighed, and stored at -80 °C until biochemical analysis. The remaining soft tissues of clams were weighed to determine their wet weight and then placed into a drying oven at 45 °C for 2 d to determine their dry weight.

The use of dry weight is generally recognized in the calculation of biological indices to avoid fluctuations of water content in soft tissues according to various physiological (e.g., osmoregulation) and/or contamination factors [25]. The condition index of bivalves was calculated as follows:

$$\text{Condition index} = (\text{total dry tissue wt} / \text{total dry wt}) \times 100$$

Biomarker analysis. Prior to biomarker analysis using the automated chemistry analyzer Konelab 20 Xti (Thermo Scientific), the digestive glands were dissected, frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C until analysis, as described in Sroda and Cossu-Leguille [26]. Briefly, the digestive gland was thawed on ice and crushed at 4 °C in buffer (phosphate buffer; 50 mM, pH 7.6), phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), and L-serine borate (1 mM v/v). After different types of centrifugation, 2 fractions were obtained: the whole homogenate and the cytosolic fraction (enzyme activities).

Antioxidant and antitoxic defenses (i.e., total antioxidant capacity, GPx, GST, CAT, and acid phosphatase) were measured using methods developed on the Konelab by Garaud et al. [19] and adapted for *S. plana*. Briefly, total antioxidant capacity was based on the reduction of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) according to Erel [15]. Activity of GPx was quantified by the method described in Sroda and Cossu-Leguille [26] that measures the consumption of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Activity of GST was evaluated according to the catalyzed conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione. Activity of CAT was measured by the decomposition of hydrogen peroxide. The hydrolysis of 4-nitrophenylphosphate by acid phosphatase was measured in a reaction mixture composed of citrate buffer and Triton.

Cellular damage estimation was conducted following lipid hydroperoxide levels and CSP-3 activity. In brief, lipid hydroperoxide was based on the Fe²⁺ oxidation into Fe³⁺ by lipid hydroperoxide. Activity of CSP-3 was assessed by measuring the absorbance p-nitro-anilide released.

Energetic parameters such as protein, triglycerides, and cholesterol concentrations were measured using Konelab ready-to-use reagents. To calibrate the parameters, bovine serum based sCal, was used. The mitochondrial activity of the ETS was measured following the method of De Coen and Janssen [27] based on the reduction of p-iodonitrotetrazolium as the final electron acceptor of the mitochondrial respiratory chain. The activity of LDH was measured using Konelab ready-to-use reagents.

Differential pulse polarography analysis and spectrophotometric methodologies were applied for the determination of MT and TBARS, and acetylcholinesterase, respectively. These techniques have been previously described in details in Buffet et al. [28]. All these determinations were carried out in the digestive gland of individual clams ($n=7$ animals per replicate).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using R (R Core Team). Homoscedasticity and normality were checked by Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. When 1 assumption was not verified, the results were tested in a log-transformed version of the data. When possible, a two-way analysis of variance (ANOVA) with an interaction term was used to evaluate combined effects of Ag forms and salinity exposures with a threshold of $p < 0.05$ considered as significant. If neither the raw data nor the log-transformed data achieved the condition for a parametric test, a Kruskal-Wallis test was performed on a synthetic variable with 8 levels, called exposure condition, combining contaminant nature and salinity. When necessary (i.e., when the tests revealed a difference in a variable with more than 2 levels), t tests were carried out between each level of the independent variables, with the Benjamini and Hochberg [29] risk correction to control the false detection rate. The statistical

power of both ANOVA and the *t* test was computed with G*Power 3.1 software [30]. Only tests with a statistical power above 0.8 are described in the *Results* section.

For burrowing data, a generalized nonlinear model fully described in Buffet et al. [22] was used to describe the proportion of unburrowed individuals over time.

Regression analysis by PLS was carried out to identify biochemical and physiological modifications for *S. plana* in our exposure media. The generated variable importance in the projection values reflected the importance of each variable in the model, with variable importance in the projection > 1 indicating important predictors [31]. The PLS analysis allowed us to see the relationships between a set of independent variables (biomarker data) and dependent variables (exposure conditions). The analysis was performed independently for 15 psu and 30 psu, and, in addition to variable importance in the projection, produced 1) cumulated correlations (R^2) of each biomarker with the 2 axes of the PLS, encompassing the quality of representation of each variable; and 2) the weight of each set of variables for each component (how each variable contributed to the definition of the component, and what the sign of the correlation was). We used Tanagra 1.4.5 for the PLS analyses.

RESULTS

Aggregation state of Ag nanomaterial in the experimental media

The aggregation state of the Ag nanomaterial in Milli-Q water and in artificial seawater (15 psu and 30 psu) was analyzed by dynamic light scattering. The results indicated that the Ag nanomaterial size in Milli-Q water ranged from 2 nm to 10 nm, with a mean value of 5 nm, which is in agreement with previous dynamic light scattering data reported for this material [9]. Conversely, when introduced into seawater, the Ag nanomaterial underwent homoaggregation at both tested salinities, as shown in Figure 1. This is the result of the interparticle electrostatic repulsions screened at high ionic strength because of the shortened Debye length, causing the prevalence of van der Waals attractions in these conditions.

Within 2 h in the saline waters (15 psu and 30 psu), the Ag nanomaterial aggregated progressively from 5 nm to 40 nm $\pm$ 5 nm average size. There was almost no overlap between the

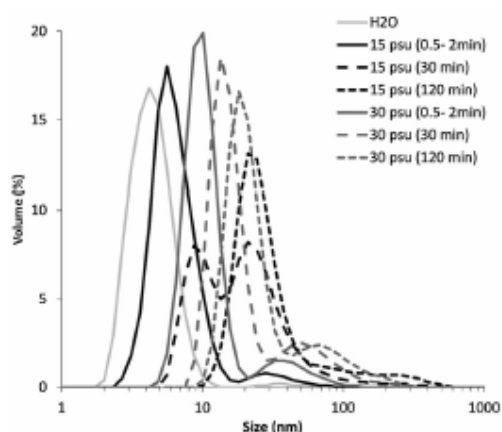


Figure 1. Size distribution of Ag nanomaterial (NM-300K, 1 mg/L) measured by dynamic light scattering as a function of the water salinity (15 psu and 30 psu) and of time (from 0.5 min to 2 min and during 30 min and 120 min).

initial and final size distributions (Figure 1), indicating that at $t = 120$ min, the NPs did not remain individually dispersed in suspension, but were mostly involved in larger aggregates.

Numerically, fitting this aggregation kinetics with the Smolucalc model [32] showed a NP sticking efficiency of colliding NPs of 6% to 11% when a fractal dimension of aggregate 2.2 was reasonably considered (Supplemental Data, Figure S1). Extrapolation of such kinetics over 7 d, the duration of the ecotoxicity assay, led to a final aggregate size distribution ranging from 100 nm to 1000 nm with a Dv50 (median for a volume distribution) at 300 nm to 400 nm. According to Stokes' law, and considering the aggregate porosity implied by the fractal dimension 2.2 [33], the sedimentation velocity of these units was 1.5 mm/d to 2 mm/d (Supplemental Data, Table S2). This means that in the 15-cm water column used for the ecotoxicity assay, the Ag nanomaterial sedimentation as a result of homoaggregation remained negligible. After 7 d of slow aggregation, the Ag nanomaterial aggregates were still expected to be in suspension.

Ag dissolution in the exposure media

The Ag masses accumulated by diffusive gradient units deployed in tanks contaminated by the stabilizing solution (dispersant control) were not significantly different from the

control (not shown) at both salinities tested (Mann-Whitney test, $p \geq 0.1$).

At 30 psu, a significant increase in Ag masses accumulated by diffusive gradient was observed after 7 d for AgNO₃ treatments. The accumulated Ag masses were the highest for tanks contaminated by AgNO₃ (11.0 ± 3.69 ng) and were significantly different from the lowest value observed for controls (0.9 ± 0.08 ng). For Ag nanomaterial condition, the Ag masses obtained (4.2 ± 1.8 ng) were not significantly different from the controls and AgNO₃ treatment (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). Considering that Ag masses accumulated by diffusive gradient in tanks contaminated by AgNO₃ represent the maximum labile forms able to be accumulated by the Chelex resin, Ag labile forms from Ag nanomaterial dissolution can be estimated to be 38% (mean Ag masses in diffusive gradient for Ag nanomaterial condition/mean Ag masses in diffusive gradient for AgNO₃ condition $\times 100$).

At 15 psu, similar results were observed. However, Ag masses accumulated by diffusive gradient following Ag nanomaterial treatment were significantly greater than the control. The percentage of labile forms from Ag nanomaterial dissolution can be estimated at 78%. However, these 2 calculated percentages (38% at 30 psu and 78% at 15 psu) were not statistically different, because the large variability in Ag accumulated mass resulted in tanks contaminated by AgNO₃ at 30 psu and 15 psu.

After 7 d, dissolved Ag from Ag nanomaterial was also estimated in the water column by ultrafiltration. The percentage of Ag nanomaterial dissolution (ratio between Ag concentrations quantified after ultrafiltration and concentrations of total Ag in the water column) was greater at the lowest tested salinity (15 psu: 81.7%) compared to 30 psu (68.1%). According to Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms (MEDUSA) estimations, 70% of AgCl₂⁻, 20% of AgCl₃²⁻, and 10% of AgCl₄³⁻ were found at 15 psu, whereas 49% of AgCl₂⁻, 27% of AgCl₃²⁻, and 24% of AgCl₄³⁻ were found at 30 psu exposure conditions, indicating total dissolution in both cases. However, these simple thermodynamic simulations do not account for the dissolution kinetics of the Ag nanomaterial.

Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam

Environ Toxicol Chem 35, 2016 2555

Ag bioaccumulation

After 7 d of exposure, total Ag concentrations in the digestive gland of bivalves exposed to the different treatments (control, AgNO₃, dispersant control, and Ag nanomaterial) are illustrated in Figure 2. At both salinities tested (15 psu and 30 psu), total Ag concentrations were significantly greater in the digestive gland of clams exposed to soluble Ag and Ag nanomaterial compared to the control and dispersant control. Significantly ($p < 0.001$) greater Ag concentrations were observed at 15 psu compared to 30 psu for all treatments (except for controls; Figure 2).

The distribution of Ag between the cytosolic and the insoluble fractions of the digestive gland of bivalves exposed to the 4 treatments (control, AgNO₃, dispersant control, and Ag nanomaterial) is illustrated in Figure 3. Accumulated Ag concentrations were greater in the cytosolic fraction than in the insoluble fraction in clams exposed to both Ag forms (nanoparticulate and soluble) at both salinities tested (15 psu or 30 psu), whereas an inverse pattern was shown in controls and in dispersant control exposed bivalves.

Biological indices and biochemical markers

Biological indices. No mortality was registered for any condition throughout the duration of exposure (7 d). No significant differences (not shown) in the condition index of bivalves were observed between the 2 tested salinities (15 psu and 30 psu) after the acclimatization period (9 d in total) or after the 7 d of exposure to the different treatments (controls, AgNO₃, Ag nanomaterial, and dispersant control).

Biochemical biomarkers. The results of the two-way ANOVAs performed on each biomarker (Table 1) showed that salinity significantly affected most of the antioxidant and antioxidant defenses (GPx, CAT, GST, acid phosphatase, and MT) measured except for total antioxidant capacity (Table 1). However, the lack of statistical power of the post hoc tests did not allow us to confirm which groups differed from each other, even if the p value was below 0.05. This was the case for GPx, with only a trend toward higher values at 15 psu compared to 30 psu. For control organisms, significantly higher cholesterol concentrations were observed at 15 psu versus 30 psu (Table 2).

The ANOVAs also indicated that the second exposure condition tested (i.e., the different Ag forms, nanoparticulate and soluble) and dispersant control exerted a significantly

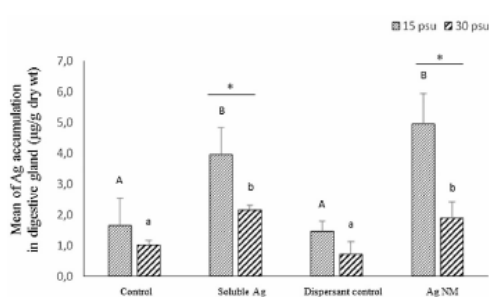


Figure 2. Bioaccumulated Ag concentrations (mean $\pm$ standard deviation) in the digestive gland of *Scrobicularia plana* after 7 d of waterborne exposure to the 4 experimental conditions (control, soluble Ag, dispersant control, and Ag nanomaterial) at 15 psu and 30 psu. Significant differences between the exposure conditions are shown by different letters (lower case after exposure at 30 psu and upper case at 15 psu). Asterisk (*) indicates a significant difference between salinities (15 psu vs 30 psu) for each exposure condition. NM = nanomaterial.

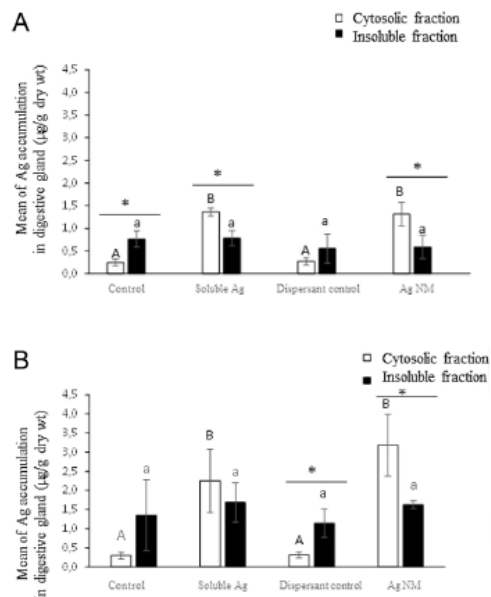


Figure 3. Distribution of Ag concentrations (mean $\pm$ standard deviation) between the cytosolic and the insoluble fractions in the digestive gland of *Scrobicularia plana* after 7 d of waterborne exposure to the 4 experimental conditions (control, soluble Ag, dispersant control, and Ag nanomaterial). (A) Ag bioaccumulation in the cytosolic or the insoluble fraction at 30 psu; (B) Ag bioaccumulation in the cytosolic or the insoluble fraction at 15 psu. Significant differences between the exposure conditions are shown by different upper case in the cytosolic fraction and different lower case letters in the insoluble fraction. For each exposure condition, significant differences between the cytosolic and the insoluble fractions is indicated by an asterisk (*). NM = nanomaterial.

general effect on only 2 biomarkers, triglyceride and cholesterol content. The levels of these compounds were significantly lower in the exposed clams compared to controls only at the 15 psu salinity exposure (Table 2). Again, we were only able to identify a trend toward higher GPx content in bivalves exposed to the Ag nanoparticulate form compared to those exposed to the soluble Ag form and controls, as well as a higher level of TBARS production in dispersant control than in Ag nanomaterial.

The interaction between Ag forms and salinity exposure conditions significantly affected the responses of GPx, CSP-3, triglycerides, and cholesterol in clams (Table 1).

The PLS regression analysis revealed that the dependent variable "exposure condition" was well described by the set of biomarkers quantified in the present study, with R^2 values of 0.87 and 0.84 for at 15 psu and 30 psu, respectively. The variable importance in the projection values revealed differences between organism responses at 15 psu and 30 psu (Table 3).

At 30 psu, the most important biomarkers were ETS, GPx, GST, total antioxidant capacity, and TBARS, and to a lesser extent MT (variable importance in the projection = 0.97). We observed lower R^2 values at this salinity, but the values remained high enough to allow interpretation of the factorial plan (Figure 4): the first axis separated control and soluble Ag from dispersant control and Ag nanomaterial. According to the variable weights, the first group exhibited higher values for all important variables except for TBARS, which were higher in dispersant control and Ag nanomaterial. The second axis

Table 1. Results of the two-way analysis of variances performed on each biomarker^a

	Biomarker	Ag form	Salinity	Interaction
Antioxidant and antitoxic defenses	GPx (μmolNADPH/g prot/min)	ns	0.0004	0.008
	CAT (mmol H ₂ O ₂ /g prot/min)	ns	0.001	ns
	TAC (μmol Teq/g prot/min)	ns	ns	ns
	GST (μmol CDNB/g prot/min)	ns	0.006	ns
	ACP (μmol p-nit/g prot/h)	ns	0.038	ns
	MT (μg/g dry wt)	ns	0.0002	ns
Cellular damage and apoptosis induction	LOOH (nmol TBH/g prot)	ns	ns	ns
	CSP-3 (μmol pNA/g prot/h)	ns	ns	0.024
	AChE (nmol/mg prot/h)	ns	ns	ns
	TBARs (nmol MDA/mg prot)	ns	0.005	ns
Energetic parameters	Triglycerides (mg/g dry wt)	0.017	ns	0.025
	Cholesterol (mg/g dry wt)	0.004	ns	0.045
	Protein (mg/g dry wt)	ns	ns	ns
	ETS (μmol O ₂ /g prot/h)	ns	ns	ns
	LDH (μmol NADH/g prot/h)	ns	ns	ns

^aData for glutathione peroxidase, caspase 3, and electron transport system were log-transformed to achieve a normal distribution. The statistical power of the principal effects and interaction was always above 0.8. GPx = glutathione peroxidase; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; CAT = catalase; TAC = total antioxidative capacity; GST = glutathione-S-transferase; CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; ACP = acid phosphatase; MT = metallothionein; LOOH = lipid hydroperoxides; TBH = *tert*-butyl hydroperoxide; CSP-3 = caspase 3; AChE = acetylcholinesterase; TBARs = thiobarbituric acid substances; MDA = malondialdehyde; ETS = electron transport system; LDH = lactate dehydrogenase; NADH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide; ns = not significant.

separated soluble Ag from the control and Ag nanomaterial from the dispersant control. The variable weights showed that *S. plana* exposed to soluble Ag and Ag nanomaterial had higher ETS, TBARs, and GPx values than control and dispersant control, respectively, whereas an inverse pattern was observed for total antioxidant capacity. The other variables had too low a weight on the second axis to be considered.

At 15 psu, the most important biomarkers were protein, triglycerides, cholesterol, GPx, CSP-3, TBARs, and CAT. All these variables were well described, with an R^2 value above 0.6. By looking at the variable weights and the factorial plan (Figure 4) simultaneously, we were able to link exposure conditions to biomarker values. It appeared, on the first axis, that protein, triglycerides, and cholesterol were always higher in the control than in any of the 3 other exposure conditions, whereas GPx, CSP-3, and CAT were higher in the exposed *S. plana*. The second axis allowed the separation of dispersant control and Ag nanomaterial, with a decrease in TBARs and CAT and an increase in GPx and CSP-3 in individuals exposed to Ag nanomaterial.

Behavioral biomarkers

The means of burrowing rate α (min⁻¹) and 95% confidence limit of bivalves previously exposed during 7 d to the different

conditions (control, soluble Ag, dispersant control, and Ag nanomaterial) at 15 psu and 30 psu are illustrated in Table 2. At 15 psu, burrowing activity was significantly impaired in clams exposed: 1) to all treatments compared with controls; and 2) to Ag nanomaterial and soluble Ag compared with dispersant control. At 30 psu, burrowing activity was significantly decreased only in clams exposed to dispersant control and soluble Ag compared with controls. In terms of the influence of salinity, burrowing activity was significantly decreased in bivalves exposed to dispersant control at 15 psu compared with 30 psu.

DISCUSSION

Salinity-dependent bioaccumulation of Ag

Previous studies reported that the toxicity of AgNPs was the result of release of ionic Ag [34], whereas other studies identified toxic effects that were not solely explained by the release of Ag ions and could be partially attributed to a specific effect of NPs [22]. Both of the techniques used in the present study revealed Ag nanomaterial dissolution throughout the 7-d experiment: diffusive gradient, 78% and 38% of Ag dissolution; ultrafiltration, 81.7% and 68.1% of Ag dissolution at 15 psu and 30 psu, respectively. However, no significant influence of salinity was found on these dissolution rates, but differences in Ag speciation were expected. Moreover, homoaggregation state analysis has shown that NP sedimentation remained negligible within the time scale of the exposure assay and that the Ag nanomaterial aggregates remained in suspension whatever the salinity.

From this physicochemical characterization, it may be assumed that dissolved metal was the predominant source of Ag in the present study despite the presence of few aggregates. In bivalves, the metal uptake from the dissolved phase is considered a potentially very significant source of metal accumulation as a result of the quantity of water pumped through the gills in association with feeding. Internal organs, especially the digestive gland, usually contained the highest Ag burdens in all species of mollusks examined (including *S. plana*) [35].

In the present study, although the control specimens or those exposed to dispersant control were not exposed to Ag in our experimental conditions, they contained a low amount of Ag in their digestive gland coming from their natural environment. However, these concentrations were consistently lower than those reported in *S. plana* digestive glands from contaminated sites [35] or those of bivalves exposed to dissolved Ag and Ag nanomaterial. This Ag was mainly stored in the insoluble fraction (and not in the cytosolic soluble fraction) of the digestive gland of clams. Previous studies showed that Ag was trapped within these insoluble fractions as relatively nontoxic Ag₂S precipitates [36]. In contrast, waterborne exposure to soluble Ag or Ag nanomaterial clearly induced a significant bioaccumulation of Ag in the cytosolic fraction of the soft tissues of the digestive gland of clams. In worms (*Perinereis aibuhitensis*) during short-term exposure to dissolved Cd, Cd in the cytosolic fraction increased after Cd pre-exposure, and this fraction also increased during the Cd efflux period, indicating that the insoluble fraction of Cd was presumably lost at a faster rate than the loss of cytosolic Cd [37]. In the present study, despite increased concentrations of Ag in the cytosolic fraction in Ag-exposed clams (soluble Ag, Ag nanomaterial), no change in MT levels was observed. Ng et al. [37] showed that in worms (*P. aibuhitensis*) despite increased metal concentrations in the

Table 2. Means $\pm$ standard deviation of biochemical biomarkers and burrowing rates (95% confidence limit between brackets) quantified in *Scrobicularia plana* after 7 d of waterborne exposure to the 4 experimental conditions^a

	Biomarker	30 psu				15 psu			
		Control	Soluble Ag	Dispersant control	Ag NM	Control	Soluble Ag	Dispersant control	Ag NM
Antioxidant and anti-toxic defenses	GPx ($\mu\text{mol NADPH/g prot/min}$)	34 $\pm$ 18	42 $\pm$ 5	18 $\pm$ 7	26 $\pm$ 5	34 $\pm$ 8	45 $\pm$ 15	81 $\pm$ 48	141 $\pm$ 79
	CAT ($\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{g prot/min}$)	226 $\pm$ 42	292 $\pm$ 110	216 $\pm$ 18	279 $\pm$ 104	324 $\pm$ 50	408 $\pm$ 88	447 $\pm$ 141	410 $\pm$ 91
	TAC ($\mu\text{mol Teq/g prot/min}$)	22 $\pm$ 9	18 $\pm$ 10	15 $\pm$ 4	10 $\pm$ 2	53 $\pm$ 37	13 $\pm$ 9	30 $\pm$ 21	21 $\pm$ 8
	GST ($\mu\text{mol CDNB/g prot/min}$)	790 $\pm$ 190	900 $\pm$ 220	240 $\pm$ 125	490 $\pm$ 95	680 $\pm$ 190	1170 $\pm$ 595	960 $\pm$ 330	1145 $\pm$ 320
Cellular damages and apoptosis induction	ACP ($\mu\text{mol p-nit./g prot/h}$)	136 $\pm$ 24	128 $\pm$ 8	144 $\pm$ 32	136 $\pm$ 40	144 $\pm$ 8	104 $\pm$ 8	96 $\pm$ 8	120 $\pm$ 32
	MT ($\mu\text{g/g dry wt}$)	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 3
	LOOH (nmol TBH/g prot)	224 $\pm$ 12	335 $\pm$ 180	258 $\pm$ 14	237 $\pm$ 53	258 $\pm$ 24	290 $\pm$ 36	368 $\pm$ 150	335 $\pm$ 101
	CSP-3 ($\mu\text{mol pNA/g prot/h}$)	14 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4	14 $\pm$ 5	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	25 $\pm$ 23	38 $\pm$ 24
Energetic parameters	ACHE (nmol/mg prot/min)	6.6 $\pm$ 1.8	6.4 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 1.2	6.7 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 1.8	7.8 $\pm$ 2.4
	TBARs (nmol MDA/mg prot)	2.5 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.04	3.2 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 1.2
	*Triglycerides (mg/g dry wt)	2.8 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 0.3
	*Cholesterol (mg/g dry wt)	6.1 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 0.8	4.9 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 2.2	6.1 $\pm$ 2.1
Behavior	Protein (mg/g dry wt)	149 $\pm$ 15	116 $\pm$ 29	113 $\pm$ 11	136 $\pm$ 22	141 $\pm$ 4	135 $\pm$ 20	115 $\pm$ 24	118 $\pm$ 12
	ETS ($\mu\text{mol O}_2/\text{g prot/h}$)	49 $\pm$ 28	30 $\pm$ 4	30 $\pm$ 0.4	32 $\pm$ 5	30 $\pm$ 7	30 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4	29 $\pm$ 8
	LDH ($\mu\text{mol NADH/g prot/h}$)	319 $\pm$ 159	334 $\pm$ 77	179 $\pm$ 10	319 $\pm$ 57	398 $\pm$ 307	314 $\pm$ 73	258 $\pm$ 119	437 $\pm$ 331
	Burrowing rate α (min^{-1})	0.0037 [0.0018–0.0061]	0.0014 [0.0005–0.0028]	0.0015 [0.0006–0.0030]	0.0025 [0.0011–0.0045]	0.0052 [0.0028–0.0082]	0.0020 [0.0009–0.0037]	0.0004 [0.0001–0.0011]	0.0017 [0.0007–0.0031]

^aThe conditions were controls, soluble Ag, dispersant control, and Ag nanomaterial (NM).^bBiomarkers with partial significant differences between exposure conditions described in the text.

GPx = glutathione peroxidase; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; CAT = catalase; TAC = total antioxidant capacity; GST = glutathione-S-transferase; CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; ACP = acid phosphatase; MT = methylthionine; LOOH = lipid hydroperoxides; TBH = tert-butyl hydroperoxide; CSP-3 = caspase 3; AChE = acetylcholinesterase; TBARs = thiobarbituric acid substances; MDA = malondialdehyde; ETS = electron transport system; LDH = lactate dehydrogenase; NADH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide.

Table 3. Results of partial least-squares (PLS) analysis conducted with experimental groups under 2 salinity conditions (30 psu and 15 psu)

Biomarker	15 psu				30 psu			
	VIP	R ^{2b}	Weight axis 1	Weight axis 2	VIP	R ^{2b}	Weight axis 1	Weight axis 2
Protein	1.23 ^a	0.51 ^a	-0.34 ^a	0.05 ^a	0.57	0.09	-0.16	0.04
Triglycerides	1.57 ^a	0.91 ^a	-0.43 ^a	0.09 ^a	0.30	0.19	0.08	0.02
Cholesterol	1.09 ^a	0.70 ^a	-0.30 ^a	0.12 ^a	0.66	0.50	-0.08	-0.34
LOOH	0.89	0.61	0.23	-0.16	0.22	0.08	-0.03	-0.10
ETS	0.40	0.06	-0.09	-0.13	1.27 ^a	0.53 ^a	-0.29 ^a	0.40 ^a
ACP	0.87	0.65	-0.21	0.24	0.72	0.32	0.06	-0.39
GPx	1.54 ^a	0.67 ^a	0.42 ^a	0.20 ^a	1.22 ^a	0.65 ^a	-0.31 ^a	0.27 ^a
GST	0.78	0.15	0.21	0.09	1.59 ^a	0.81 ^a	-0.44 ^a	0.09 ^a
TAC	0.88	0.38	-0.23	0.19	1.62 ^a	0.45 ^a	-0.44 ^a	-0.21 ^a
CSP-3	1.38 ^a	0.67 ^a	0.37 ^a	0.23 ^a	0.35	0.16	-0.08	0.12
LDH	0.53	0.10	0.02	0.31	0.52	0.03	-0.13	-0.14
AChE	0.54	0.11	0.15	-0.03	0.75	0.30	0.09	-0.38
TBARs	1.03 ^a	0.66 ^a	-0.17 ^a	-0.50 ^a	1.87 ^a	0.54 ^a	0.51 ^a	0.21 ^a
MT	0.35	0.12	0.08	0.11	0.97	0.36	-0.27	-0.02
CAT	1.02 ^a	0.62 ^a	0.21 ^a	-0.39 ^a	0.64	0.33	0.09	0.31

^aVariable important in the projection (VIP) reflects the most important predictor biomarkers.^bR² assesses the quality of representation of each variable, and weight axis is used to define the contribution of each variable and the correlation sign.

LOOH = lipid hydroperoxides; ETS = electron transport system; ACP = acid phosphatase; GPx = glutathione peroxidase; GST = glutathione-S-transferase; CAT = catalase; TAC = total antioxidative capacity; CSP-3 = caspase 3; LDH = lactate dehydrogenase; AChE = acetylcholinesterase; TBARs = thiobarbituric acid substances; MT = metallothionein; CAT = catalase.

cytosolic fraction, there was no evidence for increased concentrations of MT, but both the MT synthesis rate and the degradation rate increased, thus leading to a high MT turnover in the Cd-exposed worms. Therefore Ag exposure of *S. plana* compared with unexposed specimens could cause subsequent differences in the cellular distribution of Ag newly taken up during the exposure period. However, soluble Ag quantified by diffusive gradient tended to be greater at 15 psu compared to 30 psu, for the 2 treatments Ag nanomaterial and soluble Ag. Finally, there is experimental evidence that Ag is less bioavailable at higher salinities than at lower salinities [12]. These observations could be explained by differences in Ag speciation between the 2 media (15 psu vs 30 psu) as revealed by MEDUSA simulations. As is well known, Ag bioavailability is speciation dependent [12]; Ag⁺ was shown to be more bioavailable than AgCl_{aq}, which was itself much more

bioavailable than AgCl₂⁻ [11]. In the present study, at 30 psu, Ag soluble species were on average more negatively charged than at 15 psu, potentially limiting bioaccumulation. This finding could also be the result of the mechanisms of ionoregulatory physiology described in the next section *Effects of salinity on clam physiology*.

Effects of salinity on clam physiology

Scrobicularia plana is a euryhaline species that has its highest activity within a narrow salinity interval (20–30 psu) and was tolerant to the 2 salinities (15 psu and 30 psu) [38]. The strategy implemented in the present study has been previously employed for in situ biomonitoring, and it is feasible provided that the influence of salinity has been carefully quantified and recognized as a potential confounding factor on biomarker responses [39]. With that in mind, the present study

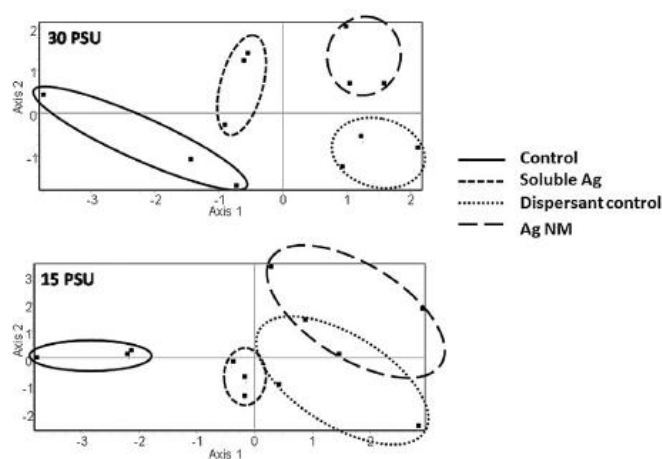


Figure 4. Partial least-squares analysis of the biomarker responses in *Scrobicularia plana* exposed to the 4 exposure conditions (control, soluble Ag, dispersant control, and Ag nanomaterial) at the 2 salinities studied (15 psu and 30 psu). NM = nanomaterial.

aimed to evaluate the influence of salinity on these biomarkers of interest.

The combined effects of salinity, soluble Ag, Ag nanomaterial, and dispersant agent observed and assessed by several statistical approaches showed that clam physiology underwent large modifications according to the degree of salinity, particularly in terms of antioxidative and antitoxic defenses. Salinity is 1 of the dominant environmental factors affecting physiological processes in marine and estuarine organisms [40]. Carregosa et al. [41] have shown, in 3 native and invasive estuarine clams under salinity stress, alterations in biochemical mechanisms, such as increases of antioxidant defenses, to cope with the higher oxidative stress resulting from hyposaline conditions.

Moreover, the behavioral response of an organism when exposed to stress (natural or chemical) may be considered a proxy for biochemical and physiological responses. In the present study, burrowing impairments were observed in clams exposed at 15 psu to both Ag forms (Ag nanomaterial and soluble Ag), but also to the stabilizing solution (dispersant control). At 30 psu, clams exhibited decreases in their burrowing activity only when exposed to dispersant control and dissolved Ag. It is quite possible that 15 psu salinity, close to the lowest limit of salinity tolerance (~10 psu) [38], induced osmotic stress. Indeed, Carregosa et al. [41] showed in *Venerupis philippinarum* that hypo-osmotic stress reduced food intake and led to shell valve closure, to achieve ionic osmoregulation.

Harmful effects related to dispersant control

Unexpectedly, the dispersant control induced higher lipid peroxidation than Ag nanomaterial and a negative effect on burrowing behavior. Previous studies have shown that dispersant control did not usually cause toxicity [42]. In contrast, toxicity of dispersant control to the respiratory tract of rats has been found [43]. Special attention must be paid to the potential interference of the dispersant when one is using these representative manufactured nanomaterials as potential standards for comparison of testing results, for the development of conclusive assessment of data, and for developing appropriate optimization, harmonization, and validation of test methods.

Biological effects of Ag exposure

Biological effects of Ag nanomaterials were clearly highlighted in *S. plana* by PLS regression analysis conducted separately at 15 psu and 30 psu: different response patterns were found between controls and Ag-exposed bivalves in either soluble or NP form and the associated dispersant control.

For clams exposed to their usual salinity (30 psu), the most important biomarkers detected by PLS were ETS, GPx, GST, total antioxidant capacity, and TBARs, which highlighted the different responses observed in the experimental groups. Compared to control clams, the 3 other groups showed reduced antioxidative capacities that were more marked in clams exposed to Ag nanomaterial, as well as higher ETS levels, indicating impairment of metabolic activity in clams that suffered from lipid peroxidation of their cellular membranes [17].

At the lowest salinity (15 psu), these effects were more pronounced and were associated with increased apoptosis mechanisms and reduced structural and energetic reserves in Ag nanomaterial-exposed clams.

These biological effects could be linked to the higher Ag bioaccumulation observed in clams under the lowest (15 psu)

salinity tested. Although the effects were accentuated in Ag nanomaterial-exposed clams, it remains difficult to attribute the effects to soluble or nanoparticulate Ag forms even if Ag nanomaterial toxicity was generally explained by the release of Ag [11]. In marine organisms exposed to metal and metal oxide NPs, oxidative stress is usually associated with dissolution of metal ions, but such stress has also been demonstrated with insoluble NPs [14]. The present study's results are in accordance with previous findings observed in the same bivalve species [22] but also in *Crassostrea virginica* [44] and *Mytilus galloprovincialis* [45] using different types of larger AgNPs with several coatings.

CONCLUSIONS

The present study's experiment assessed the fate of Ag nanomaterial and the dispersant control used under 2 salinity conditions (15 psu and 30 psu) and their associated biological effects on *S. plana* using a multimarker approach analyzed in an integrated way by PLS regression. The Ag nanomaterial at both salinities homoaggregated but remained in suspension. After 7 d of exposure, no significant influence of salinity was observed on the dissolution rate of Ag ions from Ag nanomaterial. At both salinities tested (15 psu and 30 psu), no mortality and no change in condition index were observed in the clams. Nevertheless, the Ag bioaccumulation in the digestive gland showed a significant difference according to the degree of salinity. Indeed, the results showed a significantly greater bioaccumulation at 15 psu compared to 30 psu. The additional incorporation of metal in tissues was observed as greater in the cytosolic fraction than in the insoluble fraction. In this case, the observed effects compared with the salinity and the biological effects will depend on the incorporation of metal in the organisms. Indeed, under their normal salinity condition (30 psu) and under different treatments (Ag nanomaterial, dispersant control, and soluble Ag), clams were stressed by oxidative mechanisms inducing lipid peroxidation of cellular membranes. The decreasing salinity condition accentuated these effects with apoptosis, and reduced structural and energetic reserves accompanied by cellular alterations, particularly in Ag nanomaterial-exposed clams. Moreover, the hyposalinity conditions associated with Ag treatments and the dispersant control also strongly affected burrowing behavior clams, which may favor predation. The influence of the dispersant agent must be taken into account when one is evaluating the toxicity of nanomaterials. In terms of the different levels of biological organization (subindividual and individual) impacted in clams under Ag (soluble and nanoparticulate) and dispersant control exposures, we could not exclude the possibility of a risk at the population or ecosystem levels, with organisms presenting higher vulnerability to predation and reduced ecological functions. However, further studies are needed under more complex and long-term environmental conditions to confirm the present study's results.

Supplemental Data—The Supplemental Data are available on the Wiley Online Library at DOI: 10.1002/etc.3428.

Acknowledgment—Financial support was provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) for the salary of C. Bertrand and running costs, as well as by CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). The present study is a contribution to Labex Ressources 21 (ANR-10-LABX-21-01, Strategic Metal Resources of the 21st Century) and Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). The research leading to these results has been partially funded by the

European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project NANOREG (A common European approach to the regulatory testing of nano-materials), grant agreement 310584. The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology.

Data availability—Data may be accessed at the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under grant agreement ANR-3-CESA-0014, project NANOSALT.

REFERENCES

- McLusky DS, Elliott M, eds. 2004. *The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D, Hull MS. 2015. Nanotechnology in the real world: Redefining the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6:1769–1780.
- Gottschalk F, Nowack B. 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J Environ Monit* 13:1145–1155.
- Farkas J, Peter H, Christian P, Gallego Urrea JA, Hasselöf M, Tuoriniemi J, Gustafsson S, Olsson E, Hylland K, Thomas KV. 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ Int* 37:1057–1062.
- Benn T, Cavanagh B, Hristovski K, Posner JD, Westerhoff P. 2010. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual* 39:1875–1882.
- Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR. 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int* 37:517–531.
- BBC Research & Consulting. 2014. Global markets for nanocomposites, nanoparticles, nanoclays, and nanotubes. [cited 2016 January 20]. Available from: <http://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanocomposites-market-nan021f.html?vsmaid=203/%3E>
- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2012. Safety of manufactured nanomaterials—Sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials. [cited 2015 September 9]. Available from: http://oecd.org/env/ehs/nanosafety/list_of_representative_MN_for_testing_Nov_2012.pdf
- Klein CL, Stahlmecke B, Romazanov J, Kuhlbusch TAJ, Van Doren E, De Temmerman P-J, Mast J, Wick P, Krug H, Locoro G, Hund-Rinke K, Kördel W, Friedrichs S, Maier G, Werner J, Linsinger T, Gawlik BM, Comero S. 2011. NM-Series of representative manufactured nanomaterials. NM-300 silver characterisation, stability, homogeneity. Publications Office, European Commission, Luxembourg.
- Auffan M, Matson CW, Rose J, Arnold M, Proux O, Fayard B, Liu W, Chaurand P, Wiesner MR, Bottero J-Y, Di Giulio RT. 2014. Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology* 8:167–176.
- Levard C, Mitra S, Yang T, Jew AD, Badireddy AR, Lowry GV, Brown GE. 2013. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environ Sci Technol* 47:5738–5745.
- Bury NR, Hogstrand C. 2002. Influence of chloride and metals on silver bioavailability to Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yolk-sac fry. *Environ Sci Technol* 36:2884–2888.
- Mouneyrac C, Buffet P-E, Poirier L, Zalouk-Vernoux A, Guibolini M, Faverney CR, Gilliland D, Berhanu D, Dybowska A, Châtel A, Perrein-Ettajani H, Pan J-F, Thomas-Guyon H, Reip P, Valsami-Jones E. 2014. Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ Sci Pollut Res* 21:7899–7912.
- Baker TJ, Tyler CR, Galloway TS. 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut* 186:257–271.
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37:277–285.
- Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Cottier A, Rainbow PS, Smith BD. 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestoidea gammarus*: A cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat Toxicol* 57:225–242.
- Canesi L, Ciacchi C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar Environ Res* 76:16–21.
- Suresh K, Mohandas A. 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *J Invertebr Pathol* 55:118–125.
- Garud M, Auffan M, Devin S, Felten V, Pagnout C, Pain-Devin S, Proux O, Rodius F, Sohm B, Giamberini L. 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology*, in press. DOI: 10.3109/17435390.2016.1146363
- Labille J, Harns C, Bottero J-Y, Brant J. 2015. Heteroaggregation of titanium dioxide nanoparticles with natural clay colloids. *Environ Sci Technol* 49:6608–6616.
- French ‘Mussel Watch’ Programme, Réseau National d’Observation. [cited 2015 September 15]. Available from: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00157/26834/24953.pdf>
- Buffet P-E, Zalouk-Vernoux A, Châtel A, Berthet B, Métais I, Perrein-Ettajani H, Poirier L, Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Rissio-de Faverney C, Guibolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci Total Environ* 470–471:1151–1159.
- Bonnard M, Roméo M, Amiard-Triquet C. 2009. Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. *Hum Ecol Risk Assess Int J* 15:11–26.
- Gosling EM. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology, and Culture*. Fishing News Books, Oxford, Malden, MA, USA, pp 95–97.
- Lucas A, Beninger PG. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44:187–200.
- Sroda S, Cossu-Leguille C. 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeselii*. *Chemosphere* 83:538–544.
- De Coen WM, Janssen CR. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery* 6:43–55.
- Buffet P-E, Amiard-Triquet C, Dybowska A, Rissio-de Faverney C, Guibolini M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicol Environ Saf* 84:191–198.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289–300.
- Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. 2007. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39:175–191.
- Eriksson L, Johansson E, Katteneh-Wold S, Wold S. 1999. *Introduction to Multi- and Megavariate Data Analysis Using Projection Methods (PCA and PLs)*. Umetrics, Umea, Sweden, pp 225–246.
- Thill A, Moustier S, Aziz J, Wiesner MR, Bottero JY. 2001. Flocs restructuring during aggregation: Experimental evidence and numerical simulation. *J Colloid Interface Sci* 243:171–182.
- Veerapaneni S, Wiesner MR. 1996. Hydrodynamics of fractal aggregates with radially varying permeability. *J Colloid Interface Sci* 177:45–57.
- Turner A, Brice D, Brown MT. 2012. Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* 21:148–154.
- Eisler R. 2009. *Compendium of Trace Metals and Marine Biota. 1: Plants and Invertebrates*. Elsevier, New York, NY, USA, pp 349–400.
- Berthet B, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Martoja M, Jeantet AY. 1992. Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in bivalve molluscs: Ecotoxicological and health consequences. *Sci Total Environ* 125:97–122.
- Ng TY-T, Rainbow PS, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Wang W-X. 2008. Decoupling of cadmium biokinetics and metallothionein turnover in a marine polychaete after metal exposure. *Aquat Toxicol* 89:47–54.
- Verdelhos T, Marques JC, Anastácio P. 2015. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecol Indic* 52:96–104.
- Amiard-Triquet C, Amiard C, Mouneyrac C. 2015. *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing With Emerging Risks*. Elsevier, Boston, MA, USA, pp 153–171.
- Navarro JM. 1988. The effects of salinity on the physiological ecology of *Chloromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 122:19–33.

Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam

Environ Toxicol Chem 35, 2016 2561

41. Carregosa V, Figueira E, Gil AM, Pereira S, Pinto J, Soares AMVM, Freitas R. 2014. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 171:36–43.
42. Schlich K, Klawonn T, Terytze K, Hund-Rinke K. 2013. Hazard assessment of a silver nanoparticle in soil applied via sewage sludge. *Environ Sci Eur* 25:17.
43. Sauer UG, Vogel S, Aumann A, Hess A, Kolle SN, Ma-Hock L, Wohlleben W, Dammann M, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. 2014. Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomaterial cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 276:1–20.
44. McCarthy MP, Carroll DL, Ringwood AH. 2013. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquat Toxicol* 138–139:123–128.
45. Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, Sousa VS, Teixeira MR, Pinheiro JP, Bebianno MJ. 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 101: 208–214.

Supplemental data

Table S1 Endpoints and expected results (compared with control) of biomarkers at sub-individual and individual levels measured in *Scrobicularia plana*.

Biological level	Endpoint	Biomarker	Abbreviation	Unit	Expected results
sub-individual	Energetic parameters	Protein concentration	Prot.	mg/g DW	decrease
		Cholesterol concentration	Chol.	mg/g DW	decrease
		Triglycerid concentration	Trigly.	mg/g DW	decrease
		Electron Transport System	ETS	$\mu\text{mol O}_2/\text{g DW/h}$	increase
		Lactate dehydrogenase	LDH	$\mu\text{mol NADH/g prot/h}$	increase
	Antioxidant and antitoxic defenses	Metallothionein	MT	$\mu\text{g/g DW}$	increase
		Phosphatase acid	ACP	$\mu\text{mol p-nit./ g prot /h}$	increase
		Glutathion-S-transferase	GST	$\mu\text{mol CDNB/ g prot/ min}$	increase
		Total Antioxidant Capacity	TAC	$\mu\text{mol Teq/ g prot/ min}$	increase
		Catalase	CAT	$\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{g prot/ min}$	increase
	Cellular damages and apoptosis induction	Glutathion Peroxidase	GPx	$\mu\text{mol NADPH/ g prot/ min}$	increase
		Lipid hydroperoxide	LOOH	$\mu\text{mol TBH/g prot}$	increase
		Caspase	CSP-3	$\mu\text{mol pNA/ g prot/h}$	increase
		Acetylcholine esterase	AchE	$\text{nmol / g prot/ min}$	decrease
		Thiobarbituric acid reactive substances	TBARs	mmol MDA/ g DW	increase
individual	behavior	burrowing rate	-	$\alpha (\text{min}^{-1})$	decrease

Table S2 Aggregate characteristics returned by SmoluCalc model at time 7d, as a function of the water salinity and of the fractal dimension (1.7, 2.2).

water	$D_{agr} \text{ (nm)}$	Df	$\square$	porosity	density	$V_{Stokes} \text{ (m/d)}$	$t_s \text{ (d)}$
30 psu	302	2.2	0.06	0.962	1.36	1.53E-03	98
	515	1.7	0.012	0.998	1.02	2.86E-04	524
15 psu	395	2.2	0.11	0.970	1.29	2.11E-03	71
	726	1.7	0.02	0.998	1.01	3.64E-04	412

D_{agr} is the diameter, Df is the fractal dimension, $\square$ is the sticking efficiency, V_{Stoke} is the settling velocity and t_s is the sedimentation time for a 15 cm water column.

The SmoluCalc model used here for numerical extrapolation is based on the Von Smoluchovski equation, taking count of both inter particle collision frequency and sticking efficiency ($\square$). The two main parameters, fractal dimension and sticking efficiency were manually optimised so that the numerical plot best superimposes the experimental data.

The fractal dimension of aggregates (D_f), which typically ranges between 1.7 and 2.2 for rapid and slow aggregation regimes respectively, constituted an unknown characteristic. For this reason, the two extreme values 1.7 and 2.2 were used in order to compare the resulting numerical scenarios. Note that given the slow aggregation measured experimentally in this work, a high fractal dimension close to 2.2, i.e. dense aggregates, is likely to be used. Indeed, low sticking efficiency implies higher probability for the colliding particles to assemble together in a denser structure. A typical fractal dimension of 2-2.2 is usually measured for such aggregates resulting from the so-called reaction limited aggregation (see e.g. Gardner K.H., Theis T.L., and Young T.C..1998. Colloid aggregation: numerical solution and measurements. *Colloids and Surface A* 141: 237-252).

For this reason, only the scenario based on the value 2.2 is reported in the main manuscript, while the second scenario can be compared below.

The sticking efficiency ranges between 0 and 1. Different optimal values were found respectively to the fractal dimension used 2.2 and 1.7. They are presented in Table S2.

Higher fractal dimension implies lower aggregate size at $t = 7$ days (D_{agr}), but higher sticking efficiency (fivefold). This is due to the fact that at the aggregation rate given by the measurement, when size decreases due to higher aggregate compactness, sticking efficiency has to increase to compensate for the decrease in collision frequency. The impact of the range of fractal dimension tested here typically gives factor 2 in the final aggregate size at 7 days and a factor 5 in the sticking efficiency.

The consequences of such uncertainty are also estimated in Table S2 in term of the aggregate residence time in the 15 cm water column (t_s). The Stokes sedimentation rate (V_{stokes}) was calculated based on the aggregate porosity, obtained from the fractal dimension. As a result, it can be observed that the residence time, ranges from 71 to 524 days, both salinities taken together.

Based on these considerations, we can reasonably conclude that whatever the error coming with this numerical approach, the nanoparticle residence time in the water column remains at least tenfold longer than the experimental 7 days exposure realised in this work.

In Figure S1 are plotted the experimental time evolutions measured in this work and the numerical fit extrapolated to 7 days using a fractal dimension of 2.2 or 1.7.

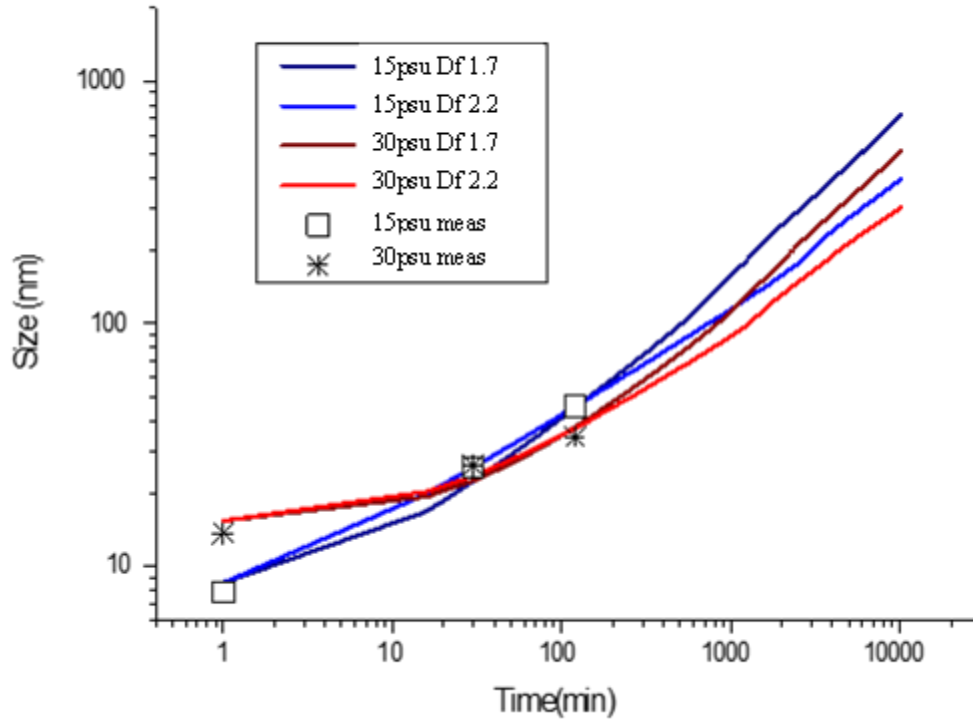


Figure S31 Median aggregate size measured experimentally by DLS at time 0, 30 min and 120 min in artificial seawater at 15 or 30 psu (discrete symbols), and numerical fits returned by SmoluCalc model over 7 days extrapolation (continuous lines), considering a fractal dimension of 1.7 or 2.2

Chapitre V:
Impact of the degradation byproducts of
silver-based wound dressing and reference
nanomaterial
(NM-300K) on two aquatic bivalves
Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana
as a function of salinity.

Bertrand Carole*‡#, Catherine Mouneyrac‡, Laure Giambérini*, Laurence Poirier#, Aurore Zalouk-Vergnoux#, Hanane Perrein-Ettajani‡, Mélanie Auffan\$, Christophe Pagnout*, Simon Devin*

(Soumission prévue en octobre-novembre 2016)

*Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC, CNRS UMR 7360), Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, F-57070 Metz, France

‡LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

#LUNAM Université, Université de Nantes, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 9 rue Bias, F-44035 Nantes Cedex 01, France

\$Université d'Aix en Provence, CEREGE, Technopôle de l'Arbois-Méditerranée, BP80, F-13545 Aix en Provence Cedex 4, France

Abstract

Because of its well-documented antibacterial and antifungal properties, silver is one of the most frequently element included in nano-enabled products (NAPs). Their use in a large variety of industrial processes raises increasing concerns on fate, behavior and impact of NAPs. In the present study, particular concerns have been done on the impact of an antimicrobial silver band-aid (Acticoat™) and a standardized manufactured silver nanomaterials (NM-300K) and its stabilizing solution across a salinity gradient (1.5, 15 and 30 psu) using two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. The aim of the study was to assess the fate and the behavior of silver after exposure to both NAPs. Transfer of metals either from the medium or from the dietary (algal source) into digestive gland of both organisms have been determined. Results showed release of Ag ions from Acticoat™ and NM-300K. The reduction of Ag uptake into the organisms measured across the salinity gradient could be due to the formation of Ag-Cl complexes. Using multi-biomarker approach, biological effects of the different tested products have been assessed at individual and sub-individual levels on both species under the salinity gradient. At the field salinity (1.5 and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively), behavioral tests showed impacts of the treatment (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant); whereas after exposure to hypo or hyper saline conditions (15 psu) for both species, none organisms were able to burrow into the sediment whatever the treatments. An integrative biomarker approach permitted to observe activation of antioxidant defenses combined with cell damage on all tested conditions (Acticoat™, NM-300K and Supernatant).

Keywords: Silver, standardized manufactured nanomaterials, nano-enabled products, salinity gradient, *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, integrative biomarker responses.

1. Introduction

Nano-enabled products (NAPs) are composed with engineered nanomaterials (ENMs) defined as nano-object (e.g. nanoparticles, nanofiber and nanoplate) intentionally produced by human in order to develop unique or novel properties resulting from their nano-size. Silver is one of the most frequently included element in ENMs and NAPs (e.g. cosmetics, clothings, medical areas and personal health care products) due to their well-documented antibacterial and antifungal properties (Kim et al., 2007). Inventory of publications on Web of Science database (June, 2016) showed that the majority of (eco)-toxicologically research is performed on silver nano-objects (93,509 publications) while few research are done on ENMs and NAPs (7531 and 51 publications respectively). To reach a realistic and relevant approach of environmental risk, it seems necessary to evaluate the impact of ageing silver ENMs (Ag ENMs) obtained from NAPs. In this study, the commercialized Band-aid Acticoat™ has been selected because of its common use during the last two decades to treat burn and wounds (Courtemanche et al., 2015). Indeed, the properties of Ag ENMs are valuable in a therapeutic setting but many uncertainties remain on the fate of silver contained in NAPs on human health, terrestrial and aquatic environments. Since nano-ecotoxicology research is conducted, it appears necessary to use standardized nanomaterials to provide benchmark responses on a well characterized nanomaterial. Joint Research Centre (JRC) classified silver nanomaterial in the priority list and proposed to improve the knowledge on toxicity and associated mechanisms of Ag ENMs using standardized nanomaterial NM-300K. Principal concerns of Ag ENMs ageing may be the possible risk of release of silver forms (ions or nanoparticles) directly into the environment. The aquatic environment is defined as the ultimate receptacle of all contaminants, including ENMs (Klaine et al., 2008). Modelling studies on the release of silver into the aquatic compartment have allowed to establish a range of predictive environment silver concentrations (Ag PEC) ranging between 0.5 ng/L and 2 ng/L (Fabrega et al., 2011). Furthermore, no information of the real concentration of Ag ENMs occurring in the aquatic compartment is yet available due to the limit of analytic detection. Consequently the modelling of NM environmental concentrations (range of ng/L) can only be considered as guidelines for ecotoxicity tests (Gomes et al., 2013; Vale et al., 2016). Taking into account possible amplification of Ag ENMs entrance into the environment due to the increasing consumption in everyday products, Ag concentration used in this present study was 51 µg/L for NAPs, considering that preliminary test showed Ag labile raised 10 µg/L. Thus, for standardized ENMs, NM-300K the concentration of 10 µg/L was used. The release of silver from ENMs or NAPs in aquatic environment will flow into the worldwide oceans through the main rivers. Considering the different salinity conditions from freshwater to seawater, it is fundamental to determine how Ag ENMs will be affected by chloride ions. The fate of Ag ENMs (hetero-aggregation, homo-aggregation or complexation with natural organic matter (NOM)) and its presence in environmental compartments (water column, sediments) are depending on many characteristics of the aqueous media (e.g. ionic composition, salinity, pH, redox potential) (Keller et al., 2010).

In the literature, it is expected that Ag^0 exposed to a saline medium do not react with chlorides as quickly as Ag^+ (Dunn and Edwards-Jones, 2004), but most of ENMs are generally agglomerated once in contact with water (Keller et al., 2010). Knowing that Ag ENMs aggregation in the environment is expected, their deposition onto the sediment may occur and could modify the organism's uptake. In this context, uptake of ENMs by endobenthic bivalves is a major concern (Canesi and Corsi, 2016). Endobenthic bivalves represent target organisms to assess the toxicity of ENMs because of their dual feeding habits, both filter feeder (thus contributing to water column filtration) and deposit feeder. Thus they can be exposed to both suspended and aggregated ENMs. In the present study, two euryhaline species were selected because of their ability to tolerate a wide range of salinity, *Corbicula fluminea*: 1 to 22 practical salinity unit (psu) (Evans et al., 1977) and *Scrobicularia plana*: 30 to 5 psu (Verdelhos et al., 2015)) living respectively in freshwater and littoral areas. Both organisms play an important role in the structure and functioning of ecosystems due to their burrowing activity in muddy sediments (Alexander et al., 2007). Both organisms are well-target to accumulate and/or internalize (nano) particles into their tissues, especially into the digestive gland classified as detoxifying organ (Marigómez et al., 2002). Dietary uptake has been admitted as a pathway of Ag ENMs uptake (Amiard-Triquet et al., 2015). Thus, this present study has been conducted taking into account either the presence or absence of a dietary source for *C. fluminea* and *S. plana*, using unicellular algae, *Chlorella* sp (freshwater algae) and *Tetraselmis suecica* (seawater algae) respectively. This work proposed to assess the impact of susceptible (bio) transformation of the band-aid Acticoat™ NAP and the NM-300K as a standardized silver nanomaterial during their ageing into the aquatic environment characterized by a salinity gradient (1.5, 15 and 30 psu) in presence of two euryhaline bivalves.

The present study focused on the transfer of Ag from Ag ENMs either from the water medium or from the diet into digestive gland of both organisms after 7 days of exposure. Ag ENMs are well known to generate reactive oxygen species (ROS) resulting either from nanoparticulate forms, or from the potential release of Ag ions (Ag^+) from ENMs or from both of them (Fabrega et al., 2011). Since oxidative stress is defined as one of the most common nano-toxicity effect, a particular interest was to study different types of enzymatic antioxidant defenses [glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC), glutathione-S-transferase (GST) and lysosomal activities with acid phosphatase activities (ACP)]. This battery of biomarker was completed with the development of tools to assess Ag toxicity on cellular damage and apoptosis induction including caspase (CSP-3) and lipid hydroperoxides (LOOH) as described in Bertrand et al. (2016) and Garaud et al. (2016). Structural and energetic parameters were also measured such as triglyceride content (TRIGLY), electron transport system (ETS) and lactate dehydrogenase (LDH).

The first hypothesis of this present study was that NAPs Acticoat™ and a standardized ENMs (NM-300K and its stabilizing solution named Supernatant) may be affected by entering into aquatic compartments characterized by a salinity (1.5, 15 and 30 psu) and consequently may induce modifications of their fate and behavior.

The second hypothesis was that exposure of both euryhaline organisms *C. fluminea* and *S. plana* across a salinity gradient in presence or absence of a dietary source during 7 days may influence the multi-biomarker responses at different biological levels (sub-individual, individual). To evaluate nano-ecotoxicological effects, integrative statistical tools namely Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) and Integrated Biomarker Response (IBR) have been developed to understand the relationship between the multi-stress conditions (Ag ENMs treatments, dietary and salinity conditions) (Figure 1).

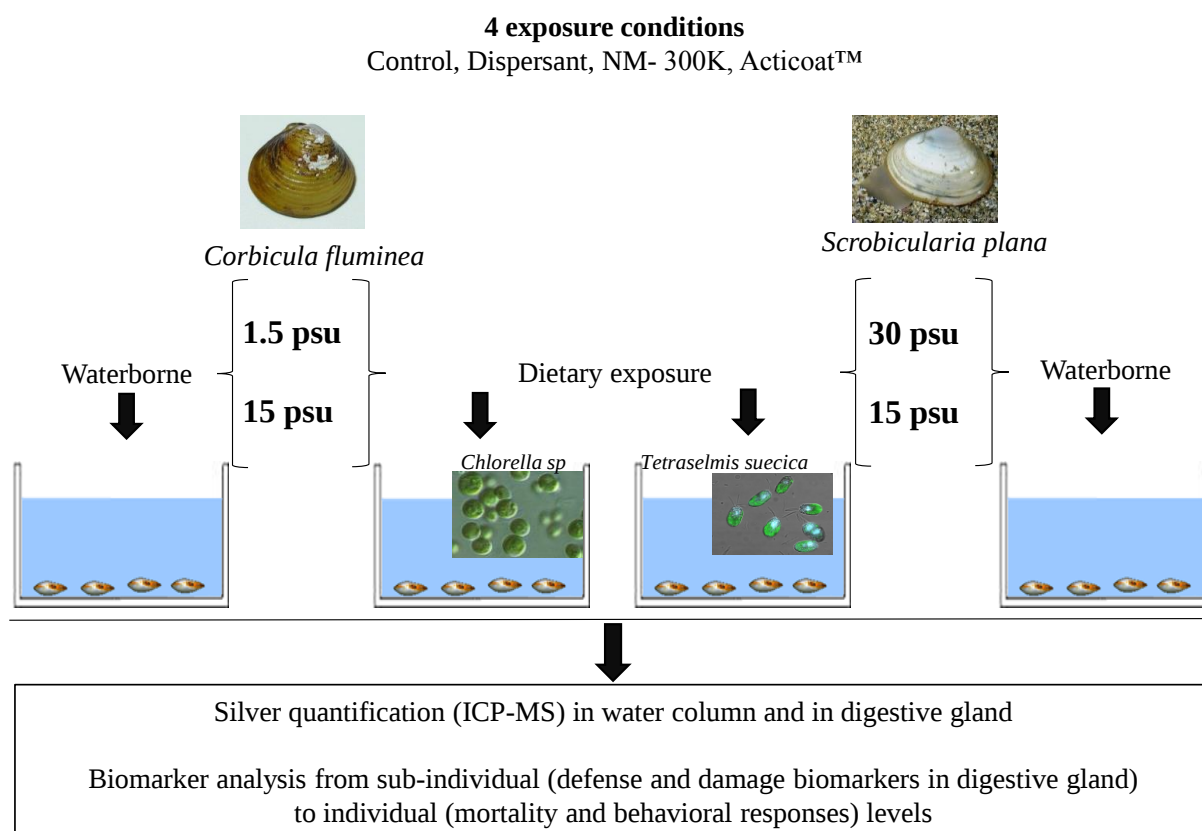


Figure 1 : Flowchart of exposure designs of *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of artificial water and chemicals used

To ensure a similar exposure medium for all experimental conditions, artificial water solutions were prepared using sea salt from Tropic Marin® (Tropicarium Buchshlag Dreieich Germany) and deionized water for each tested salinity (1.5, 15 and 30 psu). Chemical products were purchased from Thermofisher (Waltham, Massachusetts) and Sigma-Aldrich (Chemical Co, St Louis, MO).

2.2 Ag-based nanomaterial and nanoproduct

2.2.1 Acticoat™ dressing

Acticoat™ (Westaim Biomedical Inc., Fort Saskatchewan, Alberta, Canada) is composed with a nanocrystalline silver-coated antimicrobial wound dressing (Acticoat™ #66000808, Smith and Nephew Medical Limited, Hull, UK). Acticoat™ consists of an absorbent polyester-core with 10 ± 11 $\mu\text{g Ag/cm}^2$ in the commercialized product. In addition, this polyester core is sandwiched between two layers of silver coated with high density polyethylene which contain the major part of Ag concentration (650 ± 60 $\mu\text{g Ag/cm}^2$). Preliminary measurements were performed to determine the concentration of Ag per square centimeter of wound dressing. According to this information, the organisms were exposed to a piece of 0.4 cm x 0.4 cm (0.16 cm^2) of Acticoat™ dressing corresponding to a final concentration of ~ 50 $\mu\text{g Ag/L}$ in a 3L experimental beaker. The physico-chemical stability of Acticoat™ wound dressing has been studied in 3L beakers at three different salinities (1, 10 and 30 psu) during 7 days of exposure without any clams or algae. Temperature, salinity, day/night cycles were similar to the experiment performed with the clams. Dissolved Ag release was measured overtime after ultrafiltration at 3KDa mesh (Amicon®) of 5 mL of the water column. Concentrations of dissolved Ag in the ultrafiltrate was quantified by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (NexION 300X, Perkin Elmer). Geochemical modeling of Ag speciation in the water column was performed using the MEDUSA code to predict phases that predominate in the pH and Eh conditions. The fixed activities of Ag and other components in the water column were used as input data.

2.2.2 NM-300K suspension

The NM-300K suspension containing Ag NMs was purchased from the Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied ecology, (Schmallenberg, Germany). This Ag ENM belongs to the priority list from JRC and is well characterized. It is a nano-silver colloidal suspension (nominal silver content of 10 w/w %) with stabilizing agent consisting of 4 % (w/w) of polyoxyethylene glycerol trioleate (PGT) and 4 % (w/w) of polyoxyethylene (20) sorbitan mono-laurat (Tween 20). Transmission electron microscopy (TEM) analysis indicated a particle size of approximately 15 nm with a narrow size distribution (99 %). Using high resolution TEM, a second peak corresponding to smaller particles (~ 5 nm) was observed (Klein et al., 2011).

For the experimental test, NM-300K suspensions have been prepared with NM-300K batch diluted in Milli-Q water to obtain a final concentration of 10 mg Ag/L, according to the recommendations from the JRC (Klein et al., 2011). To assess the potential toxicity of the stabilizing solution of NM-300K, suspension of NM-300K (10 mg Ag/L) was ultracentrifuged at $300,000 \times g$ during 1h30 (Ultracentrifuge Beckman L60, France).

By recovering the supernatant, toxicity assessment of stabilizing agent (Supernatant) has been also evaluated. Total Ag concentration in the Supernatant measured by ICP-MS was equal to 0.39 ± 0.03 mg Ag/L (n=3).

2.3 Collection and acclimatization of organisms

Individuals of *C. fluminea* and *S. plana* were collected in June 2014 at Argancy in the Moselle River (49° 19'48''W, 6° 19'81.11 N, France) and in the Bay of Bourgneuf located on the French Atlantic coast (1° 59'04'80''W, 47° 01'50.35'' N) respectively. The main physico-chemical parameters of water measured with the multiparameter system ODEON (Ponsel, Caudan, France) were in the Moselle river: pH: 7.5; salinity: 1.5 psu; conductivity: 2.38 mS cm⁻¹ and in the Bay of Bourgneuf: pH: 8.1; salinity: 31.2 psu; conductivity: 30.88 mS cm⁻¹. To reduce the potential influence of sexual maturity, bivalves with shell between 15 to 20 mm were selected. Then, animals were transported to the laboratory in cool boxes with sediment from the collection site. Bivalves were immediately transferred into aerated artificial seawater (Tropic Marine®) at 1.5 psu or 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively, during three days in a climate chamber (15°C as field temperature). For the 15 psu tested salinity, bivalves were progressively transferred from the field salinity (1.5 and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively) to 15 psu, by three-day steps of acclimatization, placing them in plastic tanks (50L) with artificial seawater (35L) under continuous aeration. Control groups of organisms were kept in artificial water at the field salinity: 1.5 psu for *C. fluminea* and 30 psu for *S. plana*.

2.4 Algal inoculum preparation

Chlorella sp. was purchased in lyophilized form from *Bio Chlorella* (GSE Vertrieb GmbH, DE-Öko-024, 66119 Saarbrücken, Germany) and suspended in artificial water at two salinities (1.5 and 15 psu) for *C. fluminea*.

Tetraselmis suecica was purchased in F/2 medium by Teramer® (Montpellier, France). At the end of the exponential growth phase, the cell number was determined on a Malassez counting chamber. Then a volume of algal cells was concentrated from the culture medium by decantation and centrifugation, washed once with artificial seawater according to the two tested salinities (15 and 30 psu) and suspended in 10 mL of the same water salinity. Then this preparation was inoculated in each beaker of *S. plana* to obtain a final algae concentration of 1×10^5 cells/mL.

2.5 Experimental design

Following acclimatization, bivalves (n=10 for each species and per salinity tested) were introduced into beakers (3L) containing artificial water at the tested salinities (*C. fluminea*: 1.5 and 15 psu and *S. plana*: 15 and 30 psu) during 7 days.

Each species (*C. fluminea* and *S. plana*) acclimatized to both salinities was exposed to four exposure conditions, uncontaminated system (Control), supernatant of the ultracentrifuged solution of NM-300K (Supernatant), reference ENMs (NM-300K) and Ag ENMs dressing (Acticoat™) during 7 days. At day 0, 3 mL of NM-300K at 10 mg Ag/ L into 3L beaker were injected to obtain a nominal final concentration of 10 µg Ag/L. To test the effects of the stabilizing solution of NM-300K, 3 mL of supernatant solution have been also introduced into 3 L beaker defined as Supernatant conditions. In the case of Acticoat™ exposure condition, a piece of 0.4 cm x 0.4 cm of Acticoat™ dressing was placed in suspension into 3L beaker to obtain a nominal final concentration of 50 µg Ag/L at the end of the exposure duration (7 d). The piece was suspended into the water columns using an inert fishing line.

Each species was exposed to two salinities (*C. fluminea*: 1.5 and 15 psu and *S. plana*: 15 and 30 psu), to four exposure conditions (Control, Supernatant, NM-300K, Acticoat™) with or without a dietary source (algae). *S. plana* and *C. fluminea* were fed with a unicellular algae, *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. respectively at 10⁵ cells/mL. To maintain oxygen levels closed to the saturation during the exposure period (7 d), beakers were aerated 2 hours daily. Physico-chemical parameters were monitored daily with multiparameter system ODEON (Ponsel, Caudan, France) to measure salinity, pH, conductivity and oxygen rate.

2.6 Silver quantification

For metal quantification, all disposable laboratory equipments were previously cleaned in 10 % HNO₃ bath (24 h) and rinsed with deionized water (3 times). To determine the absence of matrix effects and validate the measurements conducted by ICP-MS (NexION 300x-PerkinElmer), additional analysis on standard reference material 1566B (US National Institute of Standards and Technology) have been done and results were in accordance to the reference material certificate (0.67 ± 0.01 µg Ag/g). Total Ag concentrations were measured in digestive gland of five bivalves per treatment (µg/kg dry weight) after 7 days of exposure, as described in Bertrand et al. (2016). Quantification of total Ag in exposure media (expressed in µg Ag /L), was done in 5 mL of water column stabilized with 2 % of HNO₃ w/w for each treatment and salinity at the end of experiment (7d).

2.7 Mortality

Mortality was assessed following the inability of clams to close their valves after a mechanical stimulus. Measurements were performed daily during the acclimatization period and after 7 days of exposure.

2.8 Behavioral experiments

At the end of exposure, bivalves were submitted to burrowing tests with artificial sediment mixture according to the methodology fully described by Bertrand et al. (2016).

Briefly, artificial sediment mixture was homogenized and artificial water at tested salinities was slowly put down onto the sediment surface a day before the test. Bivalves (n=10 per treatment) were placed at the sediment surface at 15°C in the dark. Then, burrowed individuals were counted during 6 hours (every 5 minutes during the first hour, every 10 minutes during the second hour and every 20 minutes during the 4 last hours).

2.9 Biomarker analysis.

Biomarker analysis was conducted on the automated chemistry analyzer Konelab 20 Xti (Thermo Scientific). Digestive glands from both species (n=5 animals per treatment) were dissected after 7 days of exposure and stored at -80°C until biochemical measurements. A battery of biomarkers was measured on these samples following protocols fully described by Bertrand et al. (2016) and Garaud et al. (2016). Multi-biomarker approach including TAC, GST, CAT and ACP activity measurements has been achieved to assess the antioxidant and antitoxic defenses. Additional markers have been determined, such as LOOH and CSP-3 activity, in order to assess cellular damage. ETS, Trigly and LDH activities were also analyzed to evaluate the possible variation of structural and energetic parameters. As described in details by Buffet et al (2012), determination of metallothioneins (MT) has been carried out using differential pulse polarography (DPP) on the digestive glands of individual clams (n=5 animals per treatment).

2.10 Statistical analysis

All statistical calculations were made using R version 3.1.0 (R Core Team, 2014). Comparison analysis involving sampling number equal to 2 per condition was not used to develop statistical analyses. Assessment by Levene and Shapiro-tests on dataset (n> 2 samples) has been done to verify homoscedasticity and normality respectively. When the first assumption was not verified, Kruskal-Wallis tests have been conducted to evaluate effects according to treatment, salinity and food conditions. Significant differences between tested conditions have been considered only when the threshold *p*-value was lower than 0.05. The burrowing kinetics of individuals over time were developed on the burrowing data using a generalized nonlinear model described in details in Buffet et al. (2014). To explore how independent variables (biomarker data) influenced the responses' pattern of dependent variables (exposure conditions including treatments, salinities and food conditions), Manova tests have been conducted. To describe the link between analyzed battery of biomarkers used in this study and the multi-stress conditions, a Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed on both species and on all conditions (32 groups), to select the more describing biomarkers. The selection was based on the variable importance in the projection (VIP), biomarkers being kept when the value was greater than 1. Then, to assess the general stress index of both organisms exposed to multi-stress conditions, the multi-biomarker assessment was synthesized using the integrated biomarker response method (IBR).

IBR is an index reflecting the integration of all biomarker responses at once, whose calculation is based on a graphical projection of the standardized values of a set of biomarkers (Devin et al., 2014). A permutation procedure is then applied to calculate the 720 different values per condition for *C. fluminea* and *S. plana*. This huge sample size induced a bias in statistical tests inducing too much power in test and showing statistical significant differences without any biological relevance. To avoid these difficulties, magnitude of size sample effect between two conditions was fixed to 1 allowing us to focus only on interpretable responses. To complete this approach, the statistical power was set to 0.8, largely admitted as good power, to determine a size sample allowing to evidence differences herein to ten values. Values were always normally distributed and homoscedasticity was respected. A random sampling of ten values within each exposure condition repeated 100 times was done to encompass the variability of IBR among permutations and to perform at each time a bilateral paired student t-test between the two samples. The *p*-value of each test was stored in a vector, which was then corrected for multiple comparisons following the procedure of Benjamini and Hochberg (1995). Finally, the *p*-value kept at the end of the statistical approach was the mean of the 100 corrected *p*-values to produce graphic representation.

3. Results

3.1 Physico-chemical behavior of Ag-based nanomaterial and nanoparticle as function of the salinity

3.1.1 NM-300K colloidal stability

During all the exposures tested on Ag ENMs (7d) (without any presence of bivalves into the water column), no significant difference of the size of NM-300K was observed by DLS between the different salinities [0 (ultrapure water), 15 and 30 psu] at the concentration of 5.5 mg Ag/L (Table 1).

Table 1: Size distribution of NM-300K by dynamic light scattering (DLS) at three different salinities (1.5, 15 and 30 psu).

Salinity	PDI	Z-average (nm)	Peak 1 (nm)	Peak 2 (nm)	Peak 3 (nm)
1.5 psu	0.188	75.4	51.8 ± 16.2 (79.9 %)	8395 ± 474.7 (11.2 %)	7.90 ± 1.9 (8.9 %)
15 psu	0.125	57.3	50.1 ± 19.3 (84.3 %)	8025 ± 750.6 (9.8 %)	6.9 ± 1.7 (5.9 %)
30 psu	0.391	47.74	65.91 ± 38.1 (87.2 %)	5221 ± 1750 (8.3 %)	8.1 ± 2.4 (4.4 %)

3.1.2 Acticoat™ chemical stability

The chemical stability of the Acticoat™ was assessed in term of release of silver ions during 9 days at 3 salinities (1, 15 and 30 psu) in abiotic conditions (Figure 2). After 2 h, 10 to 12 % of the silver is release into the water without statistical difference as a function of salinity. After 7 days, a salinity-dependent dissolution appeared. Until 15 % (at 15 psu) and 30 % (at 30 psu) of the initially introduced Ag is dissolved in the water column. The Ag speciation in the water column was geochemically modelled by considering the amount of cations and anions, the pH and Eh of the water column (at 1, 15, and 30 psu). Results show that 100 % of the dissolved silver released in the form of AgCl_x^{x-1} complexes without any AgCl precipitation.

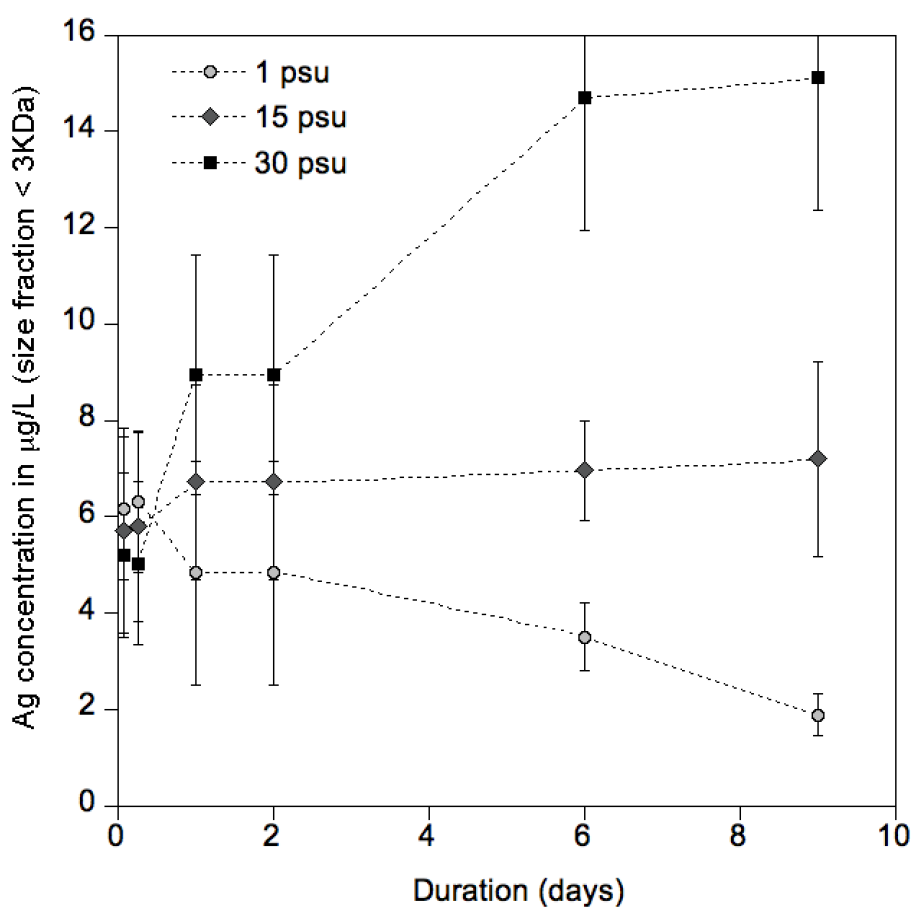


Figure 2: Silver (Ag) concentrations (< 3 kDa) released from the Acticoat™ in the water column at 3 salinities (1, 15, and 30 psu) during 9 days. Surface area of the wound dressing 0.16 cm² (153 µg/L of Ag) incubated in 3L. Data are the average of three replicates $\pm$ standard deviation and are corrected from background concentrations determined in control beakers.

3.2 Physico-chemical parameters of the medium

During the experiment with *C. fluminea*, physico-chemical parameters were at 1.5 psu: pH: 7.57 ± 0.09 ; salinity: 1.65 ± 0.01 psu; redox potential: 161.72 ± 5.67 mV, temperature: 13.63 ± 0.18 °C, oxygen saturation: 9.43 ± 0.15 mg O₂ / L and at 15 psu: pH: 7.21 ± 0.05 ; salinity: 16.39 ± 0.29 psu; redox potential: 167.92 ± 8.35 mV, temperature: 13.40 ± 0.20 °C, oxygen saturation: 9.60 ± 0.11 mg O₂ / L.

For *S. plana*, physico-chemical parameters were at 15 psu: pH: 7.63 ± 0.03 ; salinity: 31.10 ± 0.08 psu; redox potential: 106.78 ± 0.42 mV, temperature: 13.43 ± 0.06 °C, oxygen saturation: 10.04 ± 0.04 mg O₂ / L and at 30 psu: pH: 7.65 ± 0.01 ; salinity: 15.26 ± 0.08 psu; redox potential: 99.00 ± 1.64 mV, temperature: 13.21 ± 0.12 °C, oxygen saturation: 10.07 ± 0.07 mg O₂ / L.

3.3 Ag removal from the water column

Total silver concentrations were measured in the water column after 7 days of exposure. The concentrations of silver into the water column for *C. fluminea* at 1.5 and 15 psu are illustrated in Figure 3.

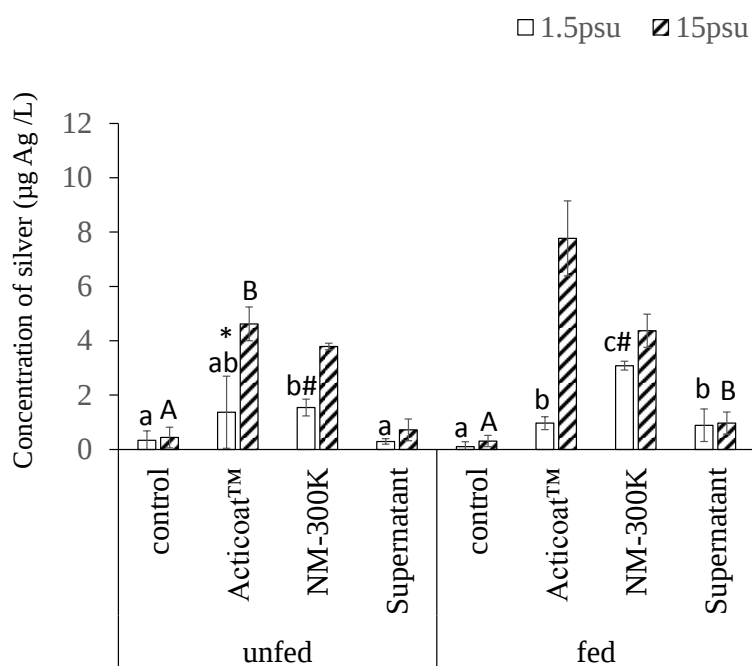


Figure 3: Total silver concentration in water column after 7 days of exposure of *C. fluminea* to 4 conditions (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) under two dietary conditions (unfed and fed) at 1.5 and 15 psu. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The differences between the exposure conditions are expressed with common letter at 1.5 psu and with capital letter at 15 psu. For each exposure condition, the difference between the salinity conditions is indicated by an asterisk (*) and the difference between dietary conditions is indicated by a sharp (#).

Under unfed condition at 1.5 psu, a significant greater silver concentration has been measured after exposure to NM-300K compared to the Control. At 15 psu, a significant greater silver concentration was measured in the Acticoat™ medium compared to the Control. Significant greater silver concentrations have been measured in media exposed to Acticoat™ and NM-300K at 15 psu compared to 1.5 psu.

Under fed condition at 1.5 psu, significant greater silver concentrations have been measured after exposure to Acticoat™ and NM-300K compared to the Control. At 15 psu, the same trends have been observed than those highlighted under unfed condition. At 1.5 psu, a significant greater concentration of silver has been measured in NM-300K media under fed condition compared to unfed condition.

The silver concentrations in the water column of tanks containing *S. plana* exposed to the different experimental conditions at 15 and 30 psu are illustrated in Figure 4.

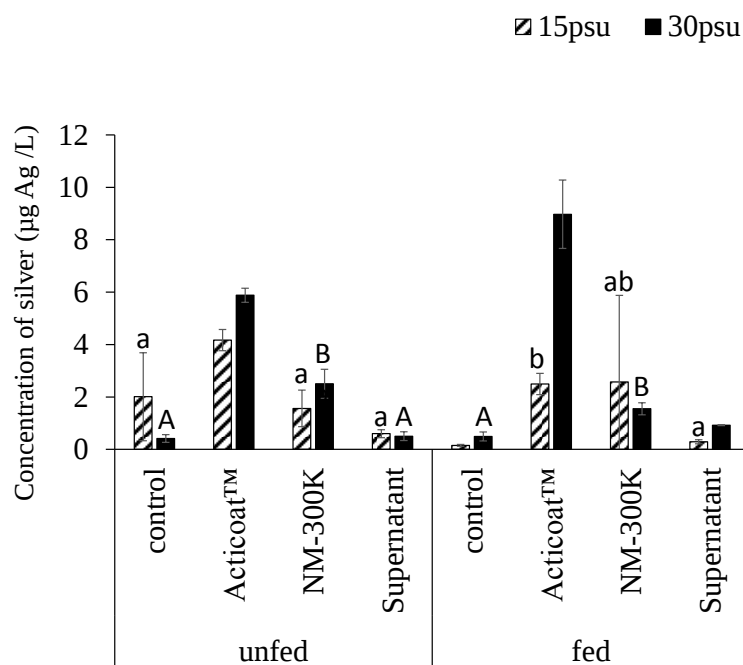


Figure 4: Total silver concentrations in water column after 7 days of exposure of *S. plana* to 4 conditions (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) under two dietary conditions (unfed and fed) at 1.5 and 15 psu. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, the differences between the exposure conditions are expressed with common letter at 1.5 psu and with capital letter at 15 psu. For each exposure condition, the difference between salinity conditions is indicated by an asterisk (*) and the difference between dietary conditions is indicated by a sharp (#).

At 15 psu, the same trend has been observed under both feeding conditions with greater concentrations in Acticoat™ medium compared to the other treatments. At 30 psu and under unfed condition, significant greater silver concentrations have been observed in Acticoat™ and NM-300K treatments compared to the others.

The significant highest silver concentration has been observed into the water column after exposure to Acticoat™. The same trend has been observed for the fed condition. Moreover, significant greater concentration of silver have been measured into the water column after exposure to Acticoat™ and NM-300K under unfed conditions compared to fed condition.

3.4 Mortality

No mortality was observed for both species during the whole duration of the acclimatization period for the different salinities and after 7-day of exposure period for all the tested conditions.

3.5 Ag uptake by bivalves

Uptake of silver by C. fluminea

Total silver concentrations in the digestive gland of *C. fluminea* exposed to both dietary regimes (fed and unfed conditions) under the different treatments (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) at both tested salinities are illustrated in Figure 5.

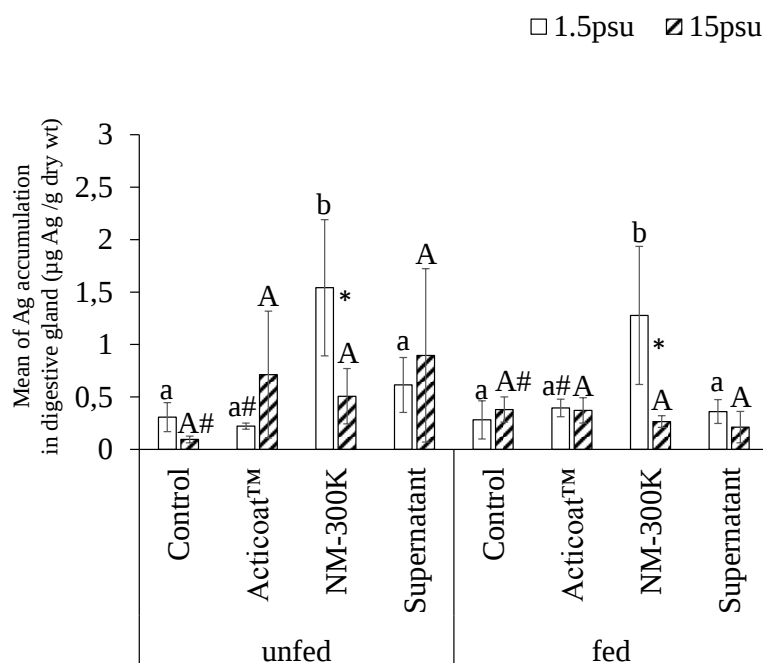


Figure 5: Concentrations of silver in the digestive gland of *C. fluminea* under two dietary regimes (unfed and fed) exposed to 4 conditions (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) after 7 days of exposure at 1.5 and 15 psu. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, the differences between the exposure conditions were expressed with common letter at 1.5 psu and with capital letter at 15 psu. For each exposure condition, the difference between salinity conditions was indicated by an asterisk (*) and the difference between dietary conditions was indicated by a sharp (#).

Total silver concentrations were significantly greater in the digestive gland of unfed clams exposed to NM-300K at 1.5 psu compared to Control ones. No significant difference has been observed at 15 psu. The same trend has been observed under fed condition. A significant greater bioaccumulation has been measured after exposure to NM-300K at 1.5 psu compared to 15 psu under unfed and fed conditions. At 1.5 psu, ActicoatTM led to a significant greater bioaccumulation under fed condition compared to unfed condition.

Uptake of silver by *S. plana*

Total silver concentrations in the digestive gland of *S. plana* exposed to both dietary regimes (fed and unfed conditions) under the different treatments (Control, ActicoatTM, NM-300K and Supernatant) at both tested salinities are illustrated in Figure 6.

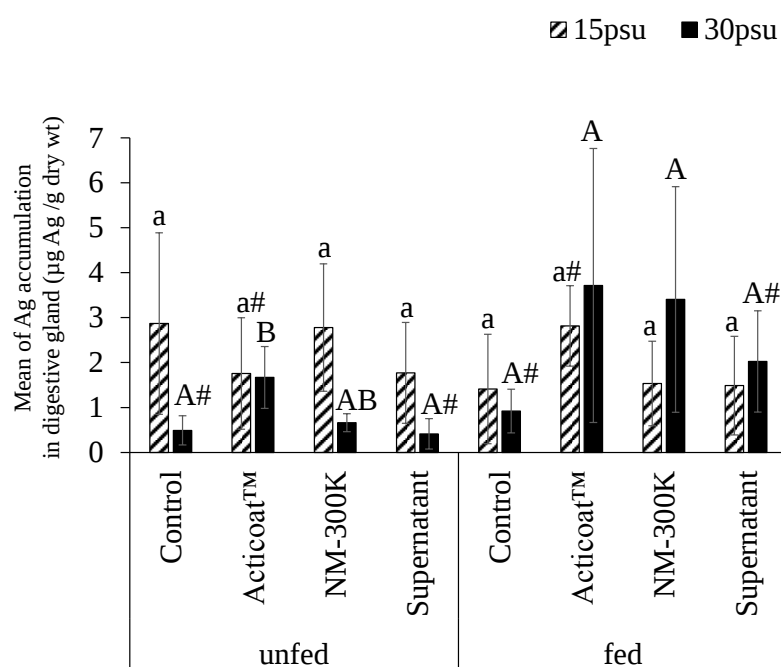


Figure 6: Concentrations of silver in digestive gland of *S. plana* under both dietary regimes (unfed and fed) exposed to 4 conditions (Control, ActicoatTM, NM-300K and Supernatant) after 7 days of exposure at 15 and 30 psu. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, the differences between the exposure conditions were expressed with common letter at 15 psu and with capital letter at 30 psu. For each exposure condition, the difference between salinity conditions was indicated by an asterisk (*) and the difference between dietary conditions was indicated by a sharp (#).

Under unfed condition and at 15 psu, no significant difference between the four treatments (Control, ActicoatTM, NM-300K and Supernatant) has been observed. At 30 psu, total silver concentrations were significantly greater in the digestive gland of clams exposed to ActicoatTM compared to control.

Under fed condition, no significant difference has been measured after exposure to the four treatments (control, ActicoatTM, NM-300K and Supernatant) whatever the salinity conditions. The presence of algae in the exposure media induced greater silver concentrations in digestive glands of *S. plana* for ActicoatTM and Supernatant conditions respectively at 15 psu and at 30 psu.

3.6 Burrowing behavior

Illustration of burrowing kinetics of both species after 7 d of exposure to the different treatments are reported in Figures 7.

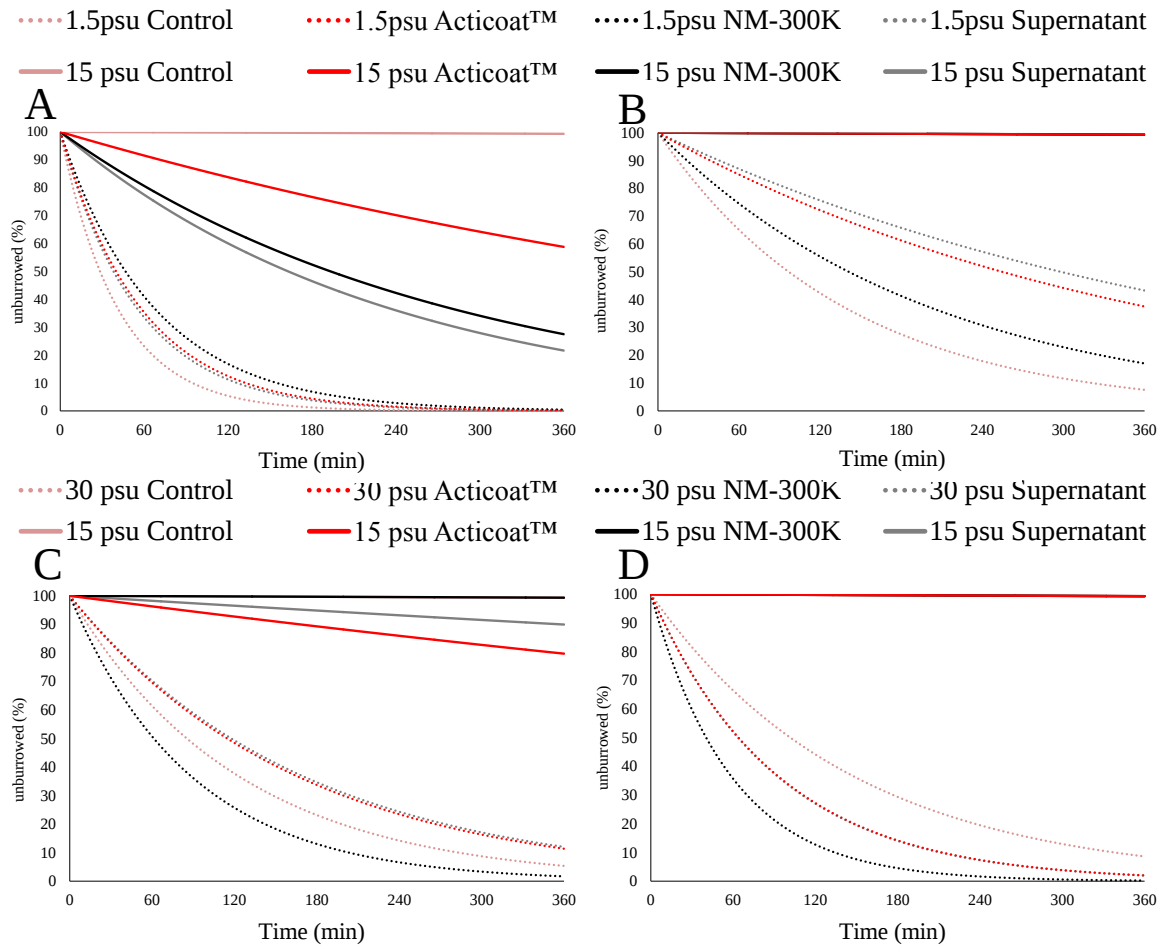


Figure 7: Burrowing kinetics (unburrowed individuals over the time) after 7 days; in (A) *C. fluminea* under unfed condition, (B) *C. fluminea* under fed condition, (C) *S. plana* under unfed condition and (D) *S. plana* under fed condition, at two salinities (1.5/ 15 psu and 15/ 30 psu respectively for *C. fluminea* and *S. plana*).

At 1.5 psu, unfed *C. fluminea* (Figure 7A) showed a rapid burrowing kinetic for the whole exposure conditions. At 15 psu, significant slowdown of burrowing kinetics of Control and ActicoatTM groups was observed compared to Supernatant and NM-300K ones.

At 1.5 psu, for fed *C. fluminea* (Figure 7B), results showed significant slowdown of the burrowing kinetics for Supernatant and Acticoat™ conditions compared to Control and NM-300K. At 15 psu, none of fed *C. fluminea* was burrowed at the end of the burrowing experiment (360 min) for the whole exposure conditions. Comparing feeding regimes of *C. fluminea*, a significant slowdown of the burrowing kinetics has been observed for the fed organisms under both salinities (1.5 and 15 psu).

Concerning *S. plana*, at 30 psu (Figure 7C) only a significant slowdown of burrowing activity has been observed for unfed organisms exposed to Supernatant and Acticoat™ compared to those exposed to NM-300K. At 15 psu, clams showed a rapid burrowing kinetic without significant effect between all exposure conditions. For fed *S. plana* (Figure 7D) at 30 psu, the results showed significant greater burrowing kinetics after exposure to NM-300K compared to the Control. At 15 psu, no fed organism was burrowed after the whole duration (360 min) of the burrowing experiment. Similar trends of burrowing kinetics have been observed for both feeding regimes of *S. plana*.

3.7 Biomarker responses

Detailed biomarker responses of *C. fluminea* and *S. plana* have been respectively described in Tables S1 and S2 in Supplementary Data section. Manova analysis conducted on the whole data set for each organism is described in Table 2.

Table 2: Results of Manova analysis performed with the battery of biomarkers of *C. fluminea* and *S. plana* as independent variables on each condition including treatments (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant), dietary regimes (fed and unfed) and salinities (1.5 and 15 psu or 15 and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively), with ns = not significant.

	<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>
Treatments	ns	0.046
Dietary regimes	6.12×10^{-6}	0.0034
Salinities	4.07×10^{-12}	0.010
Treatments* Dietary regimes	ns	ns
Treatments*Salinities	ns	ns
Dietary regimes*Salinities	0.003	0.010
Treatments*Dietary regimes*Salinities	ns	ns

Manova analysis on *C. fluminea* dataset showed significant modifications of the biomarker responses according to the diet regime (fed and unfed) and the salinity (1.5 and 15 psu) separately and for combined conditions (diet regime and salinity). Manova analysis on *S. plana* dataset showed significant variations of the biomarker responses according to the treatment (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant), the diet regime (fed and unfed) and the salinity (15 and 30 psu) separately and for combined diet regime and salinity conditions. Statistical results of PLS-DA allowed selecting the most important biomarkers involved in the result variations between the treatments. For both bivalve species, this battery of biomarkers including defence (ACP, GST, LDH, MT, CAT) and damage (LOOH, CSP-3) responses was used to calculate IBR values (mean and SD) and was considered “activated” according to the treatments. Figures 8 show the IBR results for both species (*C. fluminea* and *S. plana*) exposed to the four treatments (Control, Acticoat™, NM-300K, Supernatant), at each tested salinity (1.5, 15 or 30 psu) and in presence or absence of algae.

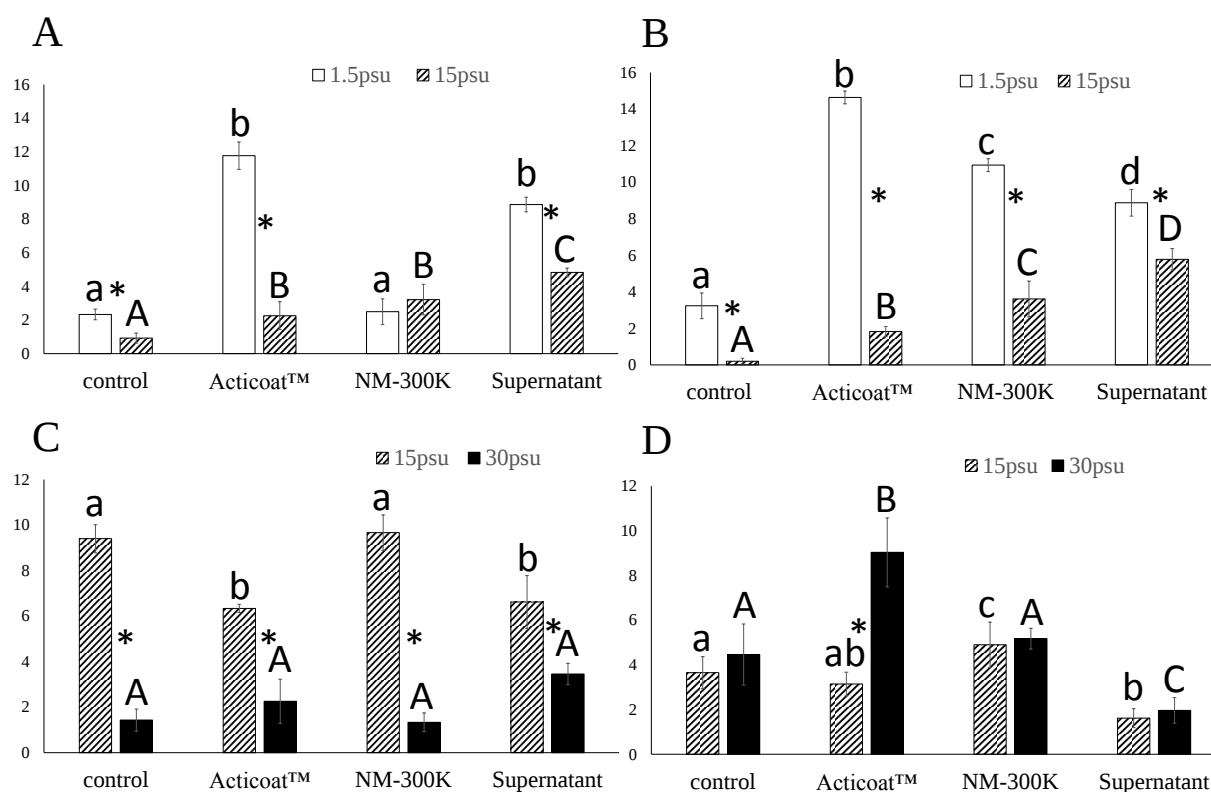


Figure 8 : Means and standard deviations of the set of Integrative Biomarker Responses (IBR) values obtained through permutation after 7 days of exposure of *C. fluminea* and *S. plana* to four conditions (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) at each tested salinity (1.5/ 15 psu and 15/ 30 psu respectively for *C. fluminea* and *S. plana*); in (A) unfed *C. fluminea*, (B) fed *C. fluminea*, (C) unfed *S. plana* and (D) fed *S. plana*. Significant differences were expressed with common letter for *C. fluminea* and *S. plana* exposed to 1.5 and 30 psu respectively and with capital letter for *C. fluminea* and *S. plana* exposed to 15 psu. For each exposure condition, the significant differences observed between salinity conditions were indicated by an asterisk (*).

For each tested condition, standardized values of used biomarkers (ACP, GST, LDH, CSP-3, MT, LOOH and CAT) are listed in Table S3. IBR values of unfed *C. fluminea* (Figure 7A), at 1.5 psu, were significantly greater for Acticoat™ and Supernatant conditions than Control and NM-300K ones. At 15 psu, all the exposed organisms showed IBR values significantly greater than Control with the highest one observed in clams exposed to Supernatant. At 1.5 and 15 psu, fed *C. fluminea* (Figure 7B) exposed to Acticoat™, NM-300K and Supernatant showed IBR values significantly greater than those obtained for Control. Furthermore, at 1.5 psu under both dietary regimes, the highest standard values of GST and CSP-3 activities have been observed for Acticoat™ condition compared to the other ones. Under Supernatant condition, the highest standard value of CAT activity has been obtained at 1.5 psu while the highest standardized value of LDH activity has been measured at 1.5 psu.

IBR values were significantly greater whatever the dietary conditions (Figures 8A & B) for *C. fluminea* at 1.5 psu compared to 15 psu for all conditions of exposure, except for NM-300K under unfed condition. This trend was explained by a higher LDH activity at 15 psu and a higher CAT activity at 1.5 psu.

IBR values of unfed *S. plana* (Figure 8C) at 15 psu were significantly greater for Control and NM-300K conditions than Acticoat™ and Supernatant ones. At 30 psu, no significant difference of IBR values has been observed regardless of exposure treatments. IBR values were always higher at 15 psu compared to 30 psu. General trends in standardized biomarker values were difficult to depict. However, at 15 psu, standardized values of ACP activities were always greater after exposure to NM-300K compared to other conditions. Furthermore, standardized values of LDH activities at 30 psu were always greater after exposure to Acticoat™ compared to other conditions. For fed *S. plana* at 15 and 30 psu (Figure 8D), IBR values were significantly lower for the Supernatant condition compared to the Control one. At 15 psu, significantly greater IBR values have been measured only after exposure to NM-300K compared to Control condition, while at 30 psu, greater IBR values were observed only for Acticoat™ compared with the other exposure conditions. Greater IBR values in *S. plana* exposed to Acticoat™ were also observed at the field salinity (30 psu) compared to the hypo-saline one (15 psu).

4. Discussion

Among the large body of literature published on nano(eco)toxicology, this study brings original data on Ag NAPs as well as on standardized ENMs. Both of them are still poorly studied; particularly concerning their ageing in aquatic systems and their biological effects on two estuarine and freshwater endobenthic species. According to Reidy et al (2013), a greater interest on silver stability from consumer products should be studied to determine their possible associated mechanisms of toxic action on cells and organs. The first objective of this present study was to determine the fate and behavior of Ag ENMs contained in NAPs, the band-aid Acticoat™ and a standardized ENMs (NM-300K) in aquatic environments characterized by a salinity gradient (1.5, 15 and 30 psu). Moreover, the ecotoxicological effects of these NAPs were assessed on two endobenthic freshwater and estuarine bivalve species, *C. fluminea* and *S. plana* after studying uptake of silver in order to link the exposure and bioaccumulation of both nanoproducts to their possible biological effects.

4.1 Ag ENM fate and Ag uptake by bivalves

The ageing of NAPs Acticoat™ across the salinity gradient (from 1.5, 15 to 30 psu) induced only silver ion release and the dissolution rate is salinity-dependent. Indeed, more the salinity is high, more the release of Ag ions from Acticoat™ is important. Previous study on standardized ENMs (NM-300K) showed that the dissolution rate of Ag was not significantly influenced by the salinity tested (15 and 30 psu) (Bertrand et al., 2016).

However, the possible impact of Ag ENMs observed on bivalves could be linked either from the nanoparticulate form, from the release of Ag ions or from both of them. The possible bioavailability of the silver (Acticoat™ and NM-300K) in presence or absence of diet and at different salinities have been determined by measuring the silver uptake into the digestive gland of both species. After exposure to Acticoat™, significant uptake of silver has been measured only in digestive gland of *S. plana* at 30 psu under unfed condition. This result could be a consequence of the faster kinetics of release of silver ions from Acticoat™ at the higher salinity tested (30 psu). Significant uptake of silver after NM-300K exposure has been observed only for *C. fluminea* at 1.5 psu under both dietary regimes. According to the diagram of silver predominance, modifications of the Ag speciation should occur at 1.5 psu compared to the other salinities, showing that Ag is more bioavailable at lower salinities than at higher ones (Bury and Hogstrand, 2002). The uptakes of silver into the digestive gland of bivalves were significantly greater in presence of algae. This result could indicate that the incorporation of Ag released from Acticoat™ and NM-300K into algal cells lead to an increase of silver accumulation and distribution in the digestive gland on both species as previously observed by Ng et al. (2005) on *Perna viridis*, *Ruditapes* and *Philippinarum*, *Balanus amphitrite*.

4.2 Burrowing behavior

One part of the second objective of this study was to assess the impact of Acticoat™ and NM-300K across a salinity gradient exploring burrowing activity of *C. fluminea* and *S. plana*. At both field salinities (1.5 and 30 psu), *C. fluminea* and *S. plana* respectively were able to burrow into the sediment. Few impairments of burrowing kinetics have been observed related to the different treatments (Control, Acticoat™, NM-300K and Dispersant). In the literature, at 30 psu some significant differences of burrowing kinetic have been observed for *S. plana* after exposure to soluble Ag and Ag nanoparticles compared to controls after 7 days of exposure, whatever the dietary conditions (fed or not) (Buffet et al., 2013a). Nevertheless, under hyper or hyposaline condition for *C. fluminea* and *S. plana* respectively (15 psu), the absence of burrowing activity has been observed for all whatever the treatments, including Control one. These results may highlight the possible sub-lethal induced-impact of salinity changes on populations and communities (Bonnard et al., 2009).

4.3 Biomarker responses

In order to complete the results obtained at the individual level (behavior), an IBR approach has been conducted on each species under both dietary regimes in order to evaluate the impact of the contamination at sub-cellular levels. The exposure to Acticoat™ of both species whatever the salinity and the dietary conditions highlighted biomarker responses including an increase of GST and CSP-3 activities, allowing the separation of Acticoat™ exposure groups from the Control one. The increase of GST activity after exposure to Acticoat™ showed the involvement of physiological mechanisms in the detoxification processes.

CSP-3 activation could result from a large variety of physiological and chemical exposures (Risso-de-Faverney et al., 2001). The increase of this intermediate element of apoptosis showed the involvement of damage biomarkers translating the cellular irreversible impact of Acticoat™. LDH activity presents in cell cytoplasm highlighted the activation of anaerobic glycolysis resulting from the reversible oxidation of lactate to pyruvate. The greater activation of LDH in *C. fluminea* at 15 psu compared to individuals exposed at the field salinity (1.5 psu) for *C. fluminea* notified the request of anaerobic energetic resources. This result could be explained by the isolation of the organisms from the exposure media as observed by burrowing kinetic. Isolation of organisms from hypo or hyper saline conditions involved anaerobic glycolysis metabolism to offset oxygen stress effect (Diamantino et al., 2001). Significant separations of experimental groups exposed to Acticoat™ compared to Control with the two main biomarkers (GST and CSP-3) were more important for *C. fluminea* compared to *S. plana*, reflecting a possible greater effect of Acticoat™ on *C. fluminea*. An increase of ACP activities, defined as marker of lysosomal activity (Suresh and Mohandas, 1990) coupled with GST and CAT activities for both species have allowed to separate the experimental groups after exposure to NM-300K compared to Control. CAT and GST activations inform on mechanisms involved in antioxidant and antitoxic responses after reactive oxygen species (ROS) production (Jourmi et al., 2015). The trend observed for Acticoat™, showing a possible greater effect on *C. fluminea* than *S. plana*, has been detected also after exposure to NM-300K. At both salinities (1.5 and 15 psu), *C. fluminea* exposed to Supernatant condition compared to the Control showed an activation of CAT and LDH activities. CAT activation informs on the management of ROS by cells. As a consequence of behavioral impairments after exposure to Supernatant condition, modification of energetic metabolism by increased LDH activity has been measured. For *S. plana*, at both tested salinities (30 and 15 psu) under both dietary regimes, an increase of GST, CSP-3 and LOOH activities has been measured, allowing separating the experimental group exposed to Supernatant compared to Control. The activation of antitoxic and cellular damage biomarkers are the same than those activated after exposure to NM-300K. The disruption of cell membrane measured by LOOH activity and CSP-3 activation as an apoptosis marker highlighted the risk for *S. plana* after exposure to Supernatant under multi-stress conditions (dietary and salinity conditions). Supernatant condition composed with stabilizing products (Tween 20, PGT) was obtained in the present study after ultracentrifugation of NM-300K. This result may be correlated with the study of Eskandani et al. (2013) on cyto/genotoxic effects of Tween 20. This study highlighted the ability of Tween 20 to interact with DNA and to induce DNA damages and fragmentation of chromatin as a consequence of cell apoptosis. Even though non-ionic surfactant, such as Tween 20, has been considered as a low toxic material and is largely included in industrial products (pharmaceutical, cosmetic products) (Strickley, 2004), negative effects could be measured on aquatic organisms.

In spite of low silver bioaccumulation into bivalve tissues across the salinity gradient and under both dietary conditions, activation of antioxidant defenses of both organisms have been probably linked due to ROS production following Acticoat™, NM-300K and Supernatant exposures (Liu and Jiang, 2015). These combined cell damage results (CSP-3 and LOOH activities) highlighted irreversible adverse effects caused by ageing of NAPs or ENMs. Separation of experimental groups after exposure to Acticoat™ and NM-300K were greater for *C. fluminea* than for *S. plana*. Estuaries are often defined as an ultimate sink for metal pollution due to the deposit of contaminated river sediment (Delorenzo, 2015). Consequently, this trend could be the result of a greater tolerance to multi-stress conditions of estuarine species (*S. plana*) regularly exposed both to contaminated media and natural changing environments including salinity, temperature, oxygen and pH variations.

5. Conclusion

Both tested materials released silver ions after ageing into the media. However, the release of Ag ions from Acticoat™ was salinity-dependent (30 psu > 15 psu > 1.5 psu). Greater bioaccumulation of silver has been measured under feeding condition indicating that algae presence into the water column could be a vector increasing the potential bioaccumulation of metal in the tissues of aquatic organisms. The second objective was to assess the ecotoxicological impact of Ag ENMs in presence or absence of dietary source, after 7 days of exposure, on two euryhaline species (*C. fluminea* and *S. plana*) across a salinity gradient, using a multi-biomarker approach at different biological levels. Behavioral tests on both species showed impacts of the treatments (Control, Acticoat™, NM-300K and Supernatant) at the field salinity only (1.5 or 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively). In order to determine the link between the several multi-stress conditions (contamination treatments, food regime and salinity conditions), statistical approaches (associated PLS/DA and IBR) have been employed. For both species, significant activation of antioxidant defenses combined with cell damages (ACP, GST, LDH, CAT, MT, LOOH and CSP-3), for all tested conditions (Acticoat™, NM-300K and Supernatant) have been highlighted through the use of the IBR tool whatever the dietary and the salinity conditions. Acticoat™ ageing showed a higher negative impact on the freshwater species (*C. fluminea*) than on the estuarine one (*S. plana*). Same biomarker responses have been observed for NM-300K as a cause of irreversible adverse effects on both species. Nevertheless, unexpected impact of Supernatant contained in the stabilizing agent (Tween 20, PGT) has been measured as an inductor of DNA damage. Since Ag speciation is highly dependent of the salinity gradient, all these presented impacts have consequences at individual level and may be transferred at higher ecosystem scale across a continental-marine continuum. Moreover, the importance of multi-stress approach presented in this study and underlined in the literature highlighted the limit to analyze and interpret combined abiotic and contaminant effects (Nôges et al., 2016).

Nevertheless, focusing on ageing of silver NAPs and standardized ENMs under more realistic exposure conditions (salinity range and dietary distribution) could contribute to a better understanding of their fate and their behavior into aquatic ecosystems and their real environmental impacts in order to bring information for a better environmental risk assessment.

Acknowledgments.

Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) for C. Bertrand PhD salary and running costs, CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR-10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century) and the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology.

Supplementary data

Table S1 : Biochemical biomarker data (mean and standard deviation) including CAT (catalase), TAC (total antioxidant capacity), GST (glutathione-S-transferase), ACP (acid phosphatase), MT (metallothionein), LOOH (lipid peroxidation), CSP-3 (caspase-3), Trigly (triglyceride), ETS (electron transport system), LDH (lactate deshydrogenase) in the digestive glands (n=6) of *C. fluminea* exposed to the four experimental conditions (Control, Supernatant, NM-300K and Acticoat™) under the two dietary regimes (UF: unfed condition, F: fed condition) and at 1.5 and 15 psu.

Biomarkers			1.5 psu					15 psu				
			Food	Control	Acticoat™	NM-300K	Supernatant	Control	Acticoat™	NM-300K	Supernatant	
Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot / min	UF	64 ± 20	74 ± 19	61 ± 8	80.6 ± 8	62 ± 10	63 ± 6	70 ± 15	67 ± 9	
			F	77 ± 5	82 ± 8	82 ± 12	84 ± 29	53 ± 22	68 ± 18	75 ± 18	64 ± 6	
	TAC	µmol Teq / g prot / min	UF	14 ± 3	16 ± 4	13 ± 5	16 ± 2	18 ± 4	18 ± 4	18 ± 3	20 ± 7	
			F	16 ± 5	21 ± 5	21 ± 6	21 ± 6	18 ± 5	22 ± 6	23 ± 7	21 ± 4	
	GST	µmol CDNB / g prot / min	UF	336 ± 121	395 ± 126	302 ± 67	350 ± 99	274 ± 47	295 ± 29	323 ± 103	338 ± 46	
			F	361 ± 72	410 ± 104	393 ± 44	405 ± 130	346 ± 78	343 ± 57	300 ± 107	354 ± 114	
	ACP	µmol p-nit. / g prot / h	UF	54 ± 12	64 ± 14	58 ± 5	57 ± 9	49 ± 5	45 ± 5	48 ± 6	52 ± 11	
			F	54 ± 10	58 ± 6	66 ± 9	64 ± 9	53 ± 14	54 ± 14	55 ± 9	63 ± 2	
	MT	µg / g DW	UF	0.3 ± 0.14	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.22 ± 0.05	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.1	
			F	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3	2.1 ± 0.5	0.61 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.4	
Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	µmol TBH / g prot	UF	23 ± 6	23 ± 5	24 ± 4	23 ± 7	21 ± 4	23 ± 4	21 ± 5	22 ± 5	
			F	22 ± 5	23 ± 6	20 ± 3	22 ± 4	17 ± 1	18 ± 4	20 ± 5	21 ± 4	
	CSP3	µmol pNA / g prot / h	UF	6 ± 3	10 ± 2	6 ± 1	9 ± 3	6 ± 3	9 ± 3	5 ± 4	7 ± 3	
			F	5 ± 4	8 ± 6	8 ± 2	6 ± 2	5 ± 2	6 ± 4	7 ± 3	7 ± 3	
Structural and energetic parameters	Trigly	mg / g DW	UF	14 ± 3	14 ± 2	15 ± 2	14 ± 1	13 ± 2	13 ± 2	16 ± 5	10 ± 1	
			F	14 ± 1	13 ± 3	14 ± 2	10 ± 4	11 ± 2	10 ± 2	11 ± 2	12 ± 2	
	ETS	µmol O ₂ / g / h	UF	54 ± 20	52 ± 18	55 ± 17	54 ± 16	43 ± 14	50 ± 17	50 ± 17	47 ± 17	
			F	48 ± 12	44 ± 15	47 ± 21	46 ± 20	51 ± 20	52 ± 22	51 ± 21	56 ± 18	
	LDH	µmol NADH / g prot / h	UF	60 ± 25	69 ± 12	65 ± 17	63 ± 18	104 ± 19	109 ± 23	100 ± 22	120 ± 25	
			F	86 ± 23	105 ± 46	80 ± 8	88 ± 25	89 ± 8	104 ± 31	112 ± 47	119 ± 30	

Table S2: Biochemical biomarker data (mean and standard deviation) in the digestive glands (n=6) of *S. plana* exposed to the four experimental conditions (Control, Supernatant, NM-300K and Acticoat™) under the two dietary regimes (UF: unfed condition, F: fed condition) and at 30 and 15 psu.

Biomarkers			30 psu					15 psu			
			Food	Control	Acticoat™	NM-300K	Supernatant	Control	Acticoat™	NM-300K	Supernatant
Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot/ min	UF	109 ± 29	90 ± 61	73 ± 25	132 ± 41	155 ± 20	71 ± 84	89 ± 43	114 ± 34
			F	100 ± 59	46 ± 20	110 ± 37	73 ± 34	77 ± 36	90 ± 38	107 ± 40	49 ± 58
	TAC	μmol Teq / g prot / min	UF	24 ± 4	34 ± 3	29 ± 6	31 ± 7	27 ± 4	27 ± 7	29 ± 12	25 ± 12
			F	28 ± 6	29 ± 7	24 ± 9	22 ± 7	27 ± 3	28 ± 4	23 ± 8	25 ± 11
	GST	μmol CDNB/ g prot/ min	UF	70 ± 36	77 ± 51	92 ± 49	116 ± 86	162 ± 206	145 ± 152	195 ± 233	139 ± 108
			F	93 ± 47	137 ± 82	98 ± 43	122 ± 20	44 ± 44	71 ± 48	116 ± 93	54 ± 41
	ACP	μmol p-nit. / g prot / h	UF	15 ± 5	17 ± 8	14 ± 3	19 ± 6	21 ± 6	17 ± 9	23 ± 9	15 ± 2
			F	21 ± 6	15 ± 5	20 ± 6	17 ± 1	22 ± 10	19 ± 7	23 ± 4	22 ± 4
	MT	μg/ g DW	UF	4 ± 1	7 ± 3	4 ± 1	5 ± 3	6 ± 1	6 ± 4	6 ± 3	4 ± 2
			F	6 ± 3	5 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	6 ± 3	4 ± 2	4 ± 2	5 ± 2
Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	UF	577 ± 220	300 ± 304	662 ± 166	246 ± 520	613 ± 161	630 ± 199	744 ± 160	864 ± 205
			F	523 ± 141	518 ± 767	777 ± 170	759 ± 160	623 ± 184	578 ± 121	648 ± 204	618 ± 204
	CSP3	μmol pNA/ g prot/ h	UF	6 ± 3	5 ± 2	7 ± 1	7 ± 3	5 ± 2	7 ± 4	8 ± 1	8 ± 3
			F	7 ± 6	18 ± 6	9 ± 3	9 ± 2	7 ± 3	8 ± 3	7 ± 5	6 ± 3
Structural and energetic parameters	Trigly	mg/g DW	UF	14 ± 6	13 ± 3	11 ± 1	12 ± 5	12 ± 2	9 ± 2	11 ± 4	9 ± 1
			F	10 ± 4	9 ± 3	6 ± 5	11 ± 2	16 ± 6	8 ± 2	9 ± 4	12 ± 3
	ETS	μmolO ₂ /g / h	UF	31 ± 8	27 ± 5	30 ± 6	28 ± 10	21 ± 11	26 ± 7	26 ± 4	30 ± 5
			F	33 ± 3	45 ± 16	43 ± 16	46 ± 14	26 ± 7	32 ± 4	35 ± 5	33 ± 4
	LDH	μmol NADH/ g prot/ h	UF	302 ± 49	337 ± 77	264 ± 94	191 ± 54	328 ± 75	271 ± 79	218 ± 100	319 ± 106
			F	255 ± 95	441 ± 135	345 ± 124	257 ± 57	358 ± 109	376 ± 226	259 ± 154	270 ± 100

Table S3 : Standardized values of each biomarker [ACP (acid phosphatase), GST (glutathione-S-transferase), LDH (lactate deshydrogenase), CAT (catalase), MT (metallothionein), LOOH (lipid peroxidation), CSP-3 (caspase-3) after exposure to four conditions (Control, Supernatant, NM-300K, Acticoat™) at different salinities (1.5 and 15 psu for *C. fluminea* and 30 and 15 psu for *S. plana*), within each experiment including each species (*C. fluminea* and *S. plana*) and dietary regime (fed and unfed). The highest values of biomarkers represented the highest induction/inhibition level obtained in an experiment.

		ACP	GST	LDH	CAT	MT	LOOH	CSP-3
<i>C. fluminea</i> unfed condition	Control-1,5psu	1.39	1.65	0.00	0.38	0.86	1.62	0.77
	Control-15psu	0.62	0.00	1.79	0.18	0.84	0.00	0.98
	Acticoat™-1,5psu	3.10	3.22	0.35	1.86	1.38	1.98	2.89
	Acticoat™-15psu	0.00	0.55	1.99	0.29	0.00	1.74	2.30
	NM-300K-1,5psu	2.05	0.75	0.18	0.00	0.80	2.82	0.61
	NM-300K-15psu	0.47	1.30	1.64	1.35	3.39	0.05	0.00
	Supernatant-1,5psu	1.88	2.04	0.10	2.89	1.47	2.14	2.30
	Supernatant-15psu	1.13	1.72	2.45	0.90	0.68	1.00	1.55
<i>C. fluminea</i> fed condition	Control-1,5psu	0.24	1.66	0.48	2.02	0.61	2.60	0.39
	Control-15psu	0.00	1.23	0.71	0.00	0.35	0.00	0.00
	Acticoat™-1,5psu	1.04	2.97	1.81	2.57	2.21	3.03	2.66
	Acticoat™-15psu	0.11	1.16	1.72	1.09	0.03	0.78	1.04
	NM-300K-1,5psu	2.46	2.51	0.00	2.49	2.52	1.73	2.50
	NM-300K-15psu	0.31	0.00	2.34	1.81	0.00	1.75	2.33
	Supernatant-1,5psu	2.05	2.83	0.60	2.75	1.07	2.55	0.99
	Supernatant-15psu	1.96	1.46	2.81	0.64	0.07	1.83	1.67
<i>S. plana</i> unfed condition	Control-15psu	2.02	2.12	2.57	3.13	2.03	1.36	0.00
	Control-30psu	0.18	0.00	2.10	1.38	0.00	1.10	0.72
	Acticoat™-15psu	0.82	1.71	1.50	1.03	2.18	1.48	1.99
	Acticoat™-30psu	0.78	0.16	2.75	0.67	2.41	0.00	0.24
	NM-300K-15psu	2.72	2.85	0.49	0.61	1.83	2.30	2.61
	NM-300K-30psu	0.00	0.50	1.37	0.00	0.35	1.71	1.31
	Supernatant-15psu	0.04	1.58	2.40	1.58	0.05	3.15	2.54
	Supernatant-30psu	1.57	1.06	0.00	2.27	1.08	0.41	1.76
<i>S. plana</i> fed condition	Control-15psu	1.73	0.00	2.09	1.06	2.52	0.80	0.26
	Control-30psu	2.13	1.57	0.00	3.00	2.60	0.00	0.26
	Acticoat™-15psu	2.37	1.29	0.56	2.03	0.71	0.09	0.78
	Acticoat™-30psu	0.00	2.91	2.52	0.00	1.64	3.03	3.15
	NM-300K-15psu	2.98	2.25	0.05	2.29	1.09	0.86	0.29
	NM-300K-30psu	1.96	1.72	1.22	2.41	0.02	1.75	0.79
	Supernatant-15psu	2.36	0.38	0.20	0.85	1.34	0.65	0.00
	Supernatant-30psu	0.54	2.45	0.02	1.04	0.00	1.63	0.71

Bibliography

- Amiard-Triquet, C., Amiard, C., Mouneyrac, C., 2015. Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks. Elsevier, Boston, MA, pp 153-171.
- Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. doi:10.1002/etc.3428
- Bonnard, M., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J. 15, 11–26. doi:10.1080/10807030802614934
- Buffet, P.-E., Amiard-Triquet, C., Dybowska, A., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 84, 191–198. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.07.010
- Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Faverney, C.R., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89, 117–124. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.019
- Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Lopes, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Perrein-Ettajani, H., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. Chemosphere 100, 63–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.069
- Bury, N.R., Hogstrand, C., 2002. Influence of chloride and metals on silver bioavailability to Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Yolk-Sac Fry. Environ. Sci. Technol. 36, 2884–2888. doi:10.1021/es010302g
- Canesi, L., Corsi, I., 2016. Effects of nanomaterials on marine invertebrates. Sci. Total Environ. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.085
- Courtemanche, R.J.M., Taylor, N.S., Courtemanche, D.J., 2015. Initiating silver recycling efforts: Quantifying Ag from used burn dressings. Environ. Technol. Innov. 4, 29–35. doi:10.1016/j.eti.2015.04.003
- Delorenzo, M.E., 2015. Impacts of climate change on the ecotoxicology of chemical contaminants in estuarine organisms. Curr. Zool. 61, 641–652.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. Chemosphere 45, 553–560.
- Dunn, M.K., Edwards-Jones, V., 2004. The role of acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. Burns 30 Suppl S1–S9.

- Eskandani, M., Hamishehkar, H., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., 2013. Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20). *DNA Cell Biol.* 32, 498–503. doi:10.1089/dna.2013.2059
- Evans, L.P., Murphy, C.E., Britton, J.C., Newland, L.W., 1977. Salinity relationships in *Corbicula fluminea* (Müller 1774). *First Int. Corbicula Symp.* 193–214.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517–531. doi:10.1016/j.envint.2010.10.012
- Fong, J., Wood, F., 2006. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *Int. J. Nanomedicine* 1, 441.
- Gagné, F., Auclair, J., Fortier, M., Bruneau, A., Fournier, M., Turcotte, P., Pilote, M., Gagnon, C., 2013. Bioavailability and Immunotoxicity of Silver Nanoparticles to The Freshwater Mussel *Elliptio complanata*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 76, 767–777. doi:10.1080/15287394.2013.818602
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–10. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 84, 51–59. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.009
- Jourmi, L. El, Amine, A., Boutaleb, N., Abouakil, N., Lazar, S., Antri, S. El, 2015. The use of biomarkers (catalase and malondialdehyde) in marine pollution monitoring: Spatial variability. *J. Mater. Environ. Sci.* 6, 1592–1595.
- Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1962–1967.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D.H., Cho, M.-H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 3, 95–101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001
- Klein, C.L., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T.A.J., Van Doren, E., De Temmerman, P.-J., Mast, J., Wick, P., Krug, H., Locoro, G., Hund-Rinke, K., Kördel, W., Friedrichs, S., Maier, G., Werner, J., Linsinger, T., Gawlik, B.M., Comero, S., 2011. NM-Series of representative manufactured nanomaterials NM-300 silver characterisation, stability, homogeneity. Publications Office, Luxembourg.
- Liu, J., Jiang, G. (Eds.), 2015. *Silver Nanoparticles in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs: Distribution of Metals in Molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Morton, B., Tong, K.Y., 1985. The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from Hong Kong. *Malacol. Rev.* 18, 91–95.

Ng, T., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P., Amiard, J., Wang, W., 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 299, 179–191. doi:10.3354/meps299179

Nôges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Sci. Total Environ.* 540, 43–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.045

Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K., Lynch, I., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* 6, 2295–2350. doi:10.3390/ma6062295

Risso-de-Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.-P., Rahmani, R., 2001. Toxic Effects of Wastewaters Collected at Upstream and Downstream Sites of a Purification Station in Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 129–141. doi:10.1007/s002440010230

Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 21, 201–230.

Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 118–125.

Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquat. Toxicol.* 170, 162–174. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.019

Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecol. Indic.* 52, 96–104. doi:10.1016/j.ecolind.2014.11.022

Points forts

L'exposition des organismes aux NAPs et NM d'argent entraîne :

- *une réduction de la vitesse d'enfouissement des organismes, y compris lors de l'exposition à l'agent dispersant,*
- *l'activation de divers mécanismes de défense combinés à l'apparition de dommages cellulaires.*

La variation de la salinité dans le milieu entraîne :

- *une augmentation de la dissolution des nanomatériaux et nanoproduits,*
- *une modification de la disponibilité et de l'accumulation de l'argent dans les organismes.*

La salinité peut donc être identifiée comme un facteur de stress à prendre en considération lors de l'évaluation du risque associée aux NAPs et NM.

3^{ème} Partie :

Ecotoxicologie des nanomatériaux et nanoproduits de dioxyde de cérium.

Cette partie est consacrée à l'étude des effets des nanomatériaux et nanoproduits de dioxyde de cérium sur les deux espèces modèles (C. fluminea et S. plana) étudiées en mésocosmes, le long du gradient de salinité eau douce-eau de mer. Les nanoproduits (NAP) contenant des nanomatériaux de dioxyde de cérium (CeO₂-NM) sont largement présents dans de nombreux secteurs industriels en raison de leurs propriétés catalytiques et anti-ultra-violets. Au regard de l'augmentation de l'utilisation des CeO₂-NAP et de la production de CeO₂-NM, les risques de rejets dans l'environnement aquatique sont susceptibles d'augmenter. Par conséquent, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) a classé les CeO₂-NM dans la liste des nanomatériaux prioritaires à étudier (Singh et al., 2014). Le comportement et le devenir des CeO₂-NM et CeO₂-NAP sont liés aux différentes conditions physico-chimiques des milieux environnementaux. La salinité est l'une des principales variables du continuum eau douce-eau marine et conditionne ainsi la biodisponibilité et l'écotoxicité des CeO₂-NM et CeO₂-NAP. Des recherches écotoxicologiques sur les CeO₂-NM ont été conduites précédemment sur des organismes aquatiques d'eau douce (Bour et al., 2015a ; Garaud et al., 2015 ; Tella et al., 2014) et marins (Conway et al., 2014; Dogra et al., 2016), mais des études sur les réponses aux CeO₂-NAP réalisées en prenant en compte un large gradient de salinité sont plus rares. Les principaux objectifs de la présente étude étaient d'évaluer l'éventuel risque environnemental de nanoproduits avant et après utilisation (EnviroxTM) et d'un nanomatériau standardisé fourni par le Joint Research Centre (NM-212). Ces expériences ont été menées dans des mésocosmes installés en laboratoire en présence d'organismes endobenthiques d'eau douce, (C. fluminea 1^{ère} étude) et issus du milieu estuarien, (S. plana 2^{nde} étude). Dans les deux cas, l'exposition a impliqué un gradient de salinité propre à chaque espèce (1.5/ 15 psu et 30/ 15 psu respectivement) suite à des injections chroniques de dioxyde de cérium, soit par l'ajout de nanoproduits (avant et après vieillissement du produit EnviroxTM), soit de nanomatériaux (NM-212) durant un mois d'exposition. Le bilan de masse a été calculé afin de mieux appréhender le devenir des CeO₂-NM et CeO₂-NAP dans les différents compartiments (eau, sédiment et biota) des mésocosmes. La bioaccumulation du cérium, ainsi que les impacts biochimiques et comportementaux sur les bivalves ont été évalués en mesurant le cérium total dans la glande digestive et en mesurant une batterie de biomarqueurs aux niveaux sub-individuel et individuel. Les deux études seront présentées sous forme de publications puisqu'il est prévu de les soumettre sous la forme d'articles compagnons dans un journal international courant novembre 2016.

La première étude présente les résultats obtenus suite à l'exposition en mésocosmes d'eau douce de C. fluminea. Le bilan de masse met en évidence un dépôt de cérium principalement à la surface du sédiment quelle que soit la salinité testée (1,5 ou 15 psu) et pour l'ensemble des conditions de contamination au cérium. La libération du cérium sous forme labile a été observée uniquement après exposition aux nanoproduits EnviroxTM (avant combustion) et NM-212.

Suite à l'évaluation du devenir du cérium dans le mésocosme, son accumulation par les organismes a été essentiellement observée après l'exposition au NM-212 à 15 psu. De plus, l'accumulation du cérium par les organismes s'est révélée faible et stable malgré les différents ajouts chroniques de CeO₂-NM ou CeO₂-NAP. Les modifications marquées des réponses biochimiques ont été observées seulement à partir de 3 semaines d'exposition en laboratoire, avec l'activation des mécanismes de prise en charge des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'apparition des dommages cellulaires révélée par l'activité des caspases et l'utilisation des réserves énergétiques. Une perturbation de la cinétique d'enfouissement a également été observée après exposition aux CeO₂-NM et CeO₂-NAP. Cette modification de l'activité de bioturbation opérée par les organismes pourrait impacter la distribution du cérium dans le sédiment et la colonne d'eau.

Le second chapitre de cette partie de thèse présente les résultats obtenus en mésocosmes marins en présence de S. plana. Les résultats montrent un faible recouvrement du cérium dans le mésocosme d'exposition quelles que soient les conditions testées. Ceci pourrait être dû au système expérimental présentant un réservoir supplémentaire pour permettre de reproduire les cycles de marées et qui augmenterait ainsi la possibilité d'adsorption du métal sur ces surfaces. L'accumulation du cérium par les organismes a été observée après exposition à l'Envirox™ (avant et après combustion). Le CeO₂-NM a induit des effets délétères chez S. plana après 14 et 21 jours, caractérisés par l'augmentation des réponses des biomarqueurs impliqués dans les défenses antioxydantes et par des modifications des cinétiques d'enfouissement. Cependant, les réponses physiologiques et comportementales observés pourraient n'être que transitoires, le temps que les organismes s'acclimatent à la présence du contaminant, induisant un retour des marqueurs biologiques à leurs niveaux de base comme observé après 28 j d'exposition.

Chapitre VI: Integrated ecotoxicological impact of pristine and ageing ceria nanoproducts and nanomaterials along a salinity gradient

Chapitre VI.1: Under indoor freshwater mesocosm facility (using *Corbicula fluminea*)

Carole Bertrand*‡#, Simon Devin*, Catherine Mouneyrac‡, Christophe Pagnout*, Laurence Poirier#,
Aurore Zalouk-Vergnoux#, Mélanie Auffan\$, Laure Giambérini*

(En cours de rédaction)

*Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC, CNRS UMR 7360), Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, F-57070 Metz, France

‡LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

#LUNAM Université, Université de Nantes, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 9 rue Bias, F-44035 Nantes Cedex 01, France

\$Université d'Aix en Provence, CEREGE, Technopôle de l'Arbois-Méditerranée, BP80, F-13545 Aix en Provence Cedex 4, France

Abstract

Cerium oxide engineered nanomaterials (CeO₂-NMs) are largely integrated in nano-enabled products (NAPs) due to their different catalytic and anti-UV properties. According to the production volumes of CeO₂-NMs, literature highlighted their potential release into aquatic environment and for this reason, CeO₂-NMs belongs to the priority testing nanomaterial list of Organization for Economic Cooperation and Development (Singh et al., 2014). Fate and behavior of CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs are affected by different physico-chemical variables in the environment and are probably influenced by salinity gradient characterizing the freshwater-marine continuum. Ecotoxicological research on CeO₂-NMs have been conducted on freshwater organisms (Bour et al., 2015a; Garaud et al., 2015; Tella et al., 2014), but data on CeO₂-NAPs or covering the salinity gradient are scarce. The main objectives of this study were to assess the possible environmental risk of pristine and ageing CeO₂-NAPs (Envirox™) and the standardized CeO₂-NMs provided from Joint Research Centre (NM-212) across a salinity gradient ((1.5 or 15 practical salinity unit (psu)) using indoor mesocosm facility in presence of a freshwater endobenthic euryhaline bivalve (*Corbicula fluminea*) fed *ab libitum* by algae at low additional chronic concentrations during a mid-term exposure. The uptake, biochemical and behavioral impacts on bivalves have been assessed measuring total Ce into digestive gland of organisms and by using a battery of biomarkers from sub-individual to individual levels. Results showed a main recovery of Ce into the superficial sediment whatever the salinity tested (1.5 or 15 psu) for all CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs conditions with a release of Ce labile form only after exposure to pristine Envirox™ and NM-212. Organisms' uptake was particularly important after exposure to NM-212 at the hyper-saline condition (15 psu). Biochemical responses have been observed only at the mid-term of exposure with an activation of management mechanisms of reactive oxygen species (ROS), damage responses such Caspase-3 activity and energetic reserve use. Perturbation of burrowing kinetic has been observed after CeO₂-NMs exposure. This modification of their bioturbation activity (either enhanced or lowered depending on the exposure condition) may impact CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs distribution within the sediment and the water column.

Keywords: ageing nanoproduct, Envirox™, NM-212, cerium, *Corbicula fluminea*, salinity gradient and biomarkers

1. Introduction

According to the broad range of engineered nanomaterials (ENMs), cerium dioxide nanomaterial (CeO_2 -NMs) is used in different sectors due to its large properties such as shield ultraviolet (Caputo et al., 2015), polishing agents for glass (Collin et al., 2014), catalyst converters in automotive industry (Selvan et al., 2009), antibacterial and anti-oxidant activities (Pelletier et al., 2010; Thill et al., 2006). Due to its large production in Europe (100- 1000 tons/years) (Piccinno et al., 2012), European Commission's Joint Research Centre (JRC) decided to include CeO_2 -NMs in the priority list of representative test materials. The production of CeO_2 -NAPs or CeO_2 -NMs has permitted to estimate the predictive environmental concentration (PEC) ranging from 0.1 to 1 $\mu\text{g/L}$ and the predictive no effect concentration (PNEC) reaching 3 mg/L in freshwater. Nevertheless, possible increase of concentrations into the environment due to their increasing use can be expected (Batley et al., 2013a). Assessment of CeO_2 -NMs toxicity has been investigated on organisms present along aquatic trophic chain and results showed low toxicity effects on algae, diatoms, chironomids, crustaceans, amphibians and bivalves (Bour et al., 2015a, 2015b; Garaud et al., 2016b, 2015; Hoecke et al., 2009). To enhance the comparison of the CeO_2 -NMs outcome obtained by different research centers, JRC proposed to assess effects of CeO_2 -NMs using a well-characterized representative material (NM-212). Objectives of standardized ENMs used by international scientific community are to assess CeO_2 -NMs impacts and to develop environmentally friendly nanomaterials and nanoproducts in the future. In parallel, technological advances and the societal benefits of nanomaterials have largely contributed to increase the nanoproducts number in our daily lives. From 2005 to 2015, an increase of thirty-three fold of the number of nanoproducts (from 54 to 1814) has been estimated by Vance et al. (2015) and the quantity will rise up in 2020 to 3 400 according to the Nanotechproject (2011). Because of their introduction in many consumer products, there is a lot of public concern about their behavior, fate, and impacts. In the context of regulations of the launch on nanoproducts, many studies focused on toxicity effect assessment of automotive fuel additives such as Envirox™ (Batley et al., 2013; Zhang et al., 2013; Cassee et al., 2012; Park et al., 2008). Using cell model, Park et al. (2007; 2008) and Cassee et al. (2012) reported low toxicity of the nanoproduct Envirox™ with no measured effect on *Salmonella* strain TA100 but results showed bacteria respiratory inhibition. Moreover, normalized *Daphnia magna* immobilization tests have been conducted by Park et al. (2007) and the absence of toxic effect after exposure to Envirox™ did not allow to determine the half maximal effect concentration (EC_{50}). The fate and (eco)toxicity approach on Envirox™ is not yet developed in aquatic compartment, recognized as the final receptacle of pollutants. Indeed, the release of ENMs in aquatic environment can reach 0.4-7.0 % of the total production (Keller et al., 2013).

Due to climate global change, aquatic ecosystems undergo physico-chemical alterations such as increase of the salinity in freshwater and estuaries (Field et al., 2014). Estuaries are very important transition ecosystems between freshwaters coming from land (run-off, drainage and rivers) and seawater areas creating numerous and diverse ecological and socio-economically opportunities (Verdelhos et al., 2014). Nano-enabled product released (accidentally or not) into rivers, estuaries or sea, characterized by a high ionic strength, may undergo ENM behavioral modifications (homo-aggregation/agglomeration). Among the aquatic species exposed to these ENMs, bivalve molluscs have been largely studied and proposed as a well target group for nanotoxicology assessment, considering the potential cellular internalization of nano-scale materials (Canesi et al., 2012). The bivalve species *Corbicula fluminea*, because of its important salinity tolerance (from 1 to 24 practical salinity unit –psu) (Evans et al., 1977; Morton and Tong, 1985) is a suitable model to study chemical behavior of ENMs under a salinity gradient. Influence of salinity changes has been shown on behavior, bioavailability and toxicity of silver nanomaterials on aquatic species (citrate-coated silver nanoparticles; standardized silver nanomaterials NM-300K) (Auffan et al., 2014; Bertrand et al., 2016) but up to now, nanoproduits remain poorly studied. Considering the large entrance of nano-enabled products, it seems essential to assess the influence of salinity change on nanoproduits. To study the fate and effects of (i) ceria nanoproduit Envirox™ under two states of their life-cycle (before and after their use in motor vehicle) and of (ii) a standardized Ce nanomaterial NM-212, the French ANR NanoSALT program aims to use a mesocosm approach, previously developed by Garaud et al. (2016) and Auffan et al. (2014). The experimental systems were adapted here to perform exposure along a salinity gradient from 1.5 to 15 psu, reflecting freshwater and estuarine compartments respectively, in presence of euryhaline species, *Corbicula fluminea*. The mesocosm approach developed in the study can be defined as an enclosed indoor experimental unit, that closely as possible, simulates the natural aquatic environment using artificial water and sediment fed *ad libitum* under predefined conditions (pH, salinity, redox potential and dissolved oxygen) monitored during the whole experiment. The biological effects of nanoproduit and nanomaterials were investigated in a mid-term exposure time (28 days), involving multiple dosings at low concentrations (final concentration close to 1 mg CeO₂/L) to simulate a chronic pollution of CeO₂-NMs increasing environmental relevance (Figure 1).

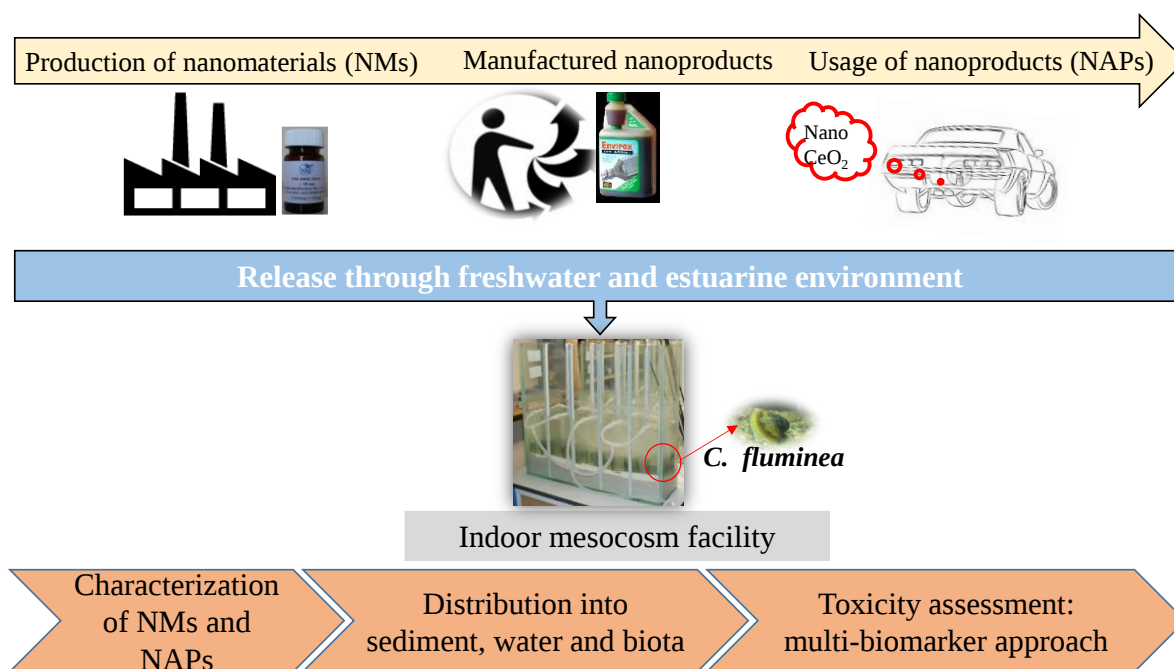


Figure 1: Flowchart of exposure design of *Corbicula fluminea* to Ce nanoproducts

Mass balance of Ce has been determined in the different environmental and biological compartments of mesocosms: sediment, water column and digestive gland of bivalves. Release of labile Ce from CeO₂-NMs has been determined using passive samplers (diffusive gradient of thin film, DGT). The aquatic species constantly undergo impacts of pollutants and biomarkers remain the better tools to assess sublethal toxic effects on organisms at biochemical, cellular, physiological or behavioral levels (Gagné, 2014). To understand the biological responses relative to contamination treatment or salinity conditions, biomarkers used in battery are key profilers of the stress conditions (Brown et al., 2004) with possible high applications in environmental risk assessment (ERA) (Canesi et al., 2012). After exposure to nanoparticles, oxidative stress was known to occur as a principal effect. Subsequent to CeO₂-NMs exposure, potential generation of reactive oxygen species (ROS) has been determined studying the antioxidant defenses of organisms at different biological levels (Valavanidis et al., 2006). A battery of biomarkers, including antioxidant defense, such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), total antioxidant capacity (TAC), and antitoxic defense with glutathione-S-transferase (GST) but also lysosomal responses with acid phosphatase activities (ACP) were used. This suite of biomarkers was completed with assessment of CeO₂-NMs cellular damages and apoptosis induction including caspase activity (CSP-3) and lipid hydroperoxide (LOOH) content. Triglyceride content (Trigly), electron transport system (ETS) and lactate dehydrogenase (LDH) as structural and energetic parameters were measured in digestive gland of bivalves (Garaud et al. 2016; Bertrand et al. 2016). Multi-biomarker approach has been conducted after 7, 14, 21 and 28 days of exposure in order to determine the potential biological effects of CeO₂-NMs under different states (raw nanoproduct, nanoproduct after use and ENMs).

In order to obtain an integrated overview of the experimental mesocosm systems and to assess the ecotoxicology of nanoproducts on freshwater bivalves, global statistical analyses, including Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), were carried out to particularly better describe the relationships between exposure conditions and the whole battery of biomarkers.

2. Materials and methods

2.1 Sampling and acclimatization of *C. fluminea*

Individuals of *C. fluminea* (15-20 mm length) were hand-collected in September 2014 at Argancy in the Moselle River (49° 19'48'58''W, 6° 19'81.11 N, France), transported with sediment from the collection site to the laboratory. The physio-chemical parameters of the sampling site were: pH: 7.3, temperature: 13.9°C, salinity: 1.2 psu. Bivalves were rapidly placed into aerated artificial water at 1.5 psu during 3 days, in a controlled temperature room at 15°C. Then, bivalves were progressively acclimatized to hyper-saline condition (15 psu) by a 3-day step by step process based on the transfer of organisms to plastic tanks (50 L) at 1.5 psu to 5 psu, then to 10 psu and finally to 15 psu considered herein as the limit of salinity tolerance of *C. fluminea* (Bertrand et al., unpublished data). A group of bivalves was kept in artificial water at the field salinity (1.5 psu).

2.2 Algae inoculum preparation

Chlorella sp. was cultured in 10L aerated flasks containing 5L of special algae growth medium Lefevre-Czarda (composition of medium L-C in SM) in controlled temperature room at 20°C under photoperiod (16:8 light/dark). At the end of the exponential phase of growth, determinations of cell number were done using a Malassez counting chamber. Algal cells were concentrated from the culture medium by decantation and centrifugation, washed once with artificial water at the two salinities tested (1.5 and 15 psu) and suspended in a final volume permitting to obtain a concentration of 1×10^5 cells/mL. Water samplings have been carried out every 3 days during the exposure time (28d) to measure the evolution of algae in the medium.

2.3 Tested (Nano) materials

Envirox™ was purchased by Energenics Europe Ltd. This nanoproduct enhanced fuel combustion efficiency and reduced the emissions of soot issue of diesel engine during the catalytic combustion (Park et al., 2007). Ce element included in this nanoproduct, is under CeO₂ form at the concentration of 26.7 ± 0.8 g.L⁻¹. The two different tested states of Envirox™ were prepared and characterized by the CEREGE (UMR CNRS 7600 Aix en Provence, France). Briefly, Envirox™ suspension was centrifuged at 396 750g during 1h at 20°C. Then, the pellet was lyophilized and named Envirox™. A part of the resulting lyophilized powder was introduced in an oven during 20 min at 850°C to simulate the car engine combustion providing an aging Envirox™ product named Combusted Envirox™.

The particles of Envirox™ were spherical with a mean size measured by TEM of 7.6 ± 1.2 nm, whereas Combusted Envirox™ had crystallite forms with a mean size of 19.0 ± 10.4 nm.

Representative Manufactured Nanomaterials (Ref: CeO₂-JRCNM02102a/ JRCNM02102a004014) has been provided by the Joint Research Centre (JRC). These nanoparticles measured by Dynamic Light Scattering (DLS) were monodispersed in ultra-pure water with a mean size of 225.4 ± 92.5 nm. These observations were in accordance with those reported by JRC (213 nm). Stock suspension was prepared using powder of NM-212 to obtain a final concentration of 1g/L in 15 mL every week during the whole exposure time to work with a stabilized suspension. Before each introduction of CeO₂-NMs into the mesocosms, ultrasonic probe (at 90 % amplitude in ice tank) of the stock suspension has been done for 20 s as described by the guideline of Singh et al. (2014).

2.4 Mesocosm setup

Eight mesocosms (750 x 200 x 600 mm) were filled with 14 kg of synthetic sediment (90 % sand, 9 % kaolin, 1 % CaCO₃) adapted from OECD guideline (OECD, 2004) and flooded with 45 L of artificial water (mixture of ultra-pure water and sea salt Tropic Marin™ (Tropicarium Buchshlag Dreieich, Germany) (Garaud et al., 2015) at each salinity tested (1.5 and 15 psu). This approach based on synthetic sediment and artificial water was performed to obtain, as much as possible, a replicable medium between all experiments. Two groups of four mesocosms have been established to assess salinity effects: at 1.5 psu corresponding to field salinity and at 15 psu, defined as a hyper-saline condition. Physico-chemical parameters including temperature (°C), salinity (psu), pH, redox potential (mV), dissolved oxygen (mg O₂/L) were monitored into the water column continuously during the whole experimental time (28 days). Mesocosm setup including backward scheduling and experimental design has been presented in Figure 2. Briefly, after the acclimatization of organisms to each tested salinity, they were placed into mesocosm (n= 96 per condition), during three days for the stabilization of the mesocosm units (photoperiod: 16:8, temperature: 19.3°C, oxygen saturation: 8.14 mg O₂/L, pH: 8.1, redox potential: 232.9 mV). Then, algae preparation was inoculated in each mesocosm giving a final concentration of 1×10^5 cells/mL, maintained during the whole experiment). Three treatments; NM-212, Envirox™ and Combusted Envirox™ were used for exposure (2 mesocosms per treatments). Eleven injections of 4.1 mg of CeO₂ have been done into the mesocosm water column (every 3 days) in order to obtain a final CeO₂ quantity of 45 mg (or a final concentration of 1 mg/L) after 28 days of exposure (Figure 2). Two mesocosms, one at 1.5 psu and a second at 15 psu, were uncontaminated by CeO₂-NMs and considered as Controls.

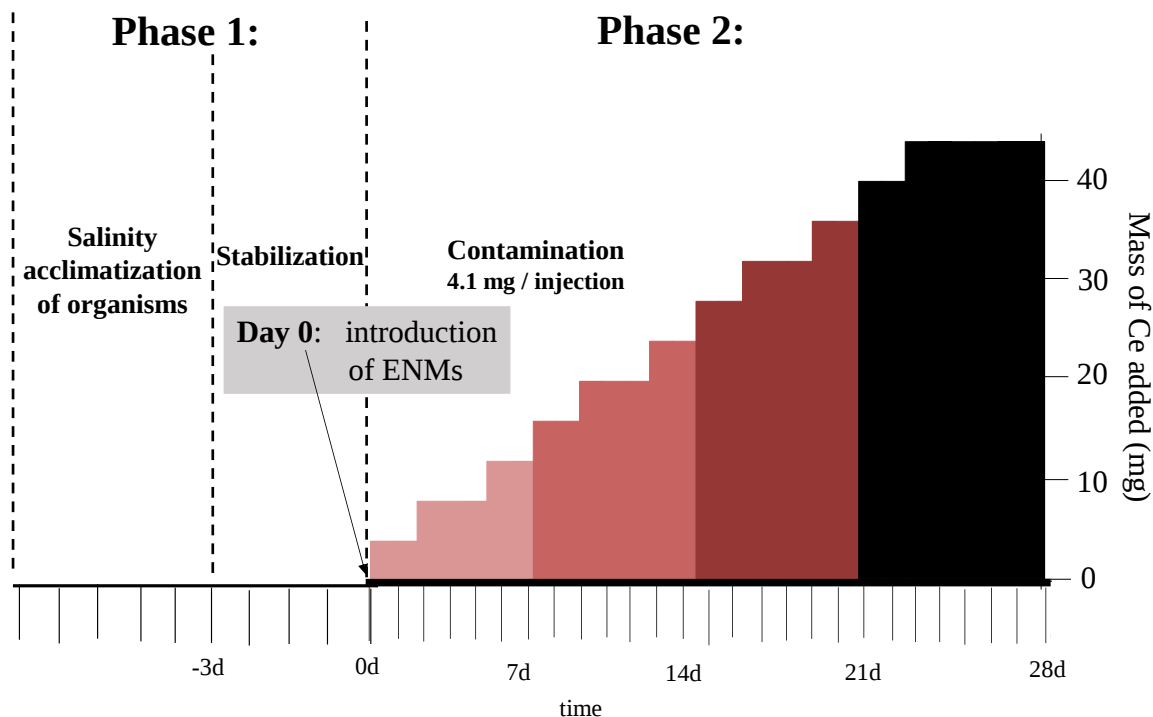


Figure 2: Mesocosm setup, phase 1 indicated two steps including acclimatization to hyper-saline condition and stabilization phase of organisms into the mesocosm for the four treatments (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212). Phase 2 showed the multiple dosing of Ce into the contaminated mesocosms (except control) (colors indicated the increased of contamination with the time).

2.5 Characterization of exposure media

For each treatment (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212), total cerium concentrations have been quantified in mesocosms to determine the distribution of CeO₂ into different compartments. Measurements have been done into the first 10 cm of water column with pro-pipette (5 mL, n=3 per mesocosm) stabilized with 2 % of HNO₃ pure (Sigma Aldrich, 65 %) at 7, 14, 21 and 28 days of exposure. Surficial sediment (25 cm³) was sampled and digested using a triacid mix (5 mL HNO₃, 5 mL HF and 2 mL HClO₄) at 7, 14, 21 and 28 days of exposure. Analysis were done by Micropolluants Technologie S.A. (Metz, France) using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; Agilent 7700, Agilent Technologies France). Results were expressed in µg Ce/L of water and in mg Ce/kg of sediment. The estimation of released Ce ions has been assessed using passive samplers, DGT purchased from DGT Research LTd. (Lancaster, U.K.) (n=3 per mesocosm and sampling time (7, 14, 21 and 28d). At the beginning of the experiment, 3 DGT units have also been deployed during few minutes in the atmosphere room, where the eight mesocosms were located. It allowed the determination of the background of cerium in DGT units and the potential contamination during the deployment, before they reached the mesocosm; these corresponding results were considered as blanks.

After being removed from the water column, DGT units (blank and exposed units) were washed with MilliQ-water and Chelex resins were placed in 1.5 mL of 1 M HNO₃ and left for more than 1 d, to remove Ce from the Chelex resins. Then, Ce quantifications in all samples were performed at laboratory by ICP-MS (NexION 300x-PerkinElmer). Ce masses accumulated by DGT units were calculated as described by Buffet et al (2014b) and expressed in ng.

2.6 Cerium quantification in bivalves

The digestive glands of organisms (n=6 per treatments) were dissected and placed in oven (45°C) during 48 h. After dry weight determination, digestive glands were added with 1 mL of HNO₃ (32.5 %) and placed at 65°C during 48 h to release total Ce contained in the tissues. Quantifications of Ce into homogenate were performed by Micropolluants Technologie S.A. (Metz, France) using ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies France). Results were expressed in ng Ce/ g dry weight.

2.7 Ecotoxicity effects on *C. fluminea*

2.7.1 Biomarker approach

Biochemical markers have been measured using an automated chemistry analyzer Konelab 20 XTi (Thermo Scientific) as described by Garaud et al. (2016) and Bertrand et al. (2016). A battery of biomarkers has been assessed including antioxidant and antitoxic defenses (catalase: CAT, glutathione-S-transferase: GST, glutathione peroxidase: GPx, total antioxidant capacity: TAC, acid phosphatase: ACP), cellular damages and apoptosis (lipid hydroperoxydes: LOOH and caspase-3: CSP-3) and structural and energetic parameters (triglyceride: Trigly, electron transport system: ETS, lactate dehydrogenase: LDH). All these measurements were carried out in the digestive gland of individual clams (n=6 per treatment) after 7, 14, 21 and 28 days of exposure, under each treatment (Control, NM-212, Envirox™, Combusted Envirox™) and at each tested salinity (1.5 and 15 psu).

2.7.2 Behavioral experiments

After 7, 14, 21 and 28 days of exposure, burrowing tests were conducted on bivalves as described by Bertrand et al., (2016). Artificial water and sediment have been homogenized and adjusted at each tested salinity, one day before the experiment. At each sampling date, 12 organisms of each experimental group were placed at the interface of water column and sediment. The number of burrowed organisms was determined during 6 hours (every 5 minutes during the first hour, every 10 minutes during the second hour and finally every 20 minutes during the last hours).

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses has been conducted using R (R Core Team, 2014). Homoscedasticity and normality have been assessed by Levene and Shapiro-tests respectively. When both conditions were satisfied, Student-tests have been conducted to assess treatment and salinity effects considering only significant results with threshold of $p < 0.05$. When one condition was not satisfied, raw data were log-transformed and statistical differences were tested again. Burrowing kinetics of individuals over time have been determined using generalized nonlinear model based on raw burrowing data described in details by (Buffet et al., 2014a). The evaluation of the impact of dependent variables (exposure conditions including treatments and salinity conditions considered either individually or combined) on response patterns of independent variables (biomarker responses) has been conducted using Manova test. At each tested time (7, 14, 21 and 28 days), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed using the whole set of biomarker data of all treatments and at both tested salinities to determine the best combinations of biomarker responses to separate each group. Biomarker selection was based on variables important in the projection (VIP), having threshold greater than 1.

3. Results

3.1 Characterization of nanoproduit

Size of CeO₂-NMs into Envirox™ ranged from 3 to 10 nm in accordance with Batley et al. (2013). The hydrodynamic diameter of Envirox obtained by DLS showed a monodispersed population of nanoparticles with a size around 122.4 nm. As mentioned by the producer, Envirox™ nanoproduit is maintained in oil mixture creating organic matter core at the surface of CeO₂-NMs. To mimic its use in car engine, Envirox™ was exposed to a high temperature (850°C) and the complete lost of the organic matter core at their surface conducted to an increase of nanoparticle size with a range from 5.6 ± 0.8 nm to 22.1 ± 1.3 nm.

3.2 Monitoring of the abiotic factors

Monitoring of physico-chemical parameters (pH, redox potential, salinity dissolved oxygen and temperature) during the whole experimental duration (28 days) was summarized in Figure S1. Abiotic parameters remained stable into each mesocosm and during the whole experiment period. Under 1.5 psu salinity, physico-chemical parameters were: pH: 7.89 ± 0.28 ; salinity: 1.85 ± 0.19 psu; redox potential: 267.24 ± 51.54 mV, temperature: 18.62 ± 0.95 °C, oxygen saturation: 8.35 ± 1.13 mg O₂ / L and under 15 psu: pH: 8.20 ± 0.36 ; salinity: 16.43 ± 1.20 psu; redox potential: 204.71 ± 28.08 mV, temperature: 18.44 ± 0.99 °C, oxygen saturation: 8.16 ± 1.38 mg O₂ / L.

3.3 Ce distribution in the different compartments

3.3.1 Mass balance

ICP-MS measurements of total Ce concentrations were done in the water column, sediment and biota and summarized using a mass balance in order to follow the metal distribution in the experimental systems. At the different sampling times (7, 14, 21 and 28 d), sums of the total Ce measured into the different compartments were expressed in percentage relative to the injected Ce and are reported in the Figures 3. For both tested salinities, Ce was mainly found in the surficial sediments of the experimental mesocosms whatever the exposure time with proportions ranging from 84.5 to 100 %. At 1.5 psu (Figure 3-A), Ce from both stages of Envirox™ was detected in the mesocosms only after 14 days of exposure and reached maximum of recovery after 21 days of experiment before decreasing at the end of the exposure period (28 d). After exposure to NM-212, recovery of Ce reached more than 30 % as soon as 7 days and remained stable before decreasing until the end of the exposure period.

At the highest tested salinity of 15 psu (Figure 3-B), Ce coming from only Combusted Envirox™ was measured after 7 days of exposure. The metal recovery carried on increased on the whole exposure period. Measured Ce from Envirox™ followed the same pattern, but after 14 days, and reached maximal values at the end of the experiment. After exposure to NM-212, a maximum of 40 % of the injected Ce mass has been measured into the mesocosm after 14 days of exposure. Finally, recovery fell down to 4 % after 3 weeks of exposure.

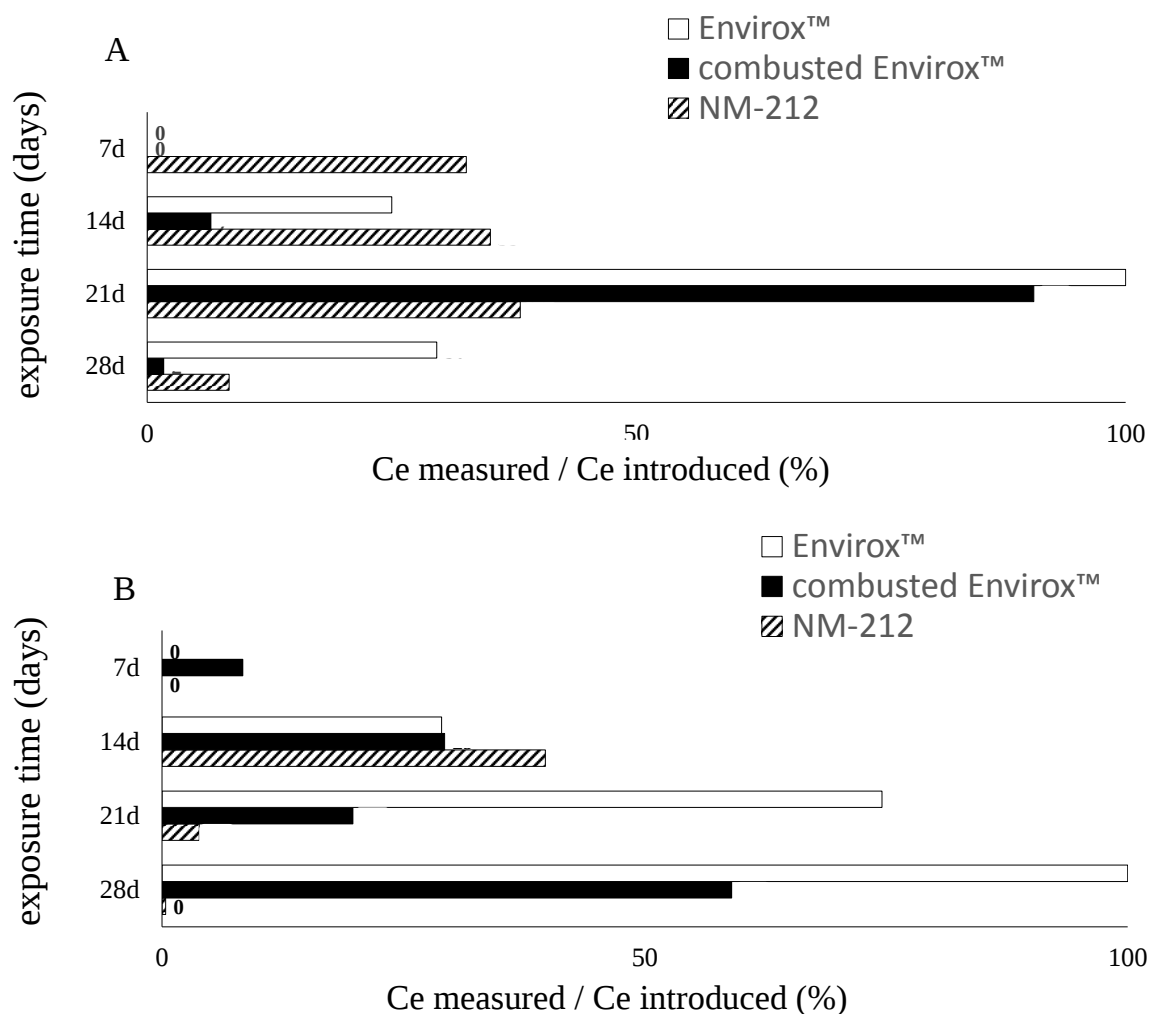


Figure 3: Ce contents in the mesocosms as the sums of Ce measured in water column, sediment and digestive glands of *C. fluminea* after 7, 14, 21 and 28 days of exposure at 1.5 psu (A) and 15 psu (B). Data were corrected from background concentration considered as the concentration found in control mesocosm.

3.3.2 Determination of labile Ce into exposure media by DGT units

At 1.5 psu (Figure 4-A), significant greater masses of labile Ce have been observed after 14 days of exposure to Envirox™ and NM-212 compared to Control. After 21 days, this trend persisted only in the experimental systems exposed to Envirox™.

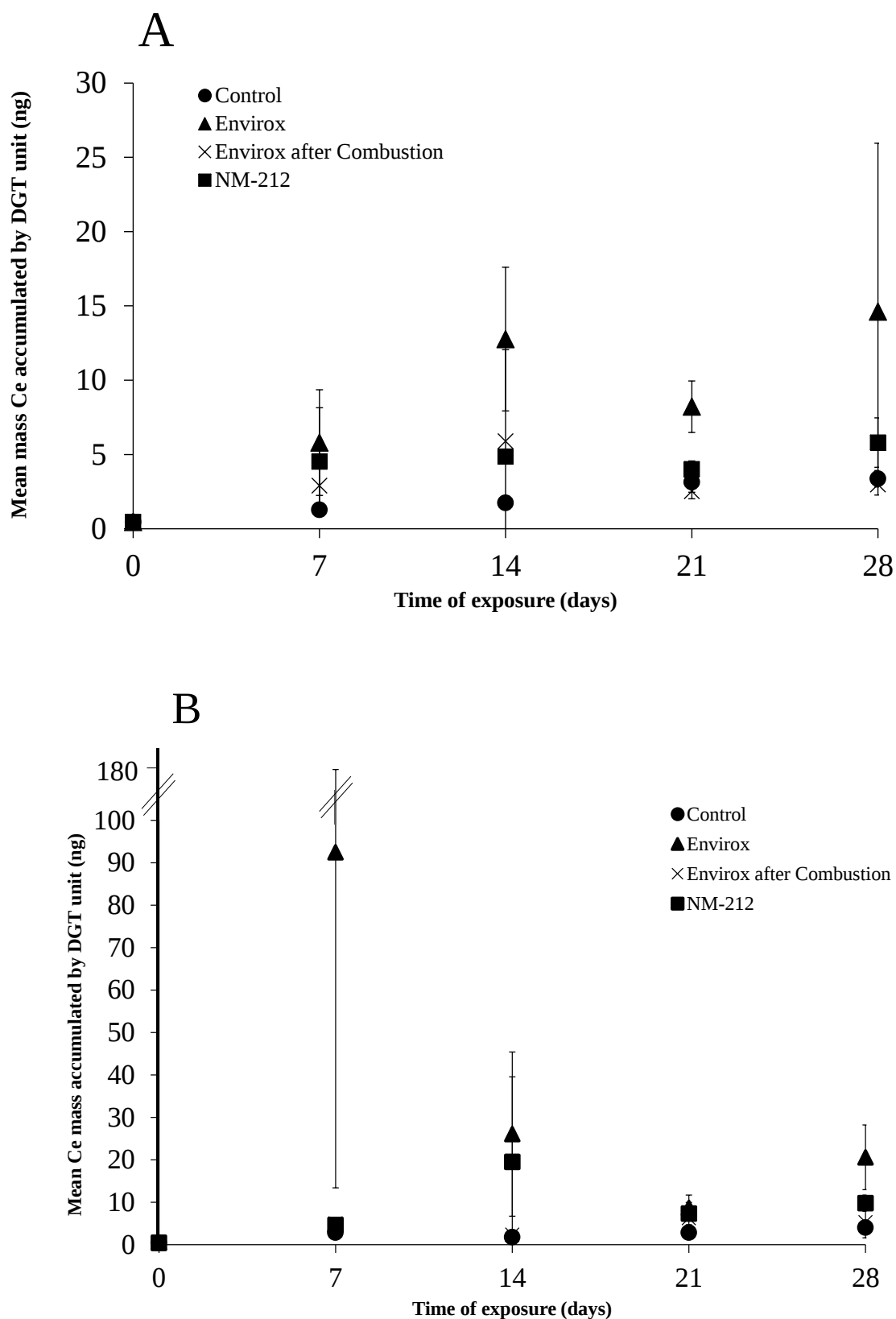


Figure 4: Mean masses and standard deviation of Ce (ng) accumulated by DGT units (n=3 per treatment) during the time of exposure (A) at 1.5 psu and (B) at 15 psu.

At 15 psu (Figure 4-B) and after 21 days, significant greater labile Ce masses have been measured in DGT units exposed to Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212 compared to Control. At the end of the exposure period, the treatments Envirox™ and NM-212 continued to be significantly higher than Control.

3.3.3 Bioaccumulation of Ce into digestive gland of organisms

After 7, 14, 21 and 28 d of exposure, total Ce concentrations in the digestive gland of bivalves exposed in the different mesocosms are illustrated in Figure 5.

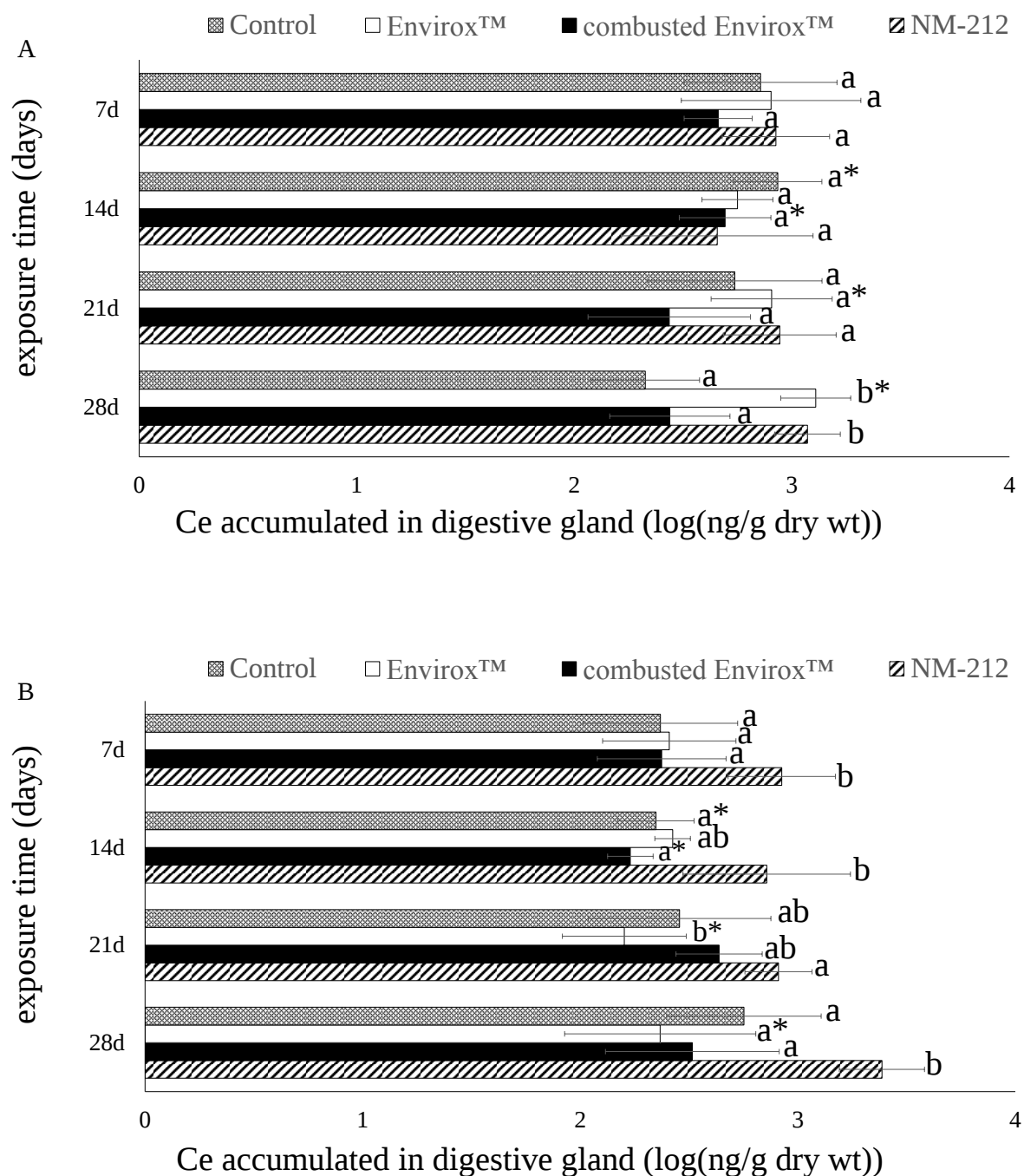


Figure 5: Cerium bioaccumulation (log transformed (mean and standard deviation)) in the digestive glands of *C. fluminea* (n=6) after 7, 14, 21 and 28 days of exposure in mesocosms to four experimental treatments (Control, Envirox™, Combusted Envirox™, NM-212) at 1.5 psu (A) and 15 psu (B). Significant differences between the exposure treatments were expressed with lowercase after exposure at 1.5 psu (A) and after exposure at 15 psu (B). Asterisk (*) indicated significant differences between salinities (1.5 psu (A) vs 15 psu (B)) for each exposure treatment

At 1.5 psu (Figure 5-A), significant greater Ce concentrations were measured into the organisms exposed to Envirox™ and NM-212 compared to Control and Combusted Envirox™ only after 28 days. At 15 psu (Figure 5-B), only organisms exposed to NM-212 exhibited significant higher accumulation of Ce compared to Control after 7, 14 and 28 days of exposure.

Comparing both tested salinities, digestive Ce accumulation was greater in the organisms exposed to Combusted Envirox™ at 14 days and to Envirox™ at 21 and 28 days, under field salinity (1.5 psu) than under hyper-saline condition (15 psu).

3.4 Biological and biomarker responses

No mortality was observed during the whole experiment. Means of biomarker responses measured in *C. fluminea* are detailed in Table S1 in Supplementary Data section. Global statistical approach, including Manova analysis and PLS-DA, has been summarized in Table 1 (left column).

Table 1 (prochaine page): Statistical analyses on biomarker responses with Manova and PLS-DA. Manova results were expressed using *p*-value (*p*) of different conditions (salinity, treatments and interactions). After PLS-DA analysis, important biomarkers were selected when the Variable Importance in the Projection (VIP) values was higher than 1. Pairwise comparisons have been conducted using Hotelling T² and *p*-value were listed in the table. Significant differences between conditions were indicated by shadow cells. (CSP-3: Caspase 3; Trigly= Triglyceride; LDH= Lactate deshydrogenase; TAC= Total antioxidante capacity; GPx= Glutathion peroxidase; ETS= Electron transport system).

Global Analysis		Pairwise Comparison : Hotelling T ²								
		Control		Envirox™		Combusted Envirox™		NM212		
7 d	Manova Salinity Treatments Salinity * Treatments <i>PLS-DA (VIP > 1)</i> <i>CSP-3; Trigly</i>	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	
		Control 15 psu	0.06							
		Envirox™ 1.5 psu	0.41							
		Envirox™ 15 psu		0.70	0.98					
		Combusted Envirox™ 1.5 psu	0.70		0.06					
		Combusted Envirox™ 15 psu		0.98		0.66	0.06			
14 d	Manova Salinity Treatments Salinity * Treatments <i>PLS-DA (VIP > 1)</i> <i>CSP-3; Trigly; LDH</i>	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	
		Control 15 psu	0.24							
		Envirox™ 1.5 psu	0.82							
		Envirox™ 15 psu		0.54	0.13					
		Combusted Envirox™ 1.5 psu	0.82		0.30					
		Combusted Envirox™ 15 psu		0.30		0.82	0.06			
21 d	Manova Salinity Treatments Salinity * Treatments <i>PLS-DA (VIP > 1)</i> <i>CSP-3; LDH; TAC; GP_x</i>	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	
		Control 15 psu	0.03							
		Envirox™ 1.5 psu	0.30							
		Envirox™ 15 psu		0.64	0.11					
		Combusted Envirox™ 1.5 psu	0.19		0.06					
		Combusted Envirox™ 15 psu		0.73		0.91	0.01			
28 d	Manova Salinity Treatments Salinity * Treatments <i>PLS-DA (VIP > 1)</i> <i>CSP-3; LDH; CAT; ETS; TAC</i>	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	
		Control 15 psu	0.02							
		Envirox™ 1.5 psu	0.19							
		Envirox™ 15 psu		<0.01	0.04					
		Combusted Envirox™ 1.5 psu	0.19		0.24					
		Combusted Envirox™ 15 psu		0.02		0.70	0.04			
28 d	Manova Salinity Treatments Salinity * Treatments <i>PLS-DA (VIP > 1)</i> <i>CSP-3; LDH; CAT; ETS; TAC</i>	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	1.5 psu	15 psu	
		Control 15 psu	0.31		0.49					
		Envirox™ 1.5 psu		0.01		0.02				
		Envirox™ 15 psu								
		Combusted Envirox™ 1.5 psu								
		Combusted Envirox™ 15 psu								

Manova analyses have been conducted on the whole biomarker data set at each sampling time and showed significant modifications of the biomarker responses according to the salinity only. At the end of the exposure period, treatments showed a tendency to affect the biomarker responses but in a non-significant way ($p=0.08$). Statistical results of PLS-DA obtained at each sampling time on the whole data set have allowed to select the most important biomarkers ($VIP>1$) involved in the discrimination of the different experimental groups according to the treatment and the salinity. Furthermore, an increase of VIP included in PLS-DA model from 2 to 5 between 7 and 28 days of exposure was noticed. In exposed organisms, the mechanism of responses, indicated by the VIP, involved the energetic reserves, cell alteration and antioxidative defence indicators. After 7 days, biomarkers distinguishing the experimental groups were CSP-3 activity and Trigly content, completed with LDH activity after 14 days of exposure. Nevertheless, significant differences between the experimental groups, whatever the tested salinities, have been observed (Table 1, right column). Pairwise comparisons highlighted increasing significant differences between experimental groups only after 3 weeks of exposure. At this sampling time, some biomarkers, including CSP-3, LDH, TAC and GPx activities, discriminated the experimental groups according to treatments and salinities. Significant greater effects of salinity were observed in control organisms and those exposed to Combusted Envirox™ at 1.5 psu compared to 15 psu. At 1.5 psu, significant greater LDH and TAC activities and lower GPx activity have been measured in clams exposed to NM-212 compared to Combusted Envirox™. After 28 days of exposure, biomarkers allowing to create the model involved CSP-3, LDH, CAT, ETS and TAC activities. At this sampling date, projections of the experimental groups under the different treatments, at both salinities, were illustrated in Figure 6.

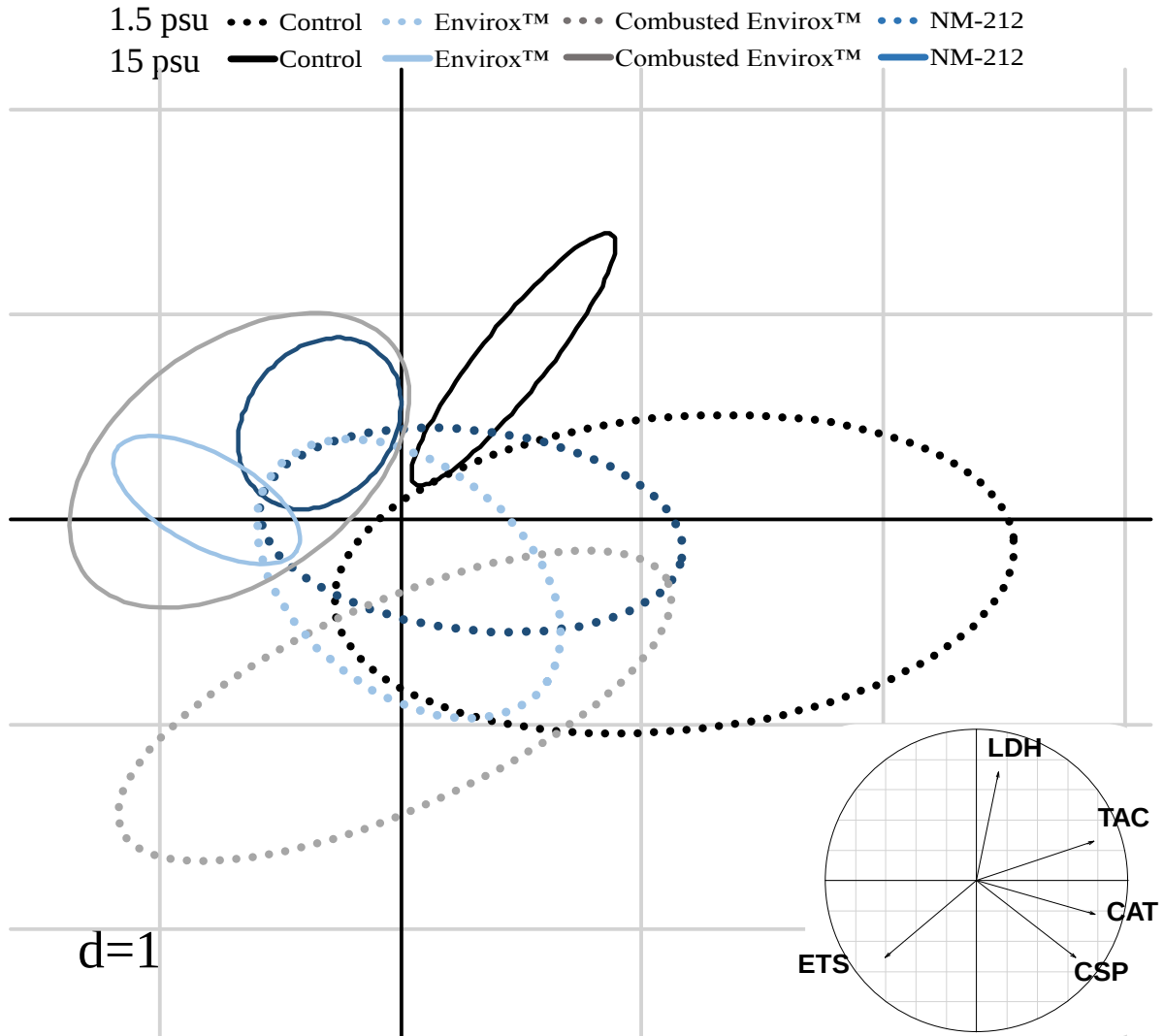


Figure 6: Partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) of the biomarker responses in *Corbicula fluminea* exposed to the four treatments (Control; Envirox™; Combusted Envirox™; NM-212) under the two studied salinities (1.5 and 15 psu) at 28 days of exposure. (CSP-3: Caspase 3; LDH= Lactate deshydrogenase; TAC= Total antioxidante capacity; ETS= Electron transport system; CAT= catalase).

Control organisms and those exposed to both states of Envirox™ exhibited significant greater TAC, CAT and CSP-3 activities at the field salinity (1.5 psu) compared to the hyper-saline condition (15 psu). At 15 psu, significant greater TAC and LDH activities have been measured in Control compared to organisms exposed to Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212. Moreover, a significant greater ETS activity was observed after contamination with Envirox™ compared to NM-212.

3.5 Behavioral responses

The representation of burrowing kinetics over the exposure period is reported in Figures 7.

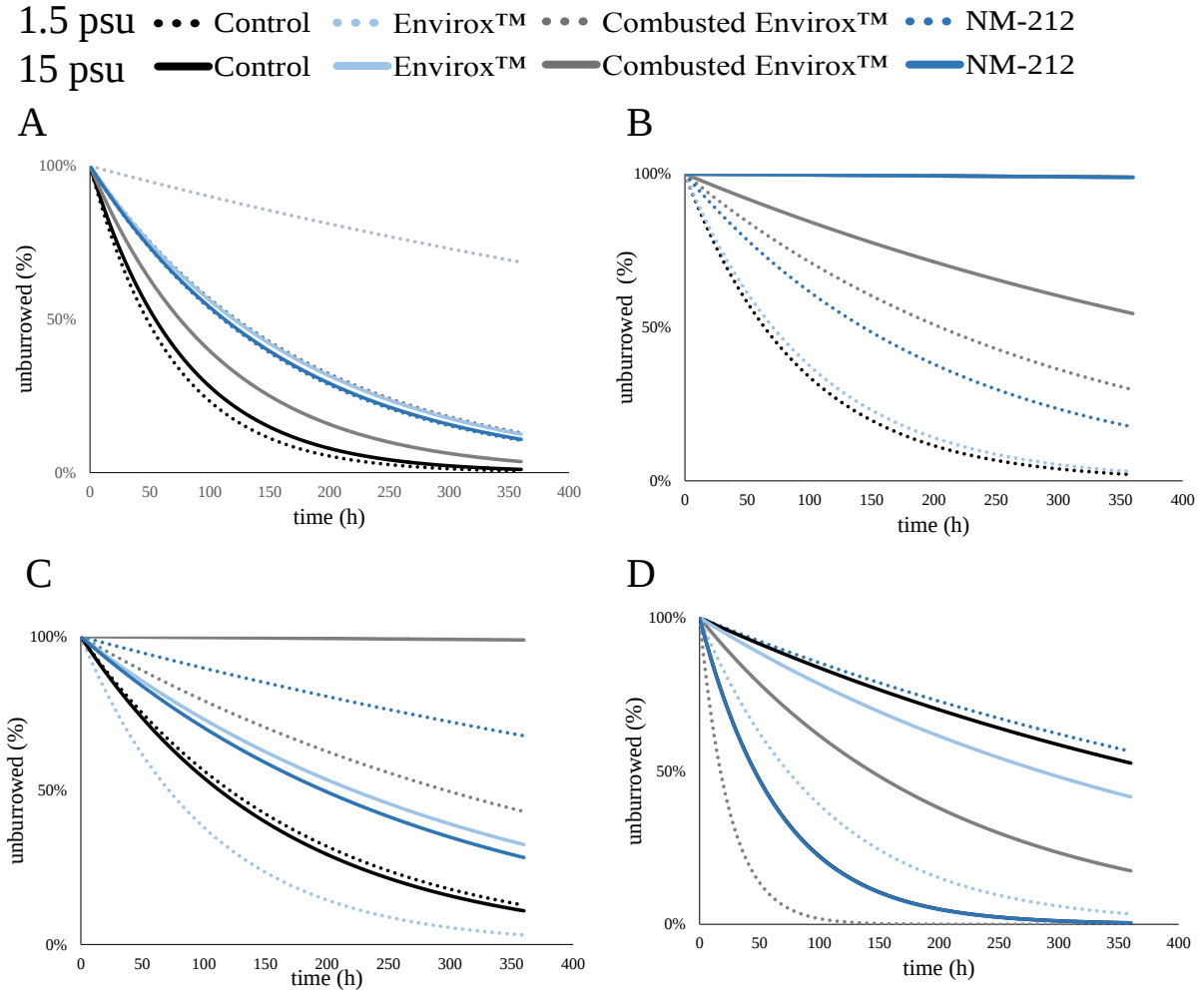


Figure 7: Burrowing kinetics (unburrowed individuals over the time) for *C. fluminea* after an exposure of: 7 days (A), 14 days (B), 21 days (C) and 28 days (D), at two salinities (1.5 and 15 psu).

After 7 days (Figure 7-A), control *C. fluminea* exhibited the most rapid burrowing activity at both tested salinities. Moreover, clams exposed to Combusted Envirox™ burrowed significantly faster under the hyper-saline condition (15 psu) compared to the field salinity (1.5 psu).

After 14 days of exposure (Figure 7-B) and at 1.5 psu, *C. fluminea* exposed to Combusted Envirox™ at 1.5 psu showed a significant slower burrowing activity compared to Control and Envirox™. At 15 psu, organisms exposed to Combusted Envirox™ exhibited a significant faster burrowing kinetic compared to Control, Envirox™ and NM-212. Salinity effects were observed under all treatments with a significant faster burrowing kinetic after exposure to 1.5 psu compared to 15 psu.

At field salinity (1.5 psu) and after 21 days (Figure 7-C), control *C. fluminea* and those exposed to Combusted Envirox™ showed significant faster burrowing kinetics compared to NM-212. The same trend of burrowing activity has been noticed for organisms exposed to Envirox™ compared to Control and Combusted Envirox™ ones. At 15 psu, significant slower burrowing activities have been observed after exposure to Combusted Envirox™ compared to Control and Envirox™.

The same trend was noticed in clams exposed to Envirox™ compared to those exposed to NM-212. Except for NM-212 treatment, significant slower burrowing activities were observed at 15 psu compared to 1.5 psu, for all the other treatments.

At the end of the exposure (Figure 7-D) and at 1.5 psu, organisms exposed to Combusted Envirox™ burrowed more rapidly compared to Control, Envirox™ and NM-212. The same greater burrowing activity was also noticed for bivalves exposed to Envirox™ compared to NM-212. At 15 psu, organisms exposed to all contamination treatments showed a significant faster burrowing kinetic compared to Control. The burrowing activities of organisms were also significantly more rapid after exposure to NM-212 compared to Envirox™ and Combusted Envirox™.

4. Discussion

The present study focuses for the first time on coupled assessment of (i) the behavior and the fate of pristine and ageing cerium oxide nanoparticle (Envirox™ before and after combustion) and the standardized nanomaterial NM-212 under indoor aquatic mesocosm exposure conditions using low additional chronic concentrations during a mid-term exposure (28 days) and characterized by salinity variations (freshwater and estuarine conditions) and (ii) ecotoxicological sublethal effects on a euryhaline freshwater endobenthic bivalve (*C. fluminea*).

4.1 Methodology adaptation of mesocosm for freshwater endobenthic species

In previously French ANR program (MESONNET), adaptable mesocosm platform has been developed to simulate freshwater ecosystems (Auffan et al., 2014). The recent approaches using these mesocosm systems were recognized for their role to assess the environmental realistic risk of nanomaterials on algae, diatoms, chironomids, amphibians, bivalves and snails (Bour et al., 2015a; Garaud et al., 2016b; Tella et al., 2014). In the present study, adjustment and methodology adaptations for *C. fluminea* have been developed using this platform facility.

The absence of *C. fluminea* mortality during the whole acclimatization period allowed us to validate the favorable ecological conditions developed under laboratory conditions. Physico-chemical parameters remained stable during the whole experiment thereby confirming the absence of mesocosm drift during the whole experimental period.

A salinity effect was observed for control organisms underlined by biomarker and behavioral response changes. After 21 days of exposure, biochemical responses of control organisms showed higher GPx and CSP-3 activities at the field salinity compared to hyper-saline salinity. GPx responses play an important role in the metabolism of oxidative damages, protecting cells from lipid peroxidation and are defined as nonspecific antioxidant defenses. CSP-3 activity informs on the cell death as product of apoptosis mechanisms observed further to various physio-chemical modifications (Risso-de-Faverney et al., 2001).

The same trend has been observed after 28 days of exposure with an activation of antioxidant defenses such as TAC, CAT and damage responses with CSP-3 activities at the field salinity. Management mechanisms of oxidative stress is already expected under normal conditions (Rahal et al., 2014). At the same time, slower burrowing activity was observed for controls exposed at the hyper-saline condition (15 psu), correlated with an increase of LDH activity involved as the main glycolytic enzyme under anaerobic condition (Diamantino et al., 2001). No siphon or foot movements have been directly observed in clams during the 6 h of the burrowing test. These responses indicated that a prolonged exposure (> 21 d) of euryhaline organisms to hyper-saline condition induced perturbation and isolation of organisms (*e.g.* valve closure) from the exposure medium as already shown by Vinu Chandran (2002).

4.2 Behavior and fate of nCeO₂ in mesocosms

At both tested salinity (1.5 and 15 psu), injected Ce was greatly recovered after exposure to Envirox™ than to the combusted state. The combustion at 850°C has probably affected different features of Envirox™ such as an increase of nanomaterial size (from 7.6 ± 1.2 to 19 ± 10.4 nm), a reduction of surfactant and a decrease by a half of the surface reactivity. Indeed, Limbach et al. (2008) showed a better CeO₂-NMs stability in presence of surfactants (nondegradable acryl polymer surfactant and biodegradable dodecyl benzyl sulfonic acid) compared to the pure cerium. After combustion of Envirox™, absence of organic surfactant which would disperse Ce in non-polar solvent could probability increase the (homo and hetero) aggregation and consequently the settlement onto the sediment of the mesocosm in comparison to non-combusted Envirox™.

Both states of Envirox™ (pristine and ageing) and NM-212 were mainly measured in surficial sediment (95 %). All studies on cerium dioxide, including Envirox™, confirmed its poor solubility (Park et al., 2007) and showed possible homo and hetero-aggregation processes, that may be due to the interaction of CeO₂-NMs with clays, calcium, phosphate or algae into mesocosms (Garaud et al., 2016b).

This partitioning in mesocosm is in accordance with other studies on ceria nanoparticle distribution in aquatic experimental systems (Tella et al., 2014; Zhang et al., 2012). Thus, the introduction of CeO₂-NMs in high ionic strength media may reduce cerium dioxide mobility into the water column. The physico-chemical mechanisms have been explained by Li et al. (2011) as a modification of repulsive forces.

Despite most of the recovered cerium in mesocosms contaminated with Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212 has been detected into the surface sediment, the main substantial question was the localization of the remaining fraction of injected cerium. The great variability of the total Ce recoveries could be explained by the bioturbation activities operated by endobenthic species.

At the water-sediment interface, endobenthic invertebrates used in this present study have significant ability to modify sediment and water fluxes due to their bioturbation activity (Mermillod-Blondin and Rosenberg, 2006). Regarding the burrowing kinetic results, some impairments CeO₂-NMs have been observed for organisms exposed to Ce.

A possible migration of metal toward the depths of sediment because of the burrowing activity of animals could be an explanation (Montes et al., 2012) as it was previously observed by Buffet et al. (2013) for Zn nanoparticles. Particular interest on metal distribution at different depths of sediment compartment should be developed in the future.

At both tested salinities (1.5 and 15 psu), releases of Ce labile forms were greater in systems contaminated with Envirox™ compared to Combusted Envirox™. At the field salinity (1.5 psu), Combusted Envirox™ presented large aggregates, potentially reducing the release of Ce labile form. Furthermore, under hyper-saline condition, the reduction of Ce release from Combusted Envirox™ may be linked to the increase of monovalent cations (such as sodium) in the medium, inducing a greater stability of uncoated nanomaterials (Collin et al., 2014). At 1.5 psu, due to the higher presence of labile Ce after exposure to Envirox™, Ce uptakes by organisms were usually greater under this treatment compared to Combusted Envirox™.

Despite the low masses of Ce labile form accumulated by DGT units after exposure to NM-212, a significant increase of Ce labile has been determined compared to Control at both tested salinities. This could be due to a great insolubility of NM-212 into water already reported by Singh et al. (2014). Concomitantly, bioaccumulation of Ce in organisms was mainly observed after exposure to NM-212, whereas in bivalves exposed to both Envirox™ states, Ce bioaccumulation remained stable during the exposure time, despite the multiple dosing contamination. From the first injections of CeO₂-NMs into the mesocosms, particular profit threshold of organisms' uptake have been achieved. Same results on two other Ce nanoparticles (bare and citrate cerium nanoparticles) have been observed on another freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha* (Garaud et al., 2016b).

In the experimental conditions of the present study, maintenance of algae concentration coupled to multiple dosing contamination during the whole experimental duration could induced an increase of CeO₂-NMs retention by algae and suspended matters, leading to some hetero-aggregation mechanisms (Tella et al., 2014; Ward and Kach, 2009). Ce retention by algae and suspended matter could also lead to a reduction of the metal bioavailability for organisms or specific regulation mechanisms or detoxification process set up by cell to stabilize internal Ce concentration (Garaud et al., 2016b; Gomes et al., 2014).

4.3 Biochemical and behavioral effects on *C. fluminea*

Biochemical and behavioral measurements did not show any differences between both Envirox™ states during the whole exposure time (28 days). Nevertheless, at biochemical level, salinity impacts have been observed for both Envirox™ states after 21 and 28 days.

At the field salinity (1.5 psu), results showed an activation of antioxidant, antitoxic defences (CAT, GPx), and metabolic activity (ETS) but also, cellular damages (CSP-3) for Combusted Envirox™ treatment compared to the hyper-saline condition (15 psu). The same trend has been observed for pristine Envirox™ with an increase of CAT, CSP-3 activities comparing results obtained for both tested salinities.

An increase of CAT activity has already been reported in organotypic cultures of rat lung after exposure to an aerosol diffusion of diesel fuel supplemented with Envirox™ (final concentration of 5 mg/L) (Park et al. 2008). In accordance with the results of the present study, significant sublethal effects on the copepod *Corophium volutator* after exposure to CeO₂-NMs (12.5 mg/L) have been observed, at 1, 5 and 10 days of exposure, with an increase of DNA damages, lipid peroxidation and time-depend SOD-like activity, indicating an oxidative stress endured by organisms (Dogra et al., 2016). However, considering the greater tested concentration, the direct comparison with our study (using a final concentration of 1 mg/L) remained difficult. At individual level, greater impairments of burrowing kinetics have been observed at 15 psu compared to the field salinity (1.5 psu). Moreover, after 28 days of exposure at 15 psu, treatment effects have been observed for both Envirox™ states compared to Control. Envirox™ and Combusted Envirox™ presented the lowest CAT and CPS-3 activities compared to the Control which displayed a higher LDH activity. Similar effects have been observed for NM-212. These results confirm the relevance to use a standardized nanomaterials in comparison to NAPs. This behavioral result coupled with the increase of LDH activity involved in glycolic metabolism under anaerobic condition informed on the possible isolation of organisms by valve closure in control organisms.

Moreover, faster burrowing kinetic has been observed after exposure to NM-212 compared to Control. Based on these results, observed impacts may translate the activation of antioxidant and antitoxic mechanisms after exposure to both Envirox™ states, whereas at 15 psu, other physiological mechanisms such as osmoregulation mechanisms or non-enzymatic antioxidants could be involved to deal with the multi-stress conditions (saline conditions and treatments). No modification or impact has been observed after exposure to NM-212 at the tested concentration. Absence of impact may be correlated to the possible capacity of ceria nanoparticles to neutralize reactive oxygen species (ROS) due to their catalase and superoxide dismutase (SOD) mimetic activities (Das et al., 2007; Korsvik et al., 2007).

In summary, if environmental risk assessment of NMs requires right now the more realistic experimental environmental conditions as possible, the ones developed in our study such as low chronic and cumulative concentrations, complex exposure system in indoor mesocosms (water, sediment, algae), salinity gradient to makes the assessment of CeO₂-NMs impacts difficult partially due to the low recovery of total injected Ce. Consequently, it is difficult to determine pattern of biomarker responses on freshwater bivalve *C. fluminea*.

5. Conclusion

This study investigated the behavior and fate of Ce nanoparticle (Envirox™) under two states (before and after combustion) and of a standardized nanomaterial (NM-212) in an indoor mesocosm platform, adapted to the benthic bivalve *C. fluminea*.

Total Ce was mainly recovered in surficial sediments after exposure to the both Envirox™ states and NM-212 but Ce labile forms were particularly measured after exposure to Envirox and NM-212. Organisms' uptake varied across the salinity gradient and according to the tested CeO₂-NMs, with a greater bioaccumulation observed after exposure to NM-212 at the hyper-saline condition. At biochemical level, CeO₂-NMs effects have been observed only from 21 days of exposure duration as well as impairments burrowing behavior. These results highlighted the necessity to enhance biomarker battery by focusing on some biomarkers or some physiological functions and to develop longer term exposure (several months) using this indoor mesocosm approach with multiple injections of nanomaterials at low concentrations.

Acknowledgments

Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) for C. Bertrand PhD salary and running costs, CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR-10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century) and the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02).

The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology.

Bibliography

Auffan, M., Matson, C.W., Rose, J., Arnold, M., Proux, O., Fayard, B., Liu, W., Chaurand, P., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., Di Giulio, R.T., 2014. Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology* 8, 167–176. doi:10.3109/17435390.2013.869627

Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. *Sci. Rep.* 4. doi:10.1038/srep05608

Batley, G.E., Halliburton, B., Kirby, J.K., Doolette, C.L., Navarro, D., McLaughlin, M.J., Veitch, C., 2013. Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel fuel catalyst: Characterization and risk of nano-CeO₂ as a diesel catalyst. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1896–1905. doi:10.1002/etc.2246

Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. doi:10.1002/etc.3428

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Toxicity of CeO₂ nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology* 1–11. doi:10.3109/17435390.2015.1053422

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015b. Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 120, 230–236. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.012

Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 66, 267–278. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.001

Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Lopes, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Perrein-Ettajani, H., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. *Chemosphere* 100, 63–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.069

Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013. A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environ. Sci. Technol.* 130110104824003. doi:10.1021/es303513r

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21. doi:10.1016/j.marenvres.2011.06.005

Caputo, F., De Nicola, M., Sienkiewicz, A., Giovanetti, A., Bejarano, I., Licoccia, S., Traversa, E., Ghibelli, L., 2015. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties,

prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. *Nanoscale* 7, 15643–15656. doi:10.1039/C5NR03767K

Cassee, F.R., Campbell, A., Boere, A.J.F., McLean, S.G., Duffin, R., Krystek, P., Gosens, I., Miller, M.R., 2012. The biological effects of subacute inhalation of diesel exhaust following addition of cerium oxide nanoparticles in atherosclerosis-prone mice. *Environ. Res.* 115, 1–10. doi:10.1016/j.envres.2012.03.004

Collin, B., Auffan, M., Johnson, A.C., Kaur, I., Keller, A.A., Lazareva, A., Lead, J.R., Ma, X., Merrifield, R.C., Svendsen, C., White, J.C., Unrine, J.M., 2014. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. *Env. Sci Nano* 1, 533–548. doi:10.1039/C4EN00149D

Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S., Hickman, J.J., 2007. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 28, 1918–1925. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.036

Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* 45, 553–560.

Dogra, Y., Arkill, K.P., Elgy, C., Stolpe, B., Lead, J., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2016. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress in the sediment-dwelling amphipod *Corophium volutator*. *Nanotoxicology* 10, 480–487. doi:10.3109/17435390.2015.1088587

Evans, L.P., Murphy, C.E., Britton, J.C., Newland, L.W., 1977. Salinity relationships in *Corbicula fluminea* (Müller 1774). *First Int. Corbicula Symp.* 193–214.

Field, C.B., Barros, V.R., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Abdrabo, M.-K., Adger, N., Anokhin, Y.A., Anisimov, O.A., Arent, D.J., Barnett, J., 2014. Summary for policymakers. *Clim. Change 2014 Impacts Adapt. Vulnerability Part Glob. Sect. Asp. Contrib. Work. Group II Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Change* 1–32.

Gagné, F., 2014. *Biochemical ecotoxicology: principles and methods*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.

Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–10. doi:10.3109/17435390.2016.1146363

Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquat. Toxicol.* 158, 63–74. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.004

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 208–214. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.004

Hoecke, K.V., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., Schamphelaere, K.A.C.D., Elsaesser, A., Meeren, P.V. der, Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D., Rydzynski, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., Samber, B.D., Vincze, L., Janssen, C.R., 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4537–4546. doi:10.1021/es9002444

- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15. doi:10.1007/s11051-013-1692-4
- Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., Self, W.T., 2007. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem. Commun.* 1056. doi:10.1039/b615134e
- Limbach, L.K., Bereiter, R., Müller, E., Krebs, R., Gälli, R., Stark, W.J., 2008. Removal of Oxide Nanoparticles in a Model Wastewater Treatment Plant: Influence of Agglomeration and Surfactants on Clearing Efficiency. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5828–5833. doi:10.1021/es800091f
- Li, Z., Sahle-Demessie, E., Hassan, A.A., Sorial, G.A., 2011. Transport and deposition of CeO₂ nanoparticles in water-saturated porous media. *Water Res.* 45, 4409–4418. doi:10.1016/j.watres.2011.05.025
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., 2006. Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat. Sci.* 68, 434–442. doi:10.1007/s00027-006-0858-x
- Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J. Hazard. Mater.* 225-226, 139–145. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.009
- Morton, B., Tong, K.Y., 1985. The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from Hong Kong. *Malacol. Rev.* 18, 91–95.
- Nanotechproject, 2011. The project on emerging nanotechnologies [WWW Document]. URL <http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/> (accessed 5.7.16).
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.-P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., Martin, P., 2008. Hazard and Risk Assessment of a Nanoparticulate Cerium Oxide-Based Diesel Fuel Additive—A Case Study. *Inhal. Toxicol.* 20, 547–566. doi:10.1080/08958370801915309
- Park, B., Martin, P., Harris, C., Guest, R., Whittingham, A., Jenkinson, P., Handley, J., 2007. Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of EnviroxTM – a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. *Part. Fibre Toxicol.* 4, 12. doi:10.1186/1743-8977-4-12
- Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7981–7989. doi:10.1128/AEM.00650-10
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* 14. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–19. doi:10.1155/2014/761264
- Risso-de-Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.-P., Rahmani, R., 2001. Toxic Effects of Wastewaters Collected at Upstream and Downstream Sites of a Purification Station in Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 129–141. doi:10.1007/s002440010230

Selvan, V.A.M., Anand, R.B., Udayakumar, M., 2009. Effects of cerium oxide nanoparticle addition in diesel and diesel–biodiesel–ethanol blends on the performance and emission characteristics of a CI engine. *J Eng Appl Sci* 4, 1819–6608.

Singh, C., Friedrichs, S., Cecccone, G., Gibson, N., Alstrup Jensen, K., Levin, M., Goenaga Infante, H., Carlander, D., Rasmussen, K., Institute for Health and Consumer Protection, 2014. Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, characterisation and test item preparation JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Publications Office, Luxembourg.

Tella, M., Auffan Mélanie, Brousset Lenka, Issartel Julien, Kieffer Isabelle, Pailles Christine, Morel Elise, Santaella Catherine, Angeletti Bernard, Artells Ester, Rose Jérôme, Thiéry Alain, Bottero Jean-Yves, 2014. Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6151–6156. doi:10.1021/es060999b

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013

Verdelhos, T., Cardoso, P.G., Dolbeth, M., Pardal, M.A., 2014. Recovery trends of *Scrobicularia plana* populations after restoration measures, affected by extreme climate events. *Mar. Environ. Res.* 98, 39–48. doi:10.1016/j.marenvres.2014.03.004

Vinu Chandran, R., 2002. Intracellular osmoregulation in the estuarine mollusc *villorita cyprinoides* Var. *cochinensis* (Mollusca: Bivalvia) Hanley. Cochin University of Science and Technology, India.
Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002

Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K.-B., Garfunkel, E., Schwander, S., Tetley, T.D., Chung, K.F., Porter, A.E., Ryan, M., Kipen, H., Liroy, P.J., Mainelis, G., 2013. Impacts of a Nanosized Ceria Additive on Diesel Engine Emissions of Particulate and Gaseous Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13077–13085. doi:10.1021/es402140u

Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y., Zhang, Z., 2012. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89, 530–535. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.044

Table S1: Means $\pm$ standard deviations of biochemical biomarkers quantified in *C. fluminea* after 7, 14, 21 and 28 days of exposure to the four experimental treatments (Controls, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) with CAT= catalase; TAC= total antioxidant capacity; GST= glutathione-S-transferase; GPx= glutathione peroxidase; ACP= acid phosphatase; LOOH= lipid hydroperoxides; CSP-3= caspase-3; Trigly= triglyceride; ETS=electron transport system; LDH= lactate deshydrogenase).

Biomarkers			1.5 psu				15 psu				
			Control	Envirox™	Combusted Envirox™	NM-212	Control	Envirox™	Combusted Envirox™	NM-212	
7 d	Antioxidant and anti-toxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot / min	65.38 ± 31.13	70.26 ± 34.15	71.85 ± 28.37	67.14 ± 29.11	59.59 ± 16.83	56.20 ± 18.30	56.97 ± 19.46	63.96 ± 18.38
		TAC	μmol Teq / g prot / min	17.99 ± 3.87	18.42 ± 5.76	18.80 ± 4.95	18.41 ± 3.67	16.69 ± 3.82	18.35 ± 1.71	17.87 ± 1.73	18.79 ± 3.28
		GST	μmol CDNB / g prot / min	384.60 ± 71.17	360.18 ± 78.46	378.10 ± 61.93	394.47 ± 59.35	367.71 ± 47.30	402.71 ± 52.17	383.24 ± 54.50	418.13 ± 81.72
		GPx	μmol NADPH / g prot / min	15.33 ± 6.27	13.13 ± 10.27	12.21 ± 8.80	12.29 ± 6.44	14.20 ± 7.07	10.53 ± 6.17	17.77 ± 8.97	13.77 ± 5.62
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	44.95 ± 7.36	44.53 ± 7.14	44.95 ± 9.61	43.91 ± 13.83	42.27 ± 11.33	41.81 ± 9.22	41.47 ± 7.56	43.45 ± 9.49
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH / g prot	27.09 ± 9.85	28.27 ± 10.90	28.34 ± 11.23	26.39 ± 13.29	24.28 ± 9.89	27.22 ± 11.09	24.31 ± 9.11	25.81 ± 11.77
		CSP3	μmol pNA / g prot / h	5.22 ± 2.49	4.58 ± 4.88	8.88 ± 5.69	5.57 ± 3.69	0.80 ± 0.35	2.70 ± 3.75	1.43 ± 1.07	1.44 ± 0.69
	Structural and energetic parameters	Taigly	mg / g DW	16.90 ± 2.71	11.22 ± 1.48	16.83 ± 5.01	15.88 ± 2.74	14.24 ± 3.72	13.00 ± 4.10	14.20 ± 3.54	14.30 ± 2.50
		ETS	μmol O ₂ / g / h	61.78 ± 4.58	58.80 ± 8.00	65.38 ± 5.36	55.97 ± 8.99	65.15 ± 10.84	67.42 ± 7.33	65.09 ± 4.68	64.41 ± 8.76
		LDH	μmol NADH / g prot / h	98.67 ± 28.16	85.51 ± 34.84	93.34 ± 16.00	94.21 ± 19.30	92.36 ± 15.46	97.01 ± 8.93	78.79 ± 21.43	104.99 ± 15.83
14 d	Antioxidant and anti-toxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot / min	62.76 ± 19.59	61.39 ± 20.14	74.51 ± 29.37	77.87 ± 22.55	63.93 ± 13.27	55.95 ± 22.48	64.31 ± 9.13	62.25 ± 16.77
		TAC	μmol Teq / g prot / min	20.41 ± 6.23	20.24 ± 3.11	21.59 ± 4.43	18.64 ± 3.42	19.17 ± 1.57	18.27 ± 2.12	18.07 ± 1.89	18.31 ± 1.55
		GST	μmol CDNB / g prot / min	383.24 ± 54.50	405.65 ± 57.32	391.81 ± 34.41	385.73 ± 45.21	412.88 ± 88.23	387.04 ± 37.84	403.88 ± 58.34	424.12 ± 81.95
		GPx	μmol NADPH / g prot / min	16.85 ± 11.74	15.07 ± 4.21	20.21 ± 3.84	12.73 ± 6.28	11.09 ± 8.08	15.41 ± 5.22	15.85 ± 3.91	17.92 ± 6.82
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	43.63 ± 10.30	42.15 ± 9.47	45.19 ± 9.82	38.10 ± 6.21	43.77 ± 12.87	42.64 ± 9.73	42.02 ± 8.74	41.80 ± 7.76
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH / g prot	27.29 ± 9.43	25.89 ± 7.05	24.45 ± 5.64	23.38 ± 4.86	28.73 ± 7.74	24.41 ± 6.76	24.17 ± 4.08	23.10 ± 4.63
		CSP3	μmol pNA / g prot / h	8.01 ± 4.84	7.12 ± 4.74	10.16 ± 3.90	6.50 ± 4.31	3.94 ± 2.02	2.49 ± 2.35	1.85 ± 1.37	1.87 ± 0.98
	Structural and energetic parameters	Taigly	mg / g DW	15.01 ± 4.68	16.46 ± 4.77	15.07 ± 4.74	14.23 ± 1.94	12.61 ± 3.97	15.75 ± 5.29	17.88 ± 7.13	15.71 ± 4.18
		ETS	μmol O ₂ / g / h	61.08 ± 10.99	67.29 ± 6.83	63.32 ± 8.47	66.21 ± 3.86	65.92 ± 12.23	73.16 ± 10.78	68.28 ± 6.29	64.77 ± 5.20
		LDH	μmol NADH / g prot / h	91.50 ± 31.73	92.49 ± 22.65	100.73 ± 24.98	107.25 ± 20.71	107.38 ± 11.35	99.97 ± 15.98	90.84 ± 13.56	106.93 ± 13.64
21 d	Antioxidant and anti-toxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot / min	62.31 ± 29.59	70.75 ± 22.10	94.70 ± 41.35	75.63 ± 26.83	66.53 ± 13.78	61.57 ± 15.06	74.15 ± 17.53	65.14 ± 19.11
		TAC	μmol Teq / g prot / min	19.68 ± 3.44	20.24 ± 2.69	18.15 ± 4.83	22.53 ± 5.12	18.37 ± 2.17	19.77 ± 3.80	19.19 ± 3.32	19.90 ± 2.94
		GST	μmol CDNB / g prot / min	368.35 ± 34.62	371.94 ± 59.80	426.54 ± 82.25	412.78 ± 70.91	395.86 ± 51.28	404.85 ± 41.70	384.59 ± 61.74	382.11 ± 85.34
		GPx	μmol NADPH / g prot / min	16.75 ± 6.29	15.48 ± 4.33	23.29 ± 4.49	14.54 ± 6.51	18.10 ± 8.82	13.53 ± 11.63	15.28 ± 4.55	15.71 ± 4.45
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	41.77 ± 10.57	40.27 ± 13.45	42.37 ± 10.70	45.18 ± 5.97	40.17 ± 12.99	43.05 ± 7.22	42.91 ± 9.91	43.31 ± 11.33
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH / g prot	24.86 ± 5.75	22.18 ± 3.19	22.18 ± 5.73	22.25 ± 6.38	21.67 ± 8.56	21.15 ± 3.16	21.09 ± 5.29	22.11 ± 4.11
		CSP3	μmol pNA / g prot / h	11.10 ± 4.71	8.95 ± 2.89	11.18 ± 4.79	13.87 ± 3.64	2.99 ± 1.90	3.40 ± 1.63	2.72 ± 2.26	5.26 ± 5.89
	Structural and energetic parameters	Taigly	mg / g DW	12.80 ± 2.04	12.29 ± 2.22	13.67 ± 4.06	12.38 ± 3.28	12.26 ± 0.92	11.58 ± 4.17	13.20 ± 1.90	13.32 ± 3.26
		ETS	μmol O ₂ / g / h	62.96 ± 9.76	61.63 ± 9.08	60.16 ± 8.18	61.65 ± 13.18	67.86 ± 13.31	64.82 ± 8.07	61.34 ± 12.13	69.80 ± 6.38
		LDH	μmol NADH / g prot / h	81.77 ± 24.66	109.22 ± 40.09	92.92 ± 22.75	117.90 ± 13.84	95.28 ± 9.26	103.67 ± 6.32	100.40 ± 18.54	113.35 ± 39.26
28 d	Antioxidant and anti-toxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ / g prot / min	94.16 ± 30.43	60.97 ± 18.87	75.73 ± 23.38	79.38 ± 14.21	75.64 ± 7.82	50.45 ± 13.75	43.79 ± 28.58	52.67 ± 15.90
		TAC	μmol Teq / g prot / min	22.10 ± 5.40	17.80 ± 2.31	15.82 ± 3.06	19.69 ± 3.48	20.29 ± 1.68	16.70 ± 2.78	17.91 ± 2.78	17.74 ± 2.25
		GST	μmol CDNB / g prot / min	498.54 ± 112.55	397.63 ± 86.10	413.55 ± 64.73	406.90 ± 81.50	412.48 ± 25.61	344.64 ± 67.32	395.01 ± 80.29	367.06 ± 57.74
		GPx	μmol NADPH / g prot / min	16.93 ± 5.44	17.20 ± 6.12	22.66 ± 11.50	16.39 ± 8.15	19.51 ± 6.38	14.41 ± 4.68	13.91 ± 5.28	17.75 ± 4.11
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	42.82 ± 10.06	41.42 ± 6.65	46.95 ± 7.34	43.49 ± 5.01	41.32 ± 14.41	44.69 ± 10.70	49.33 ± 2.64	39.23 ± 6.93
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH / g prot	21.46 ± 4.47	30.47 ± 11.65	29.67 ± 9.59	27.56 ± 7.87	21.48 ± 3.44	28.48 ± 12.00	30.71 ± 10.72	24.74 ± 8.77
		CSP3	μmol pNA / g prot / h	11.61 ± 6.05	9.64 ± 6.20	9.13 ± 4.26	9.40 ± 4.33	2.59 ± 1.46	1.73 ± 1.57	3.21 ± 1.47	1.46 ± 1.10
	Structural and energetic parameters	Taigly	mg / g DW	10.61 ± 1.14	10.57 ± 4.73	15.29 ± 5.80	11.45 ± 3.31	10.14 ± 3.06	12.53 ± 3.01	13.50 ± 5.13	11.04 ± 3.53
		ETS	μmol O ₂ / g / h	60.57 ± 5.90	66.93 ± 10.54	69.20 ± 14.61	67.36 ± 5.20	59.46 ± 11.61	74.05 ± 5.76	70.26 ± 4.15	63.82 ± 6.94
		LDH	μmol NADH / g prot / h	85.29 ± 31.46	81.55 ± 14.94	68.18 ± 11.00	101.66 ± 11.35	112.69 ± 10.11	87.45 ± 16.75	109.20 ± 22.86	94.07 ± 14.05

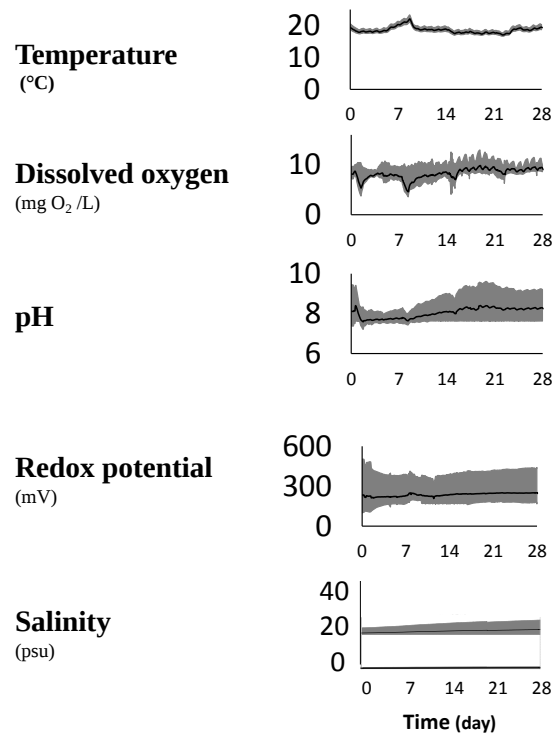


Figure S1 : Evolution of the physico-chemical parameters. Temperature (Celsius degree), dissolved oxygen (mg O₂/L), pH, redox potential (mV), salinity (practical salinity unit (psu)) in the water column, were measured during the all experimental time (28 days). The grey surface was defined by the maximum and minimum values of each parameter and the dark line corresponds to the mean values measured of the 8 mesocosms. One measurement was performed every 15 min.

Chapitre VI.2: Under indoor marine mesocosm facility (using *Scrobicularia plana*)

Bertrand Carole, Laurence Poirier, Simon Devin, Laure Giambérini, Hanane Perrein-Ettajani, Amélie Châtel, Aurore Zalouk-Vergnoux Christophe Pagnout, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac

(En cours de rédaction)

*Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC, CNRS UMR 7360), Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, F-57070 Metz, France

‡LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

#LUNAM Université, Université de Nantes, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 9 rue Bias, F-44035 Nantes Cedex 01, France

\$Université d'Aix en Provence, CEREGE, Technopôle de l'Arbois-Méditerranée, BP80, F-13545 Aix en Provence Cedex 4, France

1. Introduction

Cerium oxide nanomaterials (CeO₂-NMs) are integrated in consumer products such as wood stains (Auffan et al., 2014a) or fuel additives (Park et al., 2007) due to their respective UV filter and catalytic properties. Review on web of knowledge database showed low proportion of (eco)toxicology assessment on cerium oxide nanoproductions (CeO₂-NAPs) and CeO₂-NMs (< 10 and 340 publications respectively) compared to Ce nanoparticles (CeNPs) (3044 publications, consulted June 2016). Given the production volumes of CeO₂-NMs (10 000 tons/ years; (Keller et al., 2013)) and their potential release into the aquatic environment, assessment of the potential environmental risks has been classified as a priority (Singh et al., 2014). This last decade, impacts of CeNPs have been mainly studied in different vegetal and animal species in freshwater media using diatom, chironomid; amphibian; mussel; crustacean; snail; fish (Bour et al., 2015a; Garaud et al., 2016b; Hoecke et al., 2009; Tella et al., 2014; Zhang et al., 2012) and in seawater media through the use of urchins, amphipods and mussels (Ciacci et al., 2012; Conway et al., 2014; Dogra et al., 2016; Falugi et al., 2012). Considering this literature, results showed usually adverse effects on organisms such as the induction of reactive oxygen species (ROS) associated with cellular damage. Usually the investigations dealt with only one simple aquatic system (e.g. water compartment) and studies covering a salinity gradient are scarce. However, estuarine and coastal areas belong to the Earth's most important ecosystems for both ecologic and socio-economic issues (Martínez et al., 2007). Both are also considered as the final sink for many pollutants including engineered nanomaterials (Conway et al., 2014). Consequently, risk assessment of cerium nanoproductions and CeO₂-NMs in estuaries and coastal areas remain indispensable. To improve the comparison between international scientific communities, European Commission's Joint Research Centre (JRC) recommended to study physico-chemical behavior and toxicity of cerium oxide using a standardized nanomaterial NM-212. Moreover, precaution on physico-chemical properties of tested medium should be paid to assess the environmental risk (Hoecke et al., 2009) because they determine fate and behavior of metallic NPs, their speciation and bioavailability and, finally their toxicity. Consequently, acquired results under realistic environmental conditions would permit to develop environmentally friendly nanomaterials and nanoproductions in the future. In the issue of nanoproduction regulations, many studies focused on toxicity assessment of automotive fuel additive such as Envirox™ (Batley et al., 2013a; Cassee et al., 2012; Park et al., 2008; Zhang et al., 2013). This nanoproduction enhanced fuel combustion efficiency and reduced the emissions of soot issue of diesel engine during the catalytic combustion (Park et al., 2007). Literature indicate that in spite of dissolution of cerium from Envirox, the predicted no effect concentrations (PNEC) of cerium in freshwater condition staying in a range of mg/L will not be ample enough to induce a severe risk in aquatic ecosystem (Batley et al., 2013a).

In this context, estimation of fate, behavior and ecotoxicity of CeO₂-NMs (NM-212) and nanoproducts (Envirox™ before and after combustion) have been estimated across the fresh-marine continuum from 1.5 practical salinity unit (psu) to 30 psu.

Their ecotoxicity was determined using two euryhaline bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* representative of freshwater and estuarine environments respectively and exposed to as low as possible cumulative concentrations. These two endobenthic bivalves are well recognized as good models for biomonitoring purposes due to their ability to assimilate particles and contaminants directly from sediment and water column (Petridis et al., 2009; Sousa et al., 2008). Furthermore, CeNPs are largely aggregated promoting their deposition onto the surficial sediment (Falugi et al., 2012; Zhang et al., 2011). These filter-feeding species may be particularly exposed to CeO₂-NMs since they live at the water-sediment interface. *C. fluminea* generally lived to a depth of 2.5 cm into the sediment (Majdi et al., 2014) whereas *S. plana* burrows deeper, from 5 to 20 cm, into the sediment undergoing tidal cycles (Akberali, H.B. and Davenport, J., 1982). This approach on *C. fluminea* from freshwater to estuarine areas has been presented in part I of this companion article. The present article, part II enlarged the continuum to marine water using *S. plana*. For CeO₂-NMs ecotoxicological purposes, this study involving *S. plana* required the adjustment of the pocked-size mesocosm platform to estuarine/marine systems by miming the tidal rhythm. Organisms fed *ab libitum* by algae were exposed to a salinity gradient from 30 psu to 15 psu in indoor mesocosm. The experiment was carried out during one month with multiple dosing design corresponding to eleven injections of nanoproducts in order to reach a final concentration of 1 mg Ce/L. Injections have been distributed during the whole exposure period to mimic chronic release of CeO₂-NMs (Figure 1).

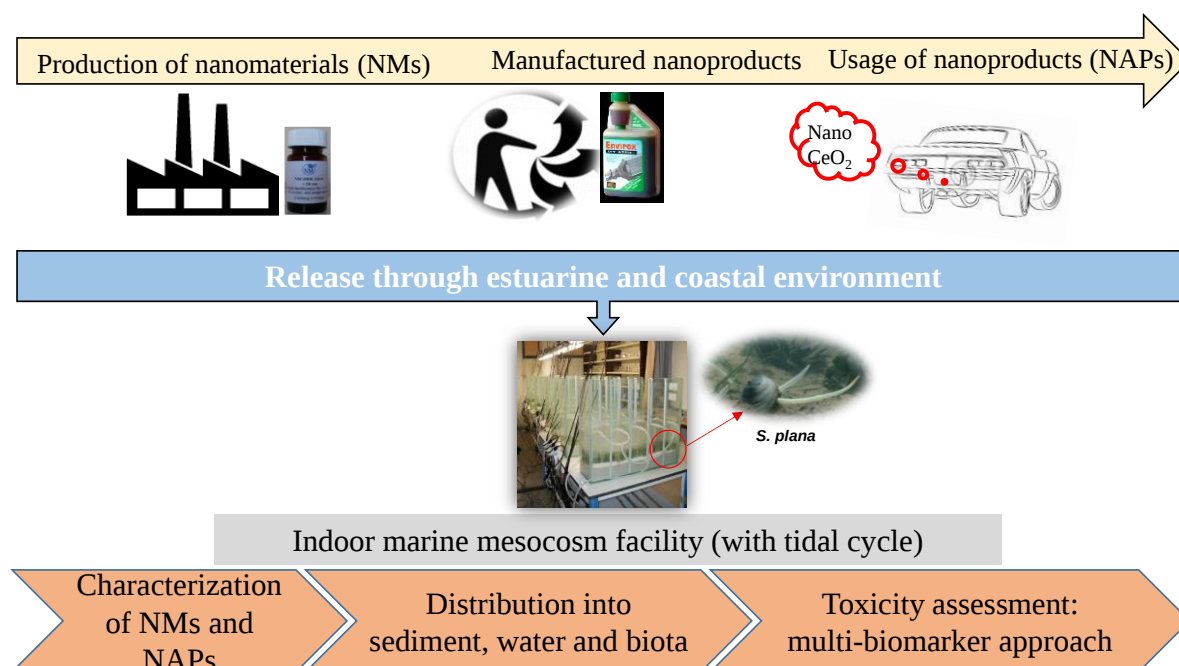


Figure 1: Flowchart of exposure design of *Scrobicularia plana* to Ce nanoproducts

Moreover, possible increase of concentrations into the environment combined with their increased use can be expected (Batley et al., 2013a). This experimental design was an adjustment between measurement ability into a complex environment and long exposure period (one month).

This long exposure time was also conducted by Colman et al. (2014). Measurements of total Ce concentrations have been determined into the water column, sediment and biota. Results were expressed using mass balance to monitor metal partitioning in the different compartments of the experimental system at each tested salinity (15 psu and 30 psu). Quantities of Ce labile forms have been also assessed into water column using Diffusive Gradient in Thin film (DGT) tools. Toxicity responses towards *S. plana* were evaluated using a multi-marker approach at different levels of biological organization (sub-cellular, individual). Our first prediction was that the fate, behavior and toxicity impact on *S. plana* would depend on the stage of the life cycle of nanoparticle and nanomaterial. Our second prediction was that salinity variations would play an important role on the Ce speciation and consequently on its fate, behavior and ecotoxicity.

2. Materials and methods

2.1 Sampling and acclimatization of *S. plana*

Individuals of *S. plana* (15- 20 mm length) were hand-collected in January 2015 in the intertidal mudflat on the French Atlantic coast (1°59'04'80''W, 47°01'50.35''N, France) and transported in cool boxes to the laboratory. The physico-chemical parameters of the sampling site were: pH 7.9, temperature: 10°C, salinity: 27.1 psu. Then, bivalves were immediately placed into aerated artificial water (Tropic marin®) at 30 psu during 3 days in a temperature controlled room at 15°C. Bivalves were progressively acclimatized to hypo-saline condition (15 psu) by a 3-day step by step process as previously described by (Bertrand et al., 2016). Briefly, organisms were transferred to plastic tanks (50 L) at 30 psu to 20 psu during 3 days finally to 15 psu considered herein close to the limit of salinity tolerance of *S. plana*. A group of bivalves was kept in artificial water at the field salinity (30 psu).

2.2 Algae inoculum preparation

Tetraselmis suecica purchased by Teramer® (Saint Just, France) were cultured in a special growth medium precisely F/2 Medium (Guillard and Ryther, 1962). At the end of the exponential phase of growth, determinations of cell number were done using a Malassez counting chamber. Algal cells were concentrated from the culture medium by decantation and centrifugation, washed once with artificial seawater at the two tested salinities (30 and 15 psu) and suspended in a final volume allowing to obtain a concentration of 1×10^5 cells/mL. Water sampling has been carried out every 3 days during the exposure time (28d) to measure the evolution of algae in the medium.

2.3 Tested nanomaterials

Envirox™ was purchased from Energenics Europe Ltd. Ce element included in this nanoproduit is under CeO₂ form at the concentration of $26.7 \pm 0.8 \text{ g.L}^{-1}$.

The two different stages of commercialized Envirox™ were prepared and characterized by the CEREGE (UMR CNRS 7600 Aix en Provence, France). Briefly, Envirox™ suspension was centrifuged at 396 750xg during 1h at 20°C. Then, the pellet was lyophilized and named Envirox™. A part of the resulting lyophilized powder was introduced in an oven during 20 min at 850°C to simulate the car engine providing an aging Envirox™ product we named Combusted Envirox™. The particles of Envirox™ were spherical with a mean size measured by TEM of $7.6 \pm 1.2 \text{ nm}$, whereas Combusted Envirox had crystallite forms with a mean size of $19 \pm 10.4 \text{ nm}$.

Preparation of the suspension at a final concentration of 10 g/L has been carried out before each injection to work with a stable solution and to avoid progressively alteration of nanomaterial coating in the stock suspension. Before each use of CeO₂-NAPs suspension (Envirox™ and Combusted Envirox™), ultrasonic baths have been conducted to homogenate the solution during 5 minutes.

NM-212 defined as a Representative Manufactured Nanomaterials (RMN) (Ref: CeO₂-JRCNM02102a/ JRCNM02102a004014) was provided by the JRC. These nanoparticles measured by dynamic light scattering (DLS) are monodispersed in ultra-pure water with a mean size of $225.4 \pm 92.47 \text{ nm}$. A stock suspension was prepared every week during the whole exposure time (28d) to work with a stable suspension using powder of NM-212 to obtain a final concentration of 1g/L in 15 mL of ultra-pure water. Before each introduction of CeO₂-NMs into the mesocosm, ultrasonic probe for 20 s (at 90 % amplitude in ice tank) of the stock solution has been done as described by the guideline of (Singh et al., 2014).

2.4 Mesocosm setup

Each experimental unit was composed with two tanks (mesocosm and reserve tank), two pumps (Eheim compact 300 L/h) and a mechanical timer (IDK PMTF 16A) allowing to mimic the tidal cycle (6h of low tide, 6h of high tide, two tides/day) (Figure 2).

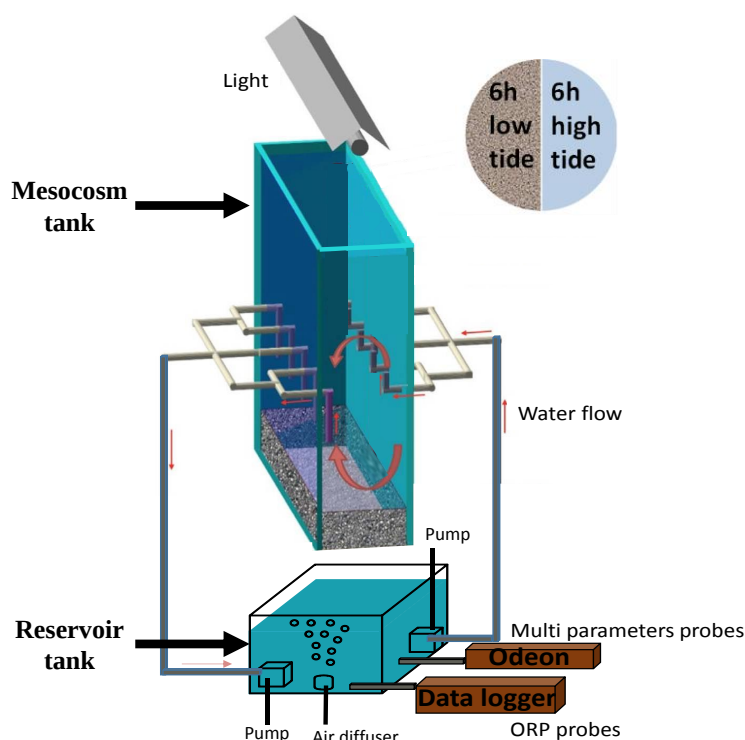


Figure 2: Experimental marine mesocosm developed with tidal cycle.

The mesocosm tank (750 x 200 x 600 mm) was filled with 14 kg of synthetic sediment (90 % sand- 9 % kaolin- 1 % CaCO_3) adapted from OECD guideline (OECD, 2004) and flooded with 35 L of artificial water (mixture of ultra-pure water and sea salt Tropic MarinTM (Tropicarium Buchschlag Dreieich, Germany) at each salinity tested (30 and 15 psu). The reserve tank (700 x 500 x 37 mm) was placed under the mesocosm tank to collect removed water during low tide. Reservoir tank was always filled with a minimum of 25 L of artificial water (at each tested salinity) to constantly maintain the measuring probe into water. The water in this tank was all the time aerated by an air diffuser. This approach based on synthetic sediment and artificial water was provided to obtain replicable medium between all experiments (Auffan et al., 2014b). Physico-chemical parameters including temperature ($^{\circ}\text{C}$), salinity (psu), pH, redox potential (mV), dissolved oxygen ($\text{mg O}_2/\text{L}$) were monitored every 15 min into the water column from the reserve tank during the whole experimental time (28 days). Two groups of four experimental units have been established to assess salinity effect a group at 30 psu, which is the salinity experienced by bivalves in the field and a second group at 15 psu defined as hypo-saline condition. Mesocosm setup including injections scheduling and experimental design is presented in Figure 3.

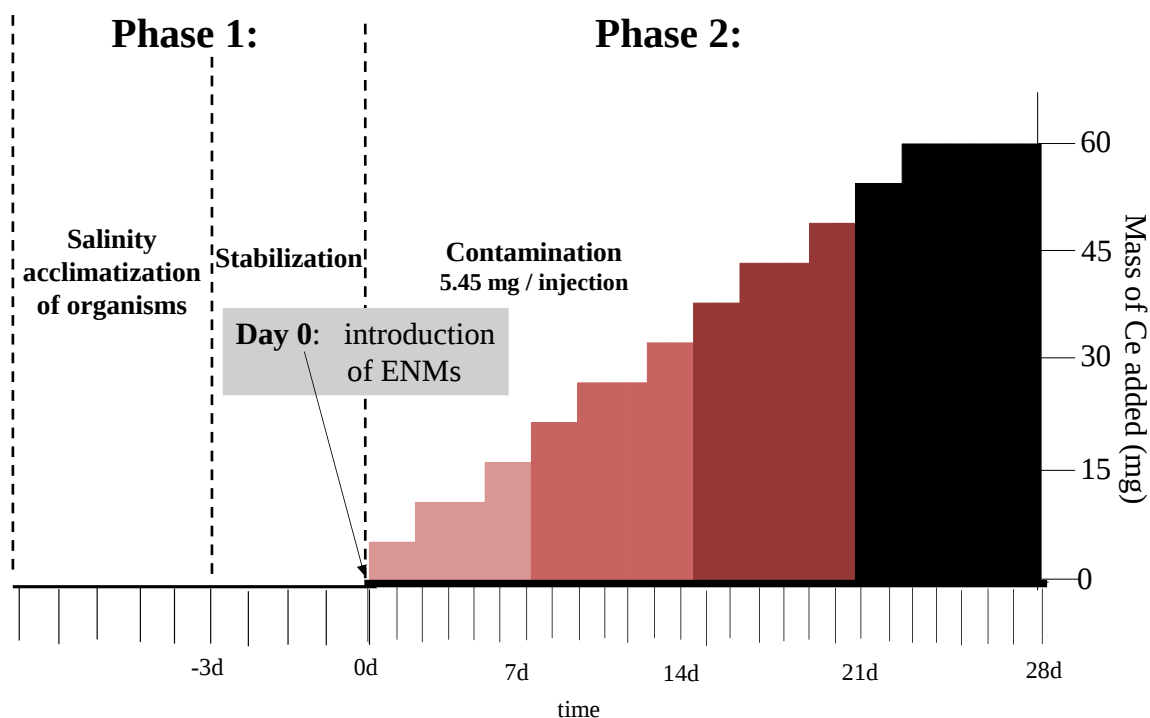


Figure 3: Marine mesocosm setup, phase 1 indicates two steps including acclimatization to hypo-saline condition and stabilization phase of organisms into the mesocosm for the four treatments (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212). Phase 2 shows the multiple dosing of Ce into the contaminated mesocosms (except control) (colors indicates the increased of contamination with the time).

Briefly, after the acclimatization period of organisms to each salinity (30 or 15 psu), bivalves were exposed into mesocosm units ($n = 96$ per mesocosm). The period required to stabilize mesocosm unit was of three days (photoperiod: 16:8, temperature: 14.6°C, oxygen saturation: 10.36 mg O₂/L, pH: 8.3, redox potential: 196.5 mV). Then, algae preparation was inoculated in each mesocosm unit giving a final concentration of 1×10^5 cells/mL and constantly maintained at this concentration during the whole experimentation. Eleven injections of 5.45 mg CeO₂ under three different states of CeO₂-NAPs (Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) at each salinity tested have been done into the mesocosm water column to obtain a final CeO₂ quantity of 60 mg corresponding to 1mg CeO₂-NMs /L after 28 days of exposure (Figure 3). For each salinity tested, one mesocosm units, was uncontaminated by CeO₂-NMs and defined as Control.

2.5 Characterization of exposure media

Total Ce concentrations have been quantified in exposure mesocosms in order to determine the distribution into the different compartments (water column, surficial sediment and biota) for each treatment (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) at each salinity tested (30 and 15 psu) at 7, 14, 21 and 28 days of exposure. First, water column measurements were done after sampling of 5 mL (n=3) of the first 10 centimeter of water layer in the reservoir tank; this sample was stabilized with 2 % of HNO₃ w/w and analyzed using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; NexION 300x-PerkinElmer); results were expressed in µg Ce/ L. Second, surficial sediment samples (5 x 5 x 1 cm) were digested using a triacid mix (5 mL HNO₃, 5 mL HF and 2 mL HClO₄) and measured by ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies France) at 7, 14, 21 and 28 days of exposure. Results were expressed in mg Ce/ kg. Estimation of released Ce ions from CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs has been assessed (n=3 per condition) using passive samplers DGT purchased from DGT Research Ltd. (Lancaster, U.K.). At the beginning of the experiment, 3 DGT units have also been deployed during few minutes in the atmosphere room, where the eight mesocosms were located. It allowed the determination of the background of cerium in DGT units and the potential contamination during the deployment, before they reached the mesocosm; these corresponding results were considered as blanks. After being removed from the water column, DGT units were washed with MilliQ-water. Chelex resins were then placed in 1.5 mL of 1 M HNO₃ and left for more than 1 d, to remove Ce from the Chelex resin. Then, Ce quantifications in all extracts were performed by ICP-MS (NexION 300x-PerkinElmer). Ce masses accumulated by DGT units were calculated as described by Zhang and Davison (2001) and expressed in ng.

2.6 Cerium quantifications in bivalves

After 7, 14, 21 and 28 days of exposure, the digestive glands of bivalves (n=6 per condition) were dissected and placed in oven (45°C) during 48h. After dry weight determination, digestive glands were digested with HNO₃ (32,5 %) in oven (65°C) during 48h to release total Ce contained in the tissues. ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies France) quantifications of Ce into homogenate were expressed in µg Ce/ g dry weight.

2.7 Ecotoxicity effects on *S. plana*

2.7.1 Biomarker approach

Biochemical markers have been measured using an automated chemistry analyzer Konelab 20 XTi (Thermo Scientific) as described by (Garaud et al., 2016b) and (Bertrand et al., 2016).

A battery of biomarkers has been employed including antioxidant and antitoxic defenses (catalase: CAT, glutathione-S-transferase: GST, glutathione peroxidase: GPx, total antioxidant capacity: TAC, acid phosphatase: ACP), cellular and apoptosis damage (lipid hydroperoxydes: LOOH and caspase-3: CSP-3) and structural and energetic parameters (triglyceride: Trigly, electron transport system: ETS, lactate deshydrogenase: LDH). All these measurements were carried out in the digestive gland of individual clams (n=6 per condition) after 7, 14, 21 and 28 days of exposure under each treatment (Control, Envirox™, Combusted Envirox™, NM-212), at each tested salinity (30 and 15 psu).

2.7.2 Behavioral experiments

After 7, 14, 21 and 28 days of exposure, burrowing tests were conducted on bivalves as previously fully described by (Bertrand et al., 2016). Briefly, artificial water at each salinity tested (30 and 15 psu) have been used to homogenize artificial sediment one day before experimentation. At each sampling time, 12 organisms of each experimental group (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) were placed at the interface of water column and sediment. Number of burrowed organisms has been determined every 5 minutes during the first hour, every 10 minutes during the second hour and finally every 20 minutes during the last hour.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses have been conducted using R (R Core Team, 2014). Homoscedasticity and normality have been assessed by Levene and Shapiro-tests respectively. When both conditions were satisfied, Student-tests have been conducted to assess treatment and salinity effects considering only significant results with threshold of $p < 0.05$. When one condition was not satisfied, raw data were log-transformed and statistical differences were tested again. Burrowing kinetics of individuals over time have been determined using generalized nonlinear model based on raw burrowing data described in details by (Buffet et al., 2014a). The evaluation of the impact of dependent variables (exposure conditions including treatments and salinity conditions considered either individually or combined) on pattern responses of independent variables (biomarker responses) have been conducted using Manova test. At each sampling time (7, 14, 21 and 28 days), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed using the whole set of biomarker data obtained for each treatment and tested salinity to determine the better combinations of biomarker responses to separate each group. Biomarker selection was based on variables important in the projection (VIP), having threshold greater than 1.

3. Results

3.1 Abiotic factor monitoring

Monitoring of physico-chemical parameters including in the set: pH, redox potential, salinity dissolved oxygen and temperature, during the whole experiment duration (28 d) has been summarized in Figure S1. All the physico-chemical parameters measured remained stable during the whole experiment (at 30 psu: pH: 8.02 ± 0.04 ; salinity: 29.65 ± 0.78 psu; redox potential: 190.29 ± 1.45 mV, temperature: 14.79 ± 0.05 °C, oxygen saturation: 10.49 ± 0.09 mg O₂ / L and at 15 psu: pH: 8.09 ± 0.11 ; salinity: 15.70 ± 0.30 psu; redox potential: 204.61 ± 0.97 mV, temperature: 14.46 ± 0.03 °C, oxygen saturation: 10.29 ± 0.05 mg O₂ / L).

3.2 Ce distribution in the different compartments

3.2.1 Mass balance

Total Ce concentrations have been quantified into the water column, surficial sediment and biota (the digestive gland of clams) and illustrated using mass balance to estimate the partitioning of cerium into each experimental mesocosm unit. At the different times of exposure (7, 14, 21 and 28 d), sums of total Ce measured into the different compartments relative to Ce injected have been reported in percentage units from controls in the Figures 4.

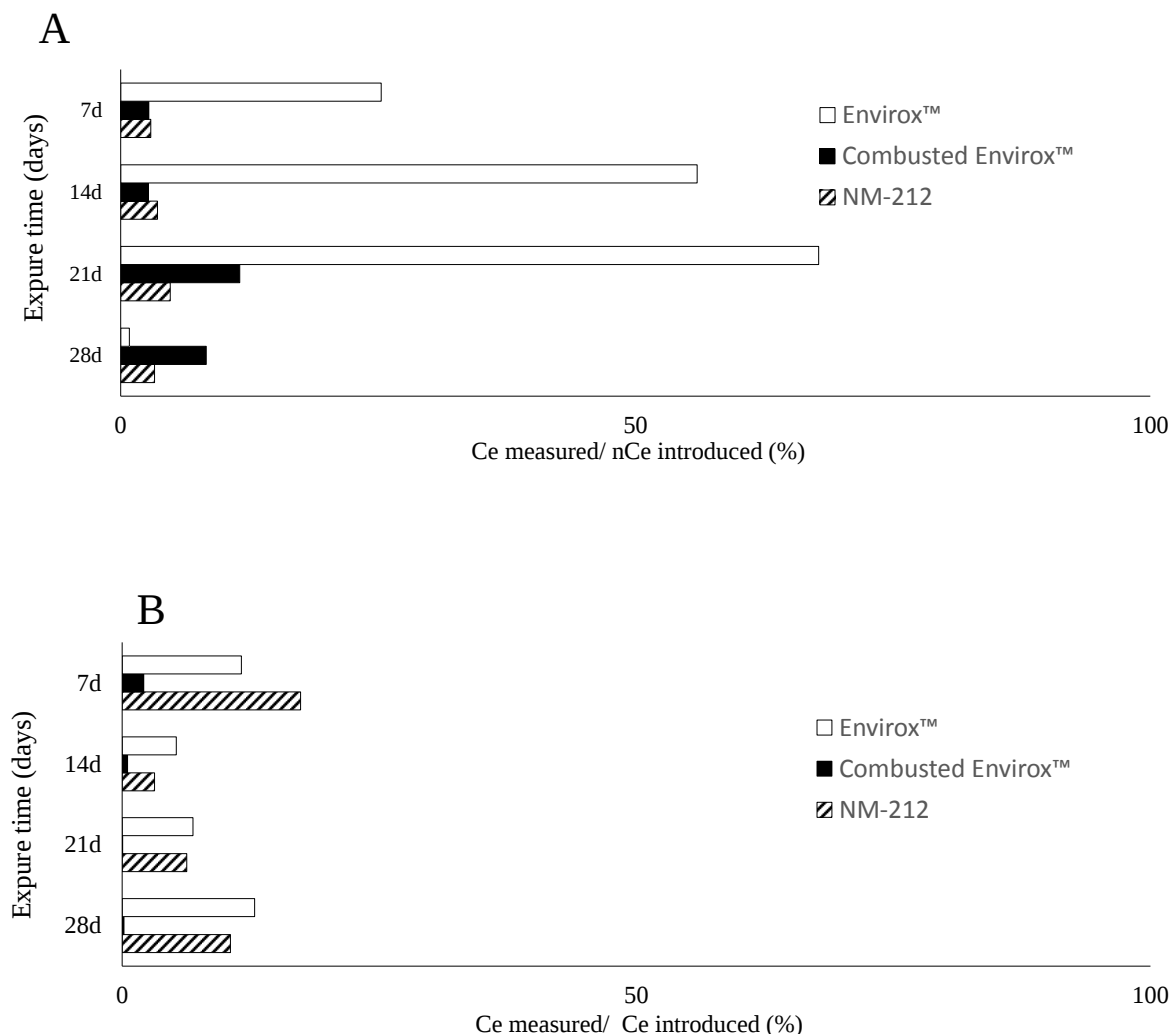


Figure 4: Ce content in the mesocosms as the sums of Ce measured in water column, sediment and digestive glands of *S. plana* after 7, 14, 21 and 28 days of exposure at 30 psu (A) and 15 psu (B). Data were corrected from background concentrations considered as the concentration found in control mesocosm.

At 30 psu (Figure 4-A) constant increase of Ce mass measured after exposure to Envirox™ has been detected compared to the total Ce mass injected after 7, 14 and 21 days of exposure. Ce was mainly found into the surficial sediment (7d: 78.46 %; 14d: 71 %; 21d: 64 %). At the end of the whole exposure duration (28 d), less than 1 % of the total injected Ce has been measured into the mesocosm unit and was mainly found into the water compartment (99 %). Low Ce mass (approximately <5 % of injected mass) has been measured in the mesocosm for Combusted Envirox™ or NM-212 conditions during the whole exposure.

At 15 psu (Figure 4-B), low Ce mass (< 18 %) has been measured into the mesocosms after exposure to Envirox™, Combusted Envirox™ or NM-212 and was mainly recovered into the water column during the whole exposure time.

3.2.2 Determination of Ce labile into exposure media by DGT units

After 14, 21 and 28 days at 30 psu (Figure 5-A), significant greater concentrations of labile Ce have been observed after exposure to Envirox™ compared to Control. After 21 and 28 days, significant greater labile Ce concentrations have been measured after exposure to NM-212 compared to Control.

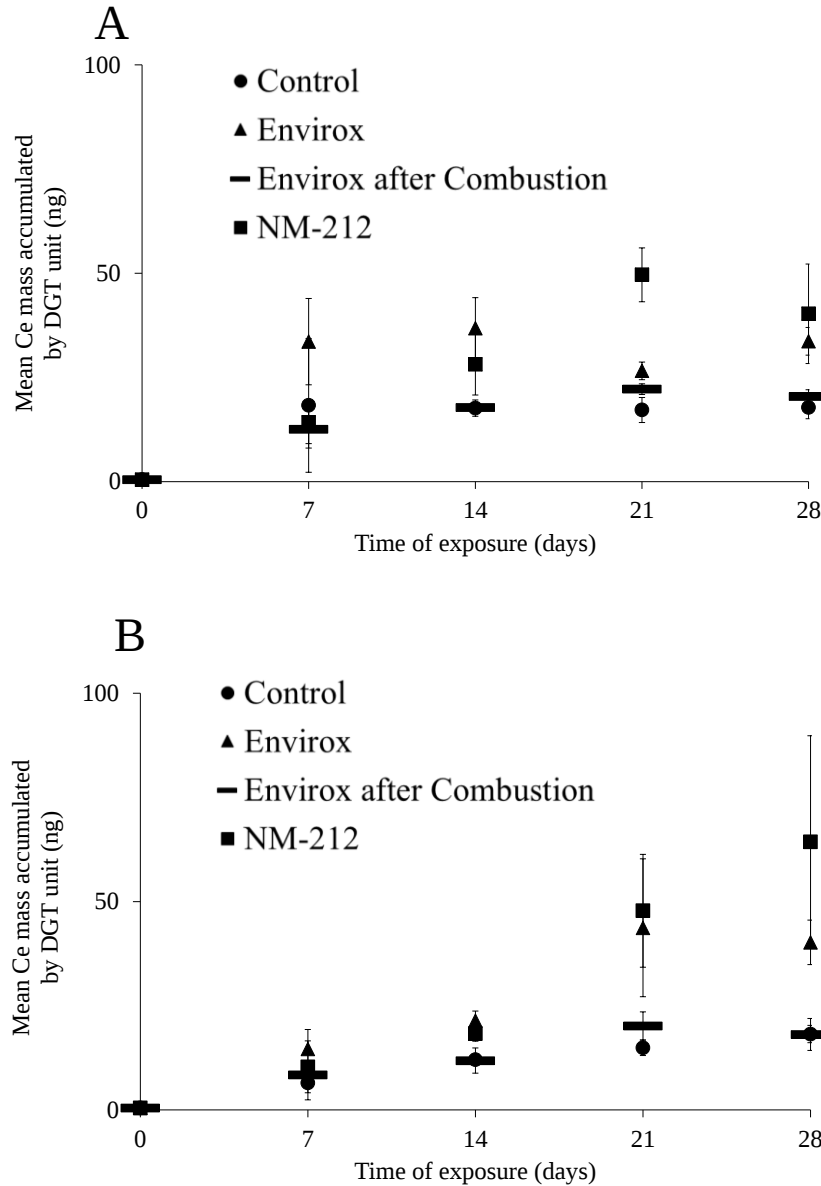


Figure 5: Mean masses and standard deviations of Ce (ng) accumulated by DGT units (n=3 per treatment) during the time of exposure (A) at 30 psu and (B) at 15 psu.

At 15 psu, similar results were observed with significant greater Ce labile forms measured in DGT units exposed to Envirox™ and NM-212 compared to Control after 14, 21 and 28 days (Figure 5-B).

3.2.3 Bioaccumulation into digestive glands of organisms

After 7, 14, 21 and 28 d of exposure, total Ce concentrations in the digestive glands of bivalves (*S. plana*) exposed to the different conditions at 30 and 15 psu are illustrated in Figures 6.

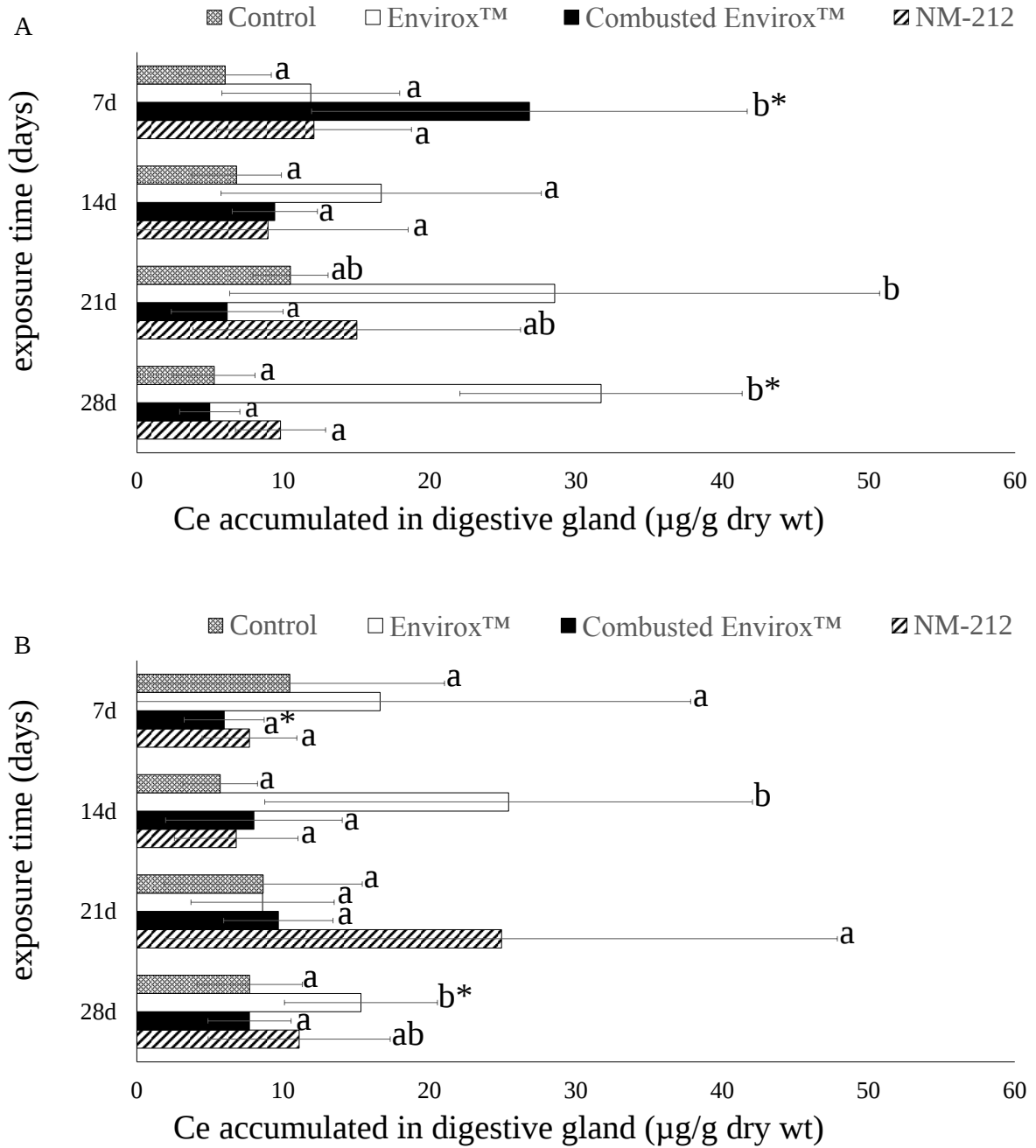


Figure 6: Cerium bioaccumulation (mean and standard deviation) in the digestive glands of *S. plana* (n=6) after 7, 14, 21 and 28 days of exposure in mesocosms to four experimental treatments (Control, Envirox™, Combusted Envirox™, NM-212) at 30 psu (A) and 15 psu (B). Significant differences between the exposure treatments were expressed with lowercase. Asterisk (*) indicated significant differences between salinities (30 psu (A) vs 15 psu (B)) for each exposure treatment.

At 30 psu (Figure 6-A), after 7 and 28 days, significant greater uptake has been observed after exposure to Envirox™ compared to Control. After 7 d, significant greater uptake has been observed after exposure to Combusted Envirox™ compared to Control.

At 15 psu (Figure 6-B), after 14 and 28 d of exposure, significant greater uptake has been observed after exposure to Envirox™ compared to Control. Comparing both salinities tested (15 psu, 30 psu), significant greater Ce accumulation has been measured after exposure to Combusted Envirox™ and Envirox™ at 7 and 28 d respectively under salinity experienced in the field (30 psu) compared with hypo-saline condition (15 psu).

3.3 Biomarker responses

Biomarker responses are reported in details in Table S1 in Supplementary Data section. Global analysis including Manova analysis and PLS-DA is summarized in Table 1 (left part). Table 1: Statistical analyses on biomarker responses with Manova and PLS-DA. Manova results were expressed using *p*-value (*p*) of different conditions (salinity, treatments and interactions). After PLS-DA analysis, important biomarkers were selected when the Variable Importance in the Projection (VIP) values was higher than 1. Pairwise comparisons have been conducted using Hotelling T² and *p*-value were listed in the table. Significant differences between conditions were indicated by shadow cells. (CSP-3: Caspase 3; Trigly= Triglyceride; LDH= Lactate deshydrogenase; TAC= Total antioxidante capacity; GST= Glutathion-S-transferase; ETS= Electron transport system; LOOH= lipid hyperoxide).

Global Analysis		Pairwise Comparison : Hotelling T ²							
		Control				Envirox™			
		30 psu	15 psu	30 psu	15 psu	30 psu	15 psu	Combusted Envirox™ 30 psu	NM212 30 psu
7 d	Manova								
	Salinity	Control 15 psu	0.07						
	Treatments	Envirox™ 30 psu	0.51						
	Salinity * Treatments	Envirox™ 15 psu		0.90		0.41			
		Combusted Envirox™ 30 psu	0.78			0.41			
14 d	Manova								
	Salinity	Control 15 psu	0.02						
	Treatments	Envirox™ 30 psu	0.20						
	Salinity * Treatments	Envirox™ 15 psu		0.70		0.02			
		Combusted Envirox™ 30 psu	0.02			0.01			
21 d	Manova								
	Salinity	Control 15 psu	<0.01						
	Treatments	Envirox™ 30 psu	0.04						
	Salinity * Treatments	Envirox™ 15 psu		0.04		0.49			
		Combusted Envirox™ 30 psu	0.50			0.05			
28 d	Manova								
	Salinity	Control 15 psu	0.39						
	Treatments	Envirox™ 30 psu	0.16						
	Salinity * Treatments	Envirox™ 15 psu		0.80		0.11			
		Combusted Envirox™ 30 psu	0.02			0.13			
		Combusted Envirox™ 15 psu		0.62		0.79		0.02	
		NM-212 30 psu	0.62			0.16		0.11	
		NM-212 15 psu		0.13		0.16		0.11	0.80

Manova analysis, conducted on the whole data set at every sampling time, showed significant modifications of the biomarker responses according to salinity whatever the exposure time. Treatment effects observed by Manova have been highlighted only after 14 and 21 days of exposure whereas interaction of salinity and treatment condition have been observed at 21 and 28 d. Statistical results of PLS-DA done at each sampling time have permitted to select the most important biomarkers (VIP>1) useful to discriminate the different experimental groups. Furthermore, the increase of VIP included in PLS-DA model from 3 to 5 between 7 and 28 days of exposure showed the need of a higher number of biological indicators to differentiate the eight experimental groups. After 7 days, mechanisms of responses involved to distinguish the exposure groups were CSP-3, TAC and ETS activities but no significant differences have been observed. After 14 days of exposure, VIP were the same but also coupled with Trigly content. At this sampling date, projections of the experimental groups under the different treatments at both salinities tested are illustrated on Figure 7.

.....Control 30 psuEnvirox™ 30 psuCombusted Envirox™ 30 psuNM-212 30 psu
 —Control 15 psu —Envirox™ 15 psu —Combusted Envirox™ 15 psu —NM-212 15 psu

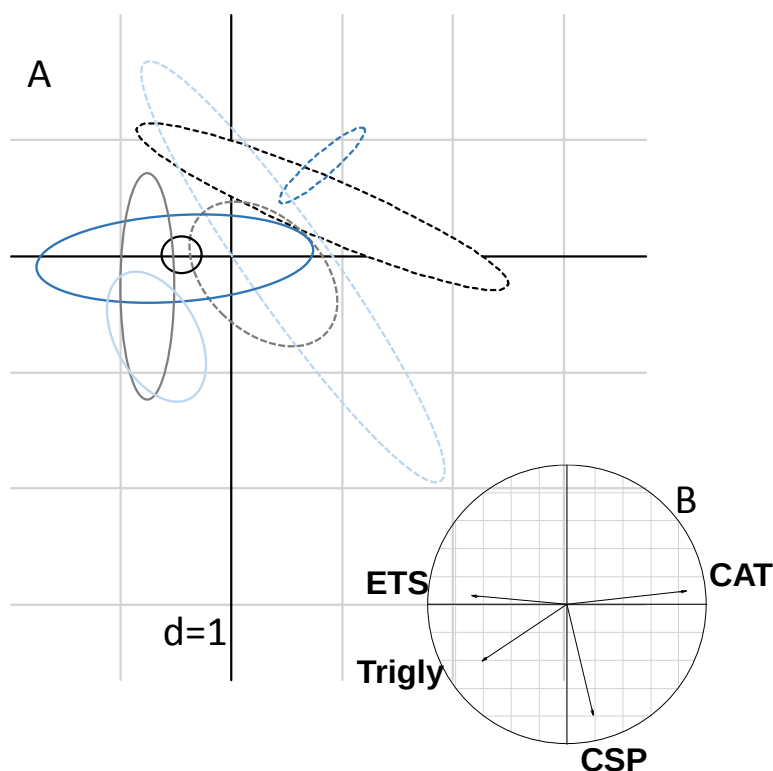


Figure 7: Partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) of the biomarker responses in *Scrobicularia plana* exposed to the four treatments (Control; Envirox™; Combusted Envirox™; NM-212) under the two salinities tested (30 and 15 psu) during 14 days showing the projections of experimental groups and the correlation circle of biomarkers.

Pairwise comparisons in Table 1 (right part) highlighted increase of significant differences between experimental groups according to salinity and treatment conditions. Significant greater salinity effects have been observed in Control, Envirox™ (before and after combustion) and NM-212 exposed organisms at 30 psu compared to 15 psu. At 30 psu (14 d), treatment effects have been observed after exposure to NM-212 compared to Control and Envirox™ conditions; whereas at 15 psu, organisms exposed to Combusted Envirox™ and NM-212 were significantly different compared to Control and Envirox™.

After 21 days of exposure, the battery of biomarkers including CSP-3, LDH, CAT and LOOH activities permitted to highlight significant differences between treatments and salinity. After 21 d, experimental groups exposed to Envirox at both salinities tested and NM-212 at 15 psu were significantly different compared to their respective Controls. After 28 d of exposure, the biomarker suite permitted to create the model which was composed of CSP-3, ACP, GST ETS and TAC activities. Exposed bivalves to Combusted Envirox™ at 30 psu were significantly different from Control at 30 psu and Combusted Envirox™ ones at 15 psu, illustrating treatment and salinity effects respectively. At the end of the exposure period, although the remained high number of VIP need to build the model, the individual differences between the experimental groups decreased perhaps indicating transitory effects or adaptative porcessus.

3.4 Behavioral responses

Burrowing kinetics are reported in Figures 8. After 7d of exposure, Control *S. plana* (Figure 8-A) exhibited the most rapid burrowing kinetic compared to Envirox™ and NM-212. Burrowing kinetic of individuals exposed to Combusted Envirox™ at 15 psu was significantly decreased compared to the Control condition. After 14 days of exposure, control *S. plana* (Figure 8-B) showed a significant faster burrowing kinetic compared to Envirox™ whereas an inverse pattern was observed in NM-212 organisms compared to Control. At 15 psu, organisms exposed to Combusted Envirox™ and NM-212 showed a significant faster burrowing kinetic compared to Control.

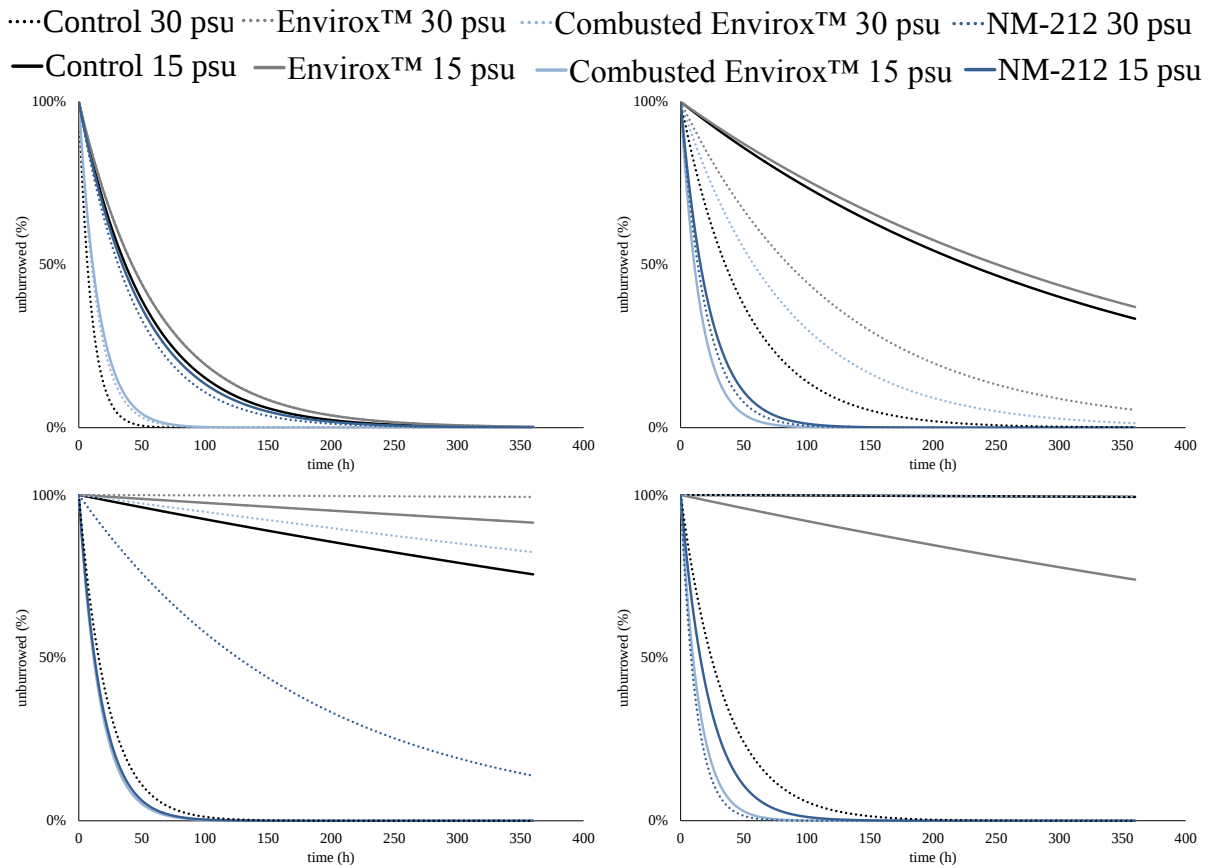


Figure 8: Burrowing kinetics (unburrowed individuals over the time) for *S. plana* after 7 days (A), 14 days (B), 21 days (C) and 28 days (D) of exposure to different treatments (Control, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) at two salinities (30 and 15 psu).

After 21 days of exposure, Control *S. plana* (Figure 8-C) showed significant faster burrowing kinetic compared to Envirox™ and Combusted Envirox™. At 15 psu, Combusted Envirox™ and NM-212 organisms showed significant faster burrowing kinetic compared to Control. At the end of the experiment (28 days) (Figure 8-D), Control *S. plana* have a burrowing kinetic significantly more rapid compared to Envirox™ and Combusted Envirox™, whereas NM-212 *S. plana* have a significantly most rapid burrowing kinetic compared to Control condition. At 30 psu, organisms exposed to all treatments showed a significantly more rapid burrowing kinetic compared to Control. It must be duly noted that after exposure to Control condition whatever the exposure duration, significant faster burrowing kinetic has been observed at the field salinity (30 psu) compared to the hypo-saline condition (15 psu). Same trends have been observed after exposure to Envirox™ and Combusted Envirox™ (14d) and NM-212 (21d) whereas inverse patterns have been observed after 21 and 28d of exposure to Envirox™ and Combusted Envirox™.

4. Discussion

To the best of our knowledge and according to the consulted literature data base, the present study focuses for the first time on assessment of (i) fate and behavior of pristine and ageing cerium oxide nanoparticle (Envirox™ before and after combustion) and of the standardized nanomaterial NM-212 under indoor marine mesocosm exposure conditions using low additional chronic concentrations during a mid-term exposure (1 month) and characterized by salinity variations (estuarine and coastal area conditions) and (ii) ecotoxicological sublethal effects on a estuarine and euryhaline endobenthic bivalve *S. plana*.

4.1 Methodology adaptation of mesocosm for estuarine endobenthic species

The experimental design has been previously developed for freshwater endobenthic organisms (*C. fluminea*) (part I) and methodology modifications have been made to integrate tidal cycle for *S. plana*. Indeed, ecological importance of tidal rhythm is obvious and provides adaptive responses for many marine organisms living in the inter-tidal zone (Chandrashekar and Sharma, 2008). In the registration context, these experimental conditions close to realistic environmental conditions (low additional chronic concentration, salinity gradient and tidal cycle) have been developed to allow a better understanding of their impact on the fate, behavior and organism effect of CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs. During the whole acclimatization period, no mortality of *S. plana* have been observed indicating that mesocosm unit included suitable ecological conditions for maintaining them under laboratory. Moreover, physico-chemical parameters remained stable during the experiment (28d) allowing us to confirm the replicability of mesocosm units.

Independently from the contamination exposure, salinity effects have been measured for Control organisms for biochemical and behavioral responses. At 14d and 21 d of exposure, Control organisms exposed to the hypo-saline condition (15 psu) showed an increase of ETS and CSP-3 activities respectively compared to field salinity. ETS activity is assessed to determine the potential respiratory capacity of the organisms (Fanslow et al., 2001) while CSP-3 activity highlighted cellular death process (Risso-de-Faverney et al., 2001). In the same time, faster burrowing kinetic was observed at the field salinity compared to the hypo-saline condition at 14 and 21 d. Moreover, no movement of siphon or feet have been directly observed during the 6h burrowing test under hypo-saline condition. These responses indicated that prolonged exposure (14-21 d) of euryhaline organisms to hypo-saline condition induced physiological perturbations in Control. Nevertheless, after 28 d of exposure, no more perturbation has been observed. Our results are in agreement with those of Tella et al. (2014) who observed also a transitory oxidative stress in *Planorbis corneus* after 3 week exposure to bare CeO₂. The transitory responses observed in our study could be assimilated to an adaptive response limiting perturbation and allowing homeostasis restoration.

4.2 Fate and behavior of Envirox™ in mesocosms and effects on *S. plana*

Regarding the mass balance, very low total Ce recovery has been measured especially at 15 psu. The pristine and ageing Envirox™ have been measured at surficial sediment whereas a non-negligible part of Ce has been measured in water column. Endobenthic organisms may modified the fluxes between water and sediment through their bioturbation activity (Mermillod-Blondin and Rosenberg, 2006) but also due to the sampling design done during this experiment. Considering the tidal cycle, surficial sediment have been sampled after obtained the low tide in the mesocosm tank while at the same time, water column has been collected into the reservoir tank at each sampling time (7, 14, 21 and 28d). Sediment leaching induced by the low tide mechanisms has led to suspend Ce into the water column. Moreover, water sampling were carried out on 10 centimeters depth of the water column, Ce can be expected into the bottom of the reserve tank used to reproduce tidal cycle. Compromise between the tidal cycle time and accessibility of mesocosm should be done to amplify the total Ce recovery of experiment unit.

At both salinities tested (15 and 30 psu), the recovery of Ce was greater after exposure to pristine Envirox™ compared to Combusted form. Moreover, release of Ce labile forms were more observed after exposure to Envirox™ compared to Combusted Envirox™. Degradation of the surfactant following Envirox™ combustion (850°C) reduced Ce dispersion and stability conducting probably to increase (homo and hetero) aggregation and deposition at the surficial sediment of mesocosm in comparison to Envirox™ (Batley et al., 2013a).

Several studies showed a very low dissolution of CeO₂-NMs (Montes et al., 2012; Tella et al., 2014). As indicated by Schwabe et al. (2015), cerium dissolution depends on the ratio of Ce³⁺/Ce⁴⁺ at the surface of CeO₂-NMs. Moreover, Dahle and Arai, (2015) studied environmental geochemistry of cerium and observed that Ce³⁺ has a tendency to bond hardly and rapidly with phosphate and hydroxyl compounds. Nevertheless, for Envirox™ and Combusted Envirox™, no Ce³⁺ has been measured and dissolved Ce measured was only observed under Ce⁴⁺ form (Auffan et al, unpublished data).

Due to the greater availability of Ce labile forms after exposure to Envirox™ whatever tested salinities, Ce uptake by organisms increased under this same condition whereas significant uptake of Ce by organisms has been only observed at 30 psu (7d) after exposure to Combusted Envirox™. Under mesocosm conditions, bioaccumulation of Ce still stable whereas chronic doses of Ce have been injected during the month of exposure. After exposure to CeO₂-NMs (231 ± 16 nm), Ce bioaccumulation in the whole soft tissues of *Mytilus galloprovincialis* has been observed as a function of exposure concentrations (1, 2.5, 5 and 10 mg/L) under seawater condition (Montes et al., 2012). This bioaccumulation responses have been observed after exposure to higher concentration than under mesocosms conditions (11 injections of 90.9 µg/L; CeO₂ final concentration 1 mg/L).

Salinity impacts have been observed after 14 days of exposure to pristine and at each sampled time of ageing Envirox™. After 14 days of exposure to Envirox™, significant greater ETS activity and Trigly contents have been measured at hypo-saline condition compared to the field salinity.

Assessment of ETS activity informs on the potential respiratory capacity of organisms (Fanslow et al., 2001) while Trigly contents is classified as the main lipid storage into the digestive gland in marine organisms (Pernet et al., 2007). In the same time, significant faster burrowing kinetic has been observed after exposure to field salinity (30 psu) compared to hypo-saline (15 psu) condition. After exposure to Combusted Envirox™, increase of CSP-3 and ETS activities and significant faster burrowing kinetics have been observed at 15 psu compared to the field salinity. CSP-3 activity is defined as central mediator in apoptosis mechanisms (Risso-de-Faverney et al., 2001). Silimar increase of CSP-3 activity has been also measured by (Rice et al., 2015) after exposure of rat lung cells to CeO₂-NMs during 28 days. Modification of ETS as ATP consumer can be an indirect process allowing caspase activation and apoptosis mechanism (Desagher and Martinou, 2000).

Antioxidant defences (CAT) and damage (CSP-3) have been activated and behavioral impact have been observed at both tested salinities after 21 days of exposure to Envirox™ in comparison to Control. Conversely, at hypo-saline condition (14d) and field salinity (28d) exposure, Combusted Envirox showed a greater Triglycerids contents compared to Control condition whereas Control showed a greater ETS activity compared to Combusted Envirox™. This pathologic modification of Triglycerid correspond to steatohepatitis (Vilgrain et al., 2013) already observed in other bivalves exposed to different metals (Guerlet et al., 2007), but this hypothesis, needs to be validated by imagining analyses of digestive glands after exposure to Combusted Envirox™. Nevertheless, organisms exposed to Combusted Envirox buried significantly rapidly than Control; may be as an avoidance mechanisms as described by (Amiard-Triquet, 2009).

At both salinities tested, biochemical and behavioral measurements showed significant differences between both states of CeO₂-NAPs forms only at 14 days. Organisms exposed to Combusted Envirox™ showed a significant increase of CSP-3 activity and Triglycerid content at 30 and 15 psu respectively in comparison with Envirox™ while after the hypo-saline condition, a faster burrowing kinetic has been observed after exposure to Combusted Envirox™ compared to pristine form.

4.3 Fate and behavior of NM-212 in mesocosms and effects on *S. plana*

After exposure to the standardized Ce nanomaterial NM-212, low Ce concentrations was measured in experiment units (< 5 %). As previously observed for both Envirox™ forms, different aspects such as bioturbation activity by endobenthic organisms, sampling after low tide or at the surficial water and sediment compartment may induced bias on the Ce mass balance. Consequently, particular interest on the sampling design should be done to improve the total Ce recovery. Determination of labile Ce showed a greater ion release from standardized nanomaterial whatever the time and salinity tested compared to the Combusted Envirox™ and Control conditions. Nevertheless, no Ce uptake has been observed after exposure to NM-212 compared to control. After 14 d of exposure, a salinity effect has been observed between the organisms exposed to NM-212 at 30 psu compared to those exposed at 15psu due to an increase of ETS activity without modification of the burrowing kinetic.

At 21 days of exposure, increase of the LDH activity has been observed at the field salinity compared to the hypo-saline condition whereas faster burrowing kinetic have been observed at the field salinity compared to 15 psu. Nevertheless, after 21 days of exposure at 15 psu activation of biomarker responses including CAT, LDH activities, LOOH damages and better significant burrowing kinetic have been observed after exposure to NM-212 compared to Control. Despite salinity and treatment effects, difficulties have been observed to depict biochemical or behavioral pattern depending on the duration of exposure or CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs tested.

In summary, for both Envirox™ forms (pristine and ageing) and NM-212, biochemical and behavioral impacts have been observed at 14 and 21 d, but no longer. Vale et al. (2014) studied effect of titanium dioxide nanoparticles on *Corbicula fluminea* and observed significant increased catalase activities after 3 d of exposure compared to control. After 8d, catalase activity has been restored and achieved the same level than control condition. This transient response may be due to adaptive responses towards stress involving other defense mechanisms or an expression of defense mechanisms overwhelmed. Increase of the battery of biomarkers including for example stress proteins or non-enzymatic antioxidant activities as flavonoids, vitamin E, reduced glutathione (Hermes-Lima et al., 1998) should be developed to help in the elucidation of the mechanisms of mode of action observed in the present study. Nevertheless, it should be indispensable to define a scale of time exposure suitable to the environmental risk assessment of CeO₂-NM and CeO₂-NAP.

5. Conclusion

In this study, fate and behavior of a Ce nanoparticle (pristine and ageing) and a standardized nanomaterial have been investigated using indoor marine mesocosm facility in presence of *S. plana*. Low Ce concentrations have been recovered but Envirox and NM-212 showed greater Ce release compared to the Combusted Envirox™ and Control conditions. Organisms 'uptake have been only observed after exposure to Envirox (before and after combustion). Impact of CeO₂-NMs and CeO₂-NAPs have been found with modification of biomarker response with an increase of the VIP from 3 to 5 biomarkers permitting to differentiate experimental groups. Activation of antioxidant defense and burrowing impairments at both salinities tested but no observed effects after 28d showed a transitory biomarker responses with a reduction of Ce impact. These responses highlighted the necessity to maintain test under a longer time period (several months) with multiple dosing at low concentration under mesocosm platform to improve the realistic approach of environmental risk assessment for nanomaterials.

Bibliography

Akberali, H.B., Davenport, J., 1982. The detection of salinity changes by the marine bivalve molluscs *Scrobicularia plana* (Da Costa) and *Mytilus edulis* L. J.Exp.Mar.Biol.Ecol 58, 59–71.

Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J. 15, 87–110. doi:10.1080/10807030802615543

Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., Rose, J., 2014a. Long-term aging of a CeO₂ based nanocomposite used for wood protection. Environ. Pollut. 188, 1–7. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.016

Auffan, M., Matson, C.W., Rose, J., Arnold, M., Proux, O., Fayard, B., Liu, W., Chaurand, P., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., Di Giulio, R.T., 2014b. Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. Nanotoxicology 8, 167–176. doi:10.3109/17435390.2013.869627

Batley, G.E., Halliburton, B., Kirby, J.K., Doolette, C.L., Navarro, D., McLaughlin, M.J., Veitch, C., 2013. Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel fuel catalyst: Characterization and risk of nano-CeO₂ as a diesel catalyst. Environ. Toxicol. Chem. 32, 1896–1905. doi:10.1002/etc.2246

Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. doi:10.1002/etc.3428

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Toxicity of CeO₂ nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. Nanotoxicology 1–11. doi:10.3109/17435390.2015.1053422

Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. Sci. Total Environ. 470-471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114

Cassee, F.R., Campbell, A., Boere, A.J.F., McLean, S.G., Duffin, R., Krystek, P., Gosens, I., Miller, M.R., 2012. The biological effects of subacute inhalation of diesel exhaust following addition of cerium oxide nanoparticles in atherosclerosis-prone mice. Environ. Res. 115, 1–10. doi:10.1016/j.envres.2012.03.004

Chandrashekar, M.K., Sharma, V.K., 2008. Tidal rhythms, in: Ultradian Rhythms from Molecules to Mind. Springer, pp. 201–226.

Ciacchi, C., Canonico, B., Bilaničová, D., Fabbri, R., Cortese, K., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., Canesi, L., 2012. Immunomodulation by Different Types of N-Oxides in the Hemocytes of the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis*. PLoS ONE 7, e36937. doi:10.1371/journal.pone.0036937

- Colman, B.P., Espinasse, B., Richardson, C.J., Matson, C.W., Lowry, G.V., Hunt, D.E., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S., 2014. Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5229–5236. doi:10.1021/es405454v
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1517–1524. doi:10.1021/es404549u
- Dahle, J., Arai, Y., 2015. Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 1253–1278. doi:10.3390/ijerph120201253
- Desagher, S., Martinou, J.-C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369–377.
- Dogra, Y., Arkill, K.P., Elgy, C., Stolpe, B., Lead, J., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2016. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress in the sediment-dwelling amphipod *Corophium volutator*. *Nanotoxicology* 10, 480–487. doi:10.3109/17435390.2015.1088587
- Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Mar. Environ. Res.* 76, 114–121. doi:10.1016/j.marenvres.2011.10.003
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–10. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Guillard, Ryther, 1962. F/2 medium.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120, 437–448.
- Hoecke, K.V., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., Schamphelaere, K.A.C.D., Elsaesser, A., Meeren, P.V. der, Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D., Rydzynski, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., Samber, B.D., Vincze, L., Janssen, C.R., 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4537–4546. doi:10.1021/es9002444
- Majdi, N., Bardon, L., Gilbert, F., 2014. Quantification of sediment reworking by the Asiatic clam *Corbicula fluminea* Müller, 1774. *Hydrobiologia* 732, 85–92. doi:10.1007/s10750-014-1849-x
- Martínez, M.L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P., Landgrave, R., 2007. The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecol. Econ.* 63, 254–272. doi:10.1016/j.ecolecon.2006.10.022
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., 2006. Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat. Sci.* 68, 434–442. doi:10.1007/s00027-006-0858-x

- Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J. Hazard. Mater.* 225-226, 139–145. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.009
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.-P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., Martin, P., 2008. Hazard and Risk Assessment of a Nanoparticulate Cerium Oxide-Based Diesel Fuel Additive—A Case Study. *Inhal. Toxicol.* 20, 547–566. doi:10.1080/08958370801915309
- Park, B., Martin, P., Harris, C., Guest, R., Whittingham, A., Jenkinson, P., Handley, J., 2007. Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of EnviroxTM – a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. Part. *Fibre Toxicol.* 4, 12. doi:10.1186/1743-8977-4-12
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J. Exp. Biol.* 210, 2999–3014. doi:10.1242/jeb.006007
- Petridis, P., Jha, A.N., Langston, W.J., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquat. Toxicol.* 94, 8–15. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.010
- Rice, K.M., Nalabotu, S.K., Manne, N.D.P.K., Kolli, M.B., Nandyala, G., Arvapalli, R., Ma, J.Y., Blough, E.R., 2015. Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs. *J. Prev. Med. Pub. Health* 48, 132–141. doi:10.3961/jpmph.15.006
- Risso-de-Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.-P., Rahmani, R., 2001. Toxic Effects of Wastewaters Collected at Upstream and Downstream Sites of a Purification Station in Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 129–141. doi:10.1007/s002440010230
- Schwabe, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., Quad, A. von, Nowack, B., 2015. Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂ -nanoparticles by three crop plants. *Metallomics* 7, 466–477. doi:10.1039/C4MT00343H
- Singh, C., Friedrichs, S., Ceccone, G., Gibson, N., Alstrup Jensen, K., Levin, M., Goenaga Infante, H., Carlander, D., Rasmussen, K., Institute for Health and Consumer Protection, 2014. Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, characterisation and test item preparation JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Publications Office, Luxembourg.
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 44, 85–94. doi:10.1051/limn:2008017
- Tella, M., Auffan Mélanie, Brousset Lenka, Issartel Julien, Kieffer Isabelle, Pailles Christine, Morel Elise, Santaella Catherine, Angeletti Bernard, Artells Ester, Rose Jérôme, Thiéry Alain, Bottero Jean-Yves, 2014. Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b
- Vale, G., Franco, C., Diniz, M.S., Santos, M.M.C. dos, Domingos, R.F., 2014. Bioavailability of cadmium and biochemical responses on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* – the role of TiO₂ nanoparticles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 109, 161–168. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.035

Vilgrain, V., Ronot, M., Abdel-Rehim, M., Zappa, M., Assignies, G. d', Bruno, O., Vullierme, M.-P., 2013. Hepatic steatosis: A major trap in liver imaging. *Diagn. Interv. Imaging* 94, 713–727. doi:10.1016/j.diii.2013.03.010

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO₂ Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3725–3730. doi:10.1021/es103309n

Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K.-B., Garfunkel, E., Schwander, S., Tetley, T.D., Chung, K.F., Porter, A.E., Ryan, M., Kipen, H., Liroy, P.J., Mainelis, G., 2013. Impacts of a Nanosized Ceria Additive on Diesel Engine Emissions of Particulate and Gaseous Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13077–13085. doi:10.1021/es402140u

Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y., Zhang, Z., 2012. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89, 530–535. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.044

Supplementary data

Table S1: Means $\pm$ standard deviations of biochemical biomarkers quantified in *S. plana* after 7, 14, 21 and 28 days of exposure to the four experimental treatments (Controls, Envirox™, Combusted Envirox™ and NM-212) with CAT= catalase; TAC= total antioxidant capacity; GST= glutathione-S-transferase; GPx= glutathione peroxidase; ACP= acid phosphatase; LOOH= lipid hydroperoxides; CSP-3= caspase-3; Trigly= triglyceride; ETS=electron transport system; LDH= lactate deshydrogenase).

Biomarkers			30 psu				15 psu				
			Control	Envirox™	Combusted Envirox™	NM-212	Control	Envirox™	Combusted Envirox™	NM-212	
7 d	Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ /g prot/ min	99,5 ± 75,0	103,9 ± 49,2	118,6 ± 14,5	131,2 ± 46,4	117,6 ± 24,1	148,9 ± 28,7	126,8 ± 13,2	149,1 ± 32,4
		TAC	μmol Teq/ g prot / min	57,8 ± 22,8	101,3 ± 37,7	48,5 ± 41,8	116,6 ± 50,3	110,7 ± 40,5	117,8 ± 77,0	72,2 ± 39,6	125,4 ± 115,2
		GST	μmol CDNB/g prot/ min	658,7 ± 200,7	776,1 ± 164,5	600,1 ± 387,0	638,2 ± 259,5	584,8 ± 311,3	923,2 ± 476,7	825,3 ± 308,0	824,5 ± 312,4
		GPx	μmol NADPH/g prot/ min	200,8 ± 101,7	181,5 ± 94,0	150,3 ± 45,4	164,4 ± 103,7	159,8 ± 77,1	216,8 ± 84,4	175,8 ± 66,4	163,1 ± 50,5
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	190,3 ± 53,3	164,5 ± 48,3	176,6 ± 91,5	212,8 ± 62,7	239,2 ± 60,8	181,0 ± 51,1	157,5 ± 41,3	176,3 ± 55,7
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	252,8 ± 16,6	234,7 ± 74,6	308,0 ± 123,2	135,7 ± 71,0	241,7 ± 31,9	250,5 ± 68,4	180,7 ± 54,2	227,7 ± 83,3
		CSP3	μmol pNA/ g prot/ h	6,9 ± 3,9	7,1 ± 6,3	4,3 ± 1,9	8,0 ± 3,0	15,4 ± 4,7	11,5 ± 1,3	11,8 ± 4,4	11,4 ± 4,7
	Structural and energetic parameters	Trigly	mg/g DW	3,9 ± 2,1	4,2 ± 2,2	36 ± 1,5	3,1 ± 1,3	4,2 ± 1,4	2,7 ± 1,7	3,9 ± 3,0	4,0 ± 1,5
		ETS	μmolO ₂ /g/ h	32,3 ± 7,4	35,9 ± 5,8	36,1 ± 8,3	29,4 ± 7,2	36,0 ± 6,4	33,4 ± 8,7	39,7 ± 7,8	37,7 ± 10,3
		LDH	μmol NADH/g prot/ h	283,1 ± 48,3	285,0 ± 38,2	300,8 ± 89,7	365,1 ± 73,2	343,9 ± 36,0	340,5 ± 118,8	315,5 ± 57,3	371,2 ± 192,9
14 d	Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ /g prot/ min	173,9 ± 81,4	154,4 ± 24,2	167,5 ± 69,7	198,0 ± 61,3	102,1 ± 25,2	56,7 ± 49,1	80,0 ± 17,9	102,0 ± 37,8
		TAC	μmol Teq/ g prot / min	134,9 ± 107,3	127,1 ± 46,6	128,7 ± 148,3	110,5 ± 59,9	76,6 ± 16,7	100,4 ± 23,1	104,6 ± 52,5	85,8 ± 68,9
		GST	μmol CDNB/g prot/ min	818,3 ± 237,1	920,1 ± 209,1	918,2 ± 500,1	838,9 ± 409,8	900,7 ± 299,7	711,6 ± 384,9	1175,9 ± 393,7	684,1 ± 137,4
		GPx	μmol NADPH/g prot/ min	254,5 ± 215,1	218,4 ± 65,0	229,4 ± 84,9	291,2 ± 147,6	179,5 ± 74,8	180,3 ± 80,5	138,2 ± 61,8	193,5 ± 99,2
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	350,1 ± 233,0	262,1 ± 113,4	302,5 ± 201,0	271,0 ± 90,1	195,7 ± 38,8	173,4 ± 67,8	197,2 ± 57,3	181,1 ± 75,4
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	354,0 ± 148,1	292,0 ± 28,8	313,2 ± 150,4	282,1 ± 104,3	279,9 ± 39,6	222,1 ± 29,9	294,3 ± 94,5	307,1 ± 94,9
		CSP3	μmol pNA/ g prot/ h	6,9 ± 3,8	11,0 ± 6,0	15,6 ± 11,0	5,2 ± 4,0	10,6 ± 3,7	13,2 ± 5,5	12,4 ± 4,6	8,5 ± 3,2
	Structural and energetic parameters	Trigly	mg/g DW	1,6 ± 0,4	4,0 ± 1,8	2,4 ± 1,1	1,8 ± 0,6	4,7 ± 1,3	4,1 ± 1,9	6,7 ± 2,5	6,0 ± 4,6
		ETS	μmolO ₂ /g/ h	28,8 ± 4,7	30,1 ± 7,3	26,6 ± 10,0	26,2 ± 10,3	34,4 ± 4,6	40,5 ± 6,7	34,2 ± 4,2	37,7 ± 9,0
		LDH	μmol NADH/g prot/ h	403,2 ± 166,5	481,6 ± 104,1	370,5 ± 224,5	354,9 ± 82,0	239,3 ± 74,9	337,2 ± 80,8	337,4 ± 119,3	333,7 ± 89,2
21 d	Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ /g prot/ min	79,7 ± 47,6	108,1 ± 24,2	91,3 ± 45,3	172,6 ± 53,0	111,1 ± 21,0	125,4 ± 45,4	106,4 ± 29,6	106,9 ± 24,8
		TAC	μmol Teq/ g prot / min	86,8 ± 23,7	82,0 ± 15,2	101,2 ± 39,3	123,5 ± 48,0	82,7 ± 39,9	91,5 ± 32,5	93,8 ± 21,5	97,5 ± 23,5
		GST	μmol CDNB/g prot/ min	759,8 ± 180,0	700,2 ± 291,8	587,1 ± 291,1	628,9 ± 226,5	720,7 ± 182,0	507,3 ± 157,0	484,8 ± 173,1	838,1 ± 154,6
		GPx	μmol NADPH/g prot/ min	173,8 ± 48,9	158,8 ± 40,4	163,1 ± 82,7	217,9 ± 80,9	141,7 ± 45,1	198,9 ± 83,3	173,3 ± 113,8	197,5 ± 54,7
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	175,2 ± 43,5	197,0 ± 54,9	184,5 ± 74,9	227,1 ± 59,6	162,3 ± 47,5	192,8 ± 17,5	170,7 ± 63,1	160,0 ± 59,7
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	244,5 ± 35,5	177,1 ± 66,0	233,9 ± 40,5	278,3 ± 100,4	116,7 ± 118,3	247,2 ± 55,3	198,9 ± 106,4	164,5 ± 79,9
		CSP3	μmol pNA/ g prot/ h	8,2 ± 2,5	14,1 ± 6,5	5,9 ± 3,6	8,5 ± 3,3	14,1 ± 4,7	11,3 ± 6,7	14,0 ± 2,4	9,4 ± 5,0
	Structural and energetic parameters	Trigly	mg/g DW	2,6 ± 1,5	3,0 ± 1,3	3,2 ± 1,6	3,6 ± 1,3	3,5 ± 2,1	2,1 ± 0,3	5,2 ± 2,4	3,0 ± 1,8
		ETS	μmolO ₂ /g/ h	38,3 ± 5,6	34,3 ± 3,7	33,0 ± 7,3	30,0 ± 3,8	40,3 ± 3,6	35,4 ± 6,9	35,7 ± 5,5	37,0 ± 5,8
		LDH	μmol NADH/g prot/ h	403,5 ± 56,6	339,7 ± 46,2	332,6 ± 68,3	454,1 ± 112,5	225,8 ± 78,1	266,8 ± 43,3	393,5 ± 78,5	340,9 ± 102,1
28 d	Antioxidant and antitoxic defenses	CAT	mmol H ₂ O ₂ /g prot/ min	128,8 ± 25,0	117,2 ± 39,3	154,5 ± 25,1	96,1 ± 64,8	132,7 ± 44,5	115,1 ± 44,3	104,6 ± 23,9	111,5 ± 27,1
		TAC	μmol Teq/ g prot / min	72,8 ± 29,6	127,1 ± 56,1	164,3 ± 71,2	111,9 ± 62,9	102,0 ± 53,5	89,0 ± 49,3	75,0 ± 32,5	71,3 ± 20,4
		GST	μmol CDNB/g prot/ min	627,6 ± 279,7	443,0 ± 273,9	572,0 ± 335,5	595,0 ± 179,8	629,1 ± 275,1	1011,9 ± 493,5	542,0 ± 336,4	306,5 ± 108,2
		GPx	μmol NADPH/g prot/ min	157,7 ± 71,2	170,2 ± 54,5	174,8 ± 53,7	155,7 ± 37,9	158,5 ± 68,3	167,8 ± 62,9	137,2 ± 54,2	143,5 ± 67,4
		ACP	μmol p-nit. / g prot / h	168,2 ± 46,1	235,4 ± 92,3	318,7 ± 98,7	181,6 ± 42,7	185,2 ± 36,3	190,4 ± 62,1	160,4 ± 22,2	189,5 ± 32,3
	Cellular damages and apoptosis induction	LOOH	μmol TBH/g prot	337,5 ± 68,5	292,2 ± 108,2	350,8 ± 218,8	265,5 ± 147,9	290,6 ± 139,3	275,3 ± 118,0	286,6 ± 142,7	328,8 ± 134,8
		CSP3	μmol pNA/ g prot/ h	3,6 ± 0,7	5,6 ± 2,2	11,7 ± 3,8	6,5 ± 5,7	15,5 ± 8,2	10,6 ± 3,7	10,8 ± 3,5	9,3 ± 2,5
	Structural and energetic parameters	Trigly	mg/g DW	2,7 ± 1,6	4,7 ± 2,2	3,7 ± 1,3	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,6	3,6 ± 1,2	3,0 ± 1,5	4,1 ± 0,8
		ETS	μmolO ₂ /g/ h	35,8 ± 4,4	26,9 ± 8,3	23,9 ± 2,6	29,5 ± 7,7	30,3 ± 5,4	33,8 ± 4,7	35,0 ± 5,7	33,3 ± 6,4
		LDH	μmol NADH/g prot/ h	306,0 ± 37,9	345,3 ± 88,2	430,5 ± 87,1	339,4 ± 87,9	321,9 ± 92,1	362,1 ± 107,9	340,5 ± 105,2	341,6 ± 83,6

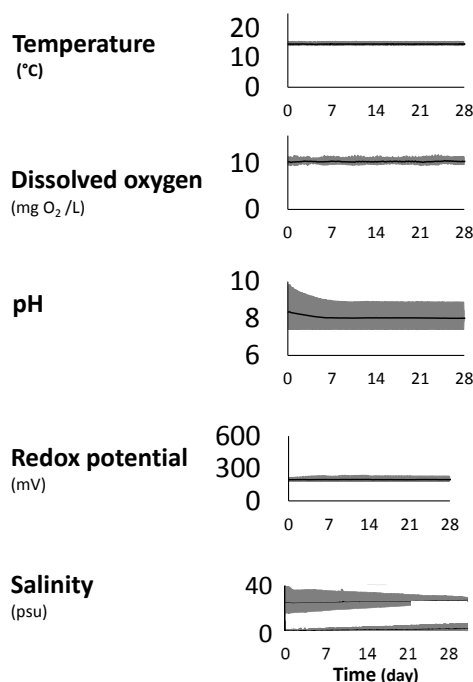


Figure S1 : Evolution of the physico-chemical parameters. Temperature (Celsius degree), dissolved oxygen (mg O₂/L), pH, redox potential (mV), salinity (practical salinity unit (psu)) in the water column, were measured during the all experimental time (28 days). The grey surface was defined by the maximum and minimum values of each parameter and the dark line corresponds to the mean values measured of the 8 mesocosms. One measurement was performed every 15 min.

Points forts

Les études réalisées en mésocosmes ont permis de montrer :

- *le devenir des nanomatériaux et nanoproduits à base de CeO₂ en conditions les plus réalistes d'un point de vue environnemental,*
- *la complexité de la répartition des nanomatériaux et nanoproduits entre les différents compartiments du milieu (colonne d'eau/ sédiment/ biota),*
- *une forte sédimentation du cérium (CeO₂-NAP et CeO₂-NM), plus particulièrement observée en eau douce (1,5 et 15 psu),*
- *la difficulté d'obtenir des patrons de réponses biochimiques, physiologiques et comportementales spécifiques aux CeO₂-NM et CeO₂-NAP,*
- *la nécessité de standardiser la durée d'exposition afin qu'elle soit la plus appropriée pour l'évaluation des risques liés aux CeO₂-NM et CeO₂-NAP,*
- *la problématique d'un diagnostic environnemental à cette échelle.*

Chapitre VII: Discussion générale

Dans cette partie, les différents résultats seront remis en perspective. Les principaux éléments mis en évidence dans les différents systèmes d'exposition permettront de discuter autour des protocoles d'évaluation du risque associés aux nanomatériaux, et d'émettre des perspectives quant à l'étude des stress multiples en écotoxicologie.

A. L'influence de la salinité sur les organismes

Tous les organismes ont la capacité de maintenir une stabilité relative de leur milieu interne suite à des changements de conditions environnementales. Ce processus physiologique appelé l'homéostasie a initialement été défini par Claude Bernard en 1865. Les modèles biologiques de cette étude (*C. fluminea* et *S. plana*) sont classés comme des espèces osmo-régulatrices, c'est-à-dire qu'elles utilisent différents mécanismes qui peuvent être chimiques, physiques ou comportementaux afin de maintenir stable leur milieu interne suite aux variations du milieu externe. A partir d'un certain seuil, ces organismes osmo-régulateurs ne peuvent plus compenser et sont alors dans des conditions défavorables pouvant entraîner leur mort comme illustre la Figure 31.

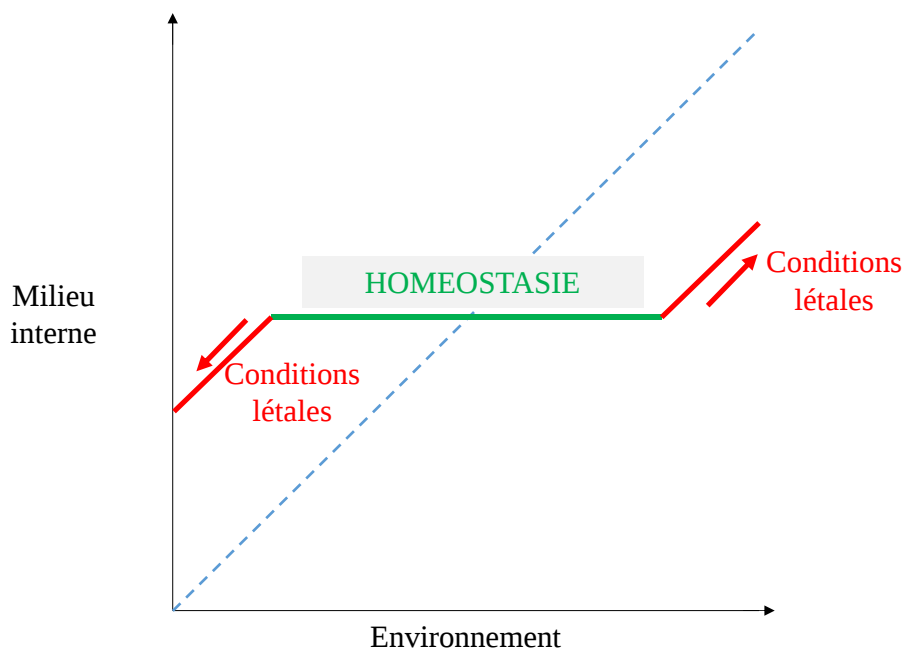


Figure 32 : Illustration des réponses des organismes osmo-régulateurs en fonction des contraintes environnementales et la composition du milieu interne. La ligne en pointillés bleus correspond aux espèces osmo-conformes.

Les questions scientifiques abordées dans cette partie portaient sur le développement d'un protocole d'acclimatation des organismes à un gradient de salinité et la mise au point de la composition du sédiment artificiel utilisé dans l'ensemble des expérimentations. Au-delà de cette démarche d'ajustement des protocoles, nous cherchions à interroger la notion d'euryhalinité des deux espèces modèles à partir d'un ensemble de réponses des organismes au niveau physiologique, biochimique et comportemental. L'influence du temps d'exposition et du régime alimentaire sur les réponses des organismes soumis à une variation de salinité a également été prise en compte.

Différents travaux ont été menés afin de déterminer le gradient de salinité toléré par chacune des espèces modèles. Pour ce faire, le choix s'est rapidement dirigé vers l'utilisation d'un sel artificiel complexe, Tropic marin® contenant 70 oligo-éléments répertoriés comme étant les plus présents dans le milieu marin. Les acclimations à ces gradients de salinité ont requis la mise en place d'un dispositif spécifique pour chacune des espèces. Le premier paramètre important correspondait à l'acclimatation par palier des organismes, pour laquelle ils ont été maintenus durant une période de 3 jours à chaque salinité testée afin de permettre la mise en place progressive des mécanismes de tolérance à la salinité. Le second paramètre important concernait les différents paliers auxquels chacune des espèces a été placée comprenant une augmentation de dix fois la salinité d'origine pour *C. fluminea* (1.5- 5- 10- 15 psu) et une diminution de deux fois la salinité d'origine pour *S. plana* (30- 20- 15 psu). Ces paliers de salinité ont été choisis afin de réduire au mieux l'impact d'un changement brutal de salinité sur les organismes. Selon nos expériences, *C. fluminea* tolère des variations de salinité comprises entre 1,5 psu et 15 psu tandis que *S. plana* tolère des variations comprises entre 30 et 15 psu. De plus, la limite de tolérance de *C. fluminea* a été estimée dans nos expérience à 25 psu sans entraîner ni de mortalité, ni de variation de l'indice de condition (données personnelles).

Dans la littérature, il a été rapporté que *C. fluminea* tolérât des salinités pouvant atteindre 22 psu lors d'une expérience menée en augmentant graduellement la salinité du milieu d'exposition (Evans et al., 1977) ou une salinité de 24 psu sur une période très courte et sans acclimatation (Morton and Tong, 1985). Chez *S. plana*, aucun impact de la salinité n'a été observé tant que les organismes étaient maintenus à une salinité supérieure à 10 psu sur une période de 120h. La LC₅₀ chez cette espèce après 120 heures d'exposition était de 5,35 psu (Verdelhos et al., 2015a). Nos résultats conformes à ceux de la littérature indiquent que les conditions expérimentales mises en place dans nos laboratoires semblent donc être propices aux organismes osmo-régulateurs pour s'acclimater aux différentes salinités.

La mise en place des tests d'enfouissement sur les deux espèces endobenthiques ont requis des adaptations du sédiment utilisé. Au sein du laboratoire, préalablement au test d'enfouissement, le sédiment naturel prélevé sur le terrain était tamisé et défauné c'est-à-dire que les organismes (macrofaune) présents naturellement dans le sédiment étaient retirés.

L'utilisation de sédiment naturel défauné a soulevé deux problèmes dans le cadre de nos études. La première difficulté portait sur l'adaptation du sédiment à la salinité choisie. En effet, à titre d'exemple, l'eau interstitielle présente dans le sédiment marin prélevé était à une salinité proche de 30 psu, rendant difficile l'obtention d'un sédiment homogène à la salinité de 15 psu. La seconde difficulté était la présence d'algues dans le sédiment naturel. Les algues étant la principale source alimentaire des bivalves, elles pouvaient alors affecter le comportement d'enfouissement des organismes en quête de nourriture. Ainsi, en présence d'algues à la surface du sédiment, le comportement d'enfouissement des bivalves ne pouvait pas être exclusivement interprété en réponse à l'exposition aux contaminants. Pour pallier ces deux problèmes, des tests ont été réalisés avec du sédiment artificiel en utilisant différents ratio de sable fin (60 % compris entre 0.05 et 0.2 mm et 40 % compris entre 0.2 et 2 mm), de kaolinite et de carbonate de calcium (CaCO_3) en présence de 1,25 L d'eau artificielle à la salinité du terrain (1,5 psu pour *C. fluminea* et 30 psu pour *S. plana*) (Tableau 3).

Tableau 3 : Différents types de composition du sédiment testés sur les deux espèces.

	sable	kaolinite	CaCO_3
composition A	60%	39%	1%
composition B	70%	29%	1%
composition C	80%	19%	1%
composition D	90%	9%	1%

Le sédiment artificiel le plus approprié a été choisi en comparant les différentes cinétiques d'enfouissement des organismes à celles obtenues à partir avec du sédiment naturel. La composition D du sédiment artificiel (90 % de sédiment fins ; 1 % de CaCO_3 et 9 % de kaolinite) s'est révélée optimale dans le cas des deux espèces. Cette composition du sédiment artificiel identique pour les deux espèces a donc été utilisée pour les tests d'enfouissement ainsi que pour les expositions en mésocosmes.

L'ensemble des réponses éco-physiologiques évaluées a été présenté dans la publication du chapitre III intitulée « Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* ». L'absence de mortalité a permis de valider la notion d'euryhalinité des deux espèces étudiées. Cependant, comme l'évoquaient Evans et al. (1977), la tolérance aux variations de salinité ne peut être considérée par le seul critère de la mortalité. En effet, des modifications à l'échelle sub-individuelle peuvent survenir suite aux variations de salinité. La diminution de l'indice de condition à 15 psu mesurée durant cette étude chez *S. plana* a également été observée chez *Mytilus galloprovincialis* suite à l'exposition au stress hypo-salin (37, 28, 18,5, 11 psu) par Hamer et al. (2008). L'absence d'enfouissement des deux espèces suite à l'exposition à 15 psu dans ces travaux a également été observée dans une précédente étude réalisée par Fossi-Tankoua et al. (2011) chez la même espèce *S. plana*.

Aux niveaux des marqueurs physiologiques, les paramètres structuraux et énergétiques sont apparus comme des biomarqueurs appropriés pour l'évaluation du stress salin sur les deux espèces de bivalves. Nos résultats mettent également en évidence une modification de la réponse antioxydante, avec une augmentation face à la modification de la salinité. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, Carregosa et al. (2014) ont montré des modifications des mécanismes biochimiques incluant une augmentation des défenses antioxydantes sur le bivalve marin *Venerupis philippinarum*, afin de faire face à l'augmentation du stress oxydatif survenant lors de l'exposition hypo ou hypersaline. Cependant, dans notre étude et contrairement à l'absence de nourriture, le temps d'exposition à court terme ne semble pas avoir d'influence sur ces réponses (aucune variation entre 2 et 7 jours).

En résumé, le métabolisme énergétique joue un rôle essentiel dans la fonction de survie des deux espèces mais également dans leur tolérance et leur adaptation aux stress salins. De manière générale, les facteurs de stress environnementaux peuvent affecter de façon importante la balance énergétique d'un organisme en raison des besoins spécifiques requis pour le maintien de l'homéostasie. Par conséquent, ces stress (naturels ou anthropiques) peuvent impacter les systèmes impliqués dans l'acquisition, la conversion ou le stockage de l'énergie (Sokolova et al., 2012).

L'étude menée sur les deux espèces *C. fluminea* et *S. plana*, a permis de mettre en évidence que la salinité était un facteur de stress important et qu'il serait judicieux de l'étudier sur un pas de temps plus long afin de savoir si les modifications au niveau de l'indice de condition, du comportement et des marqueurs physiologique et biochimiques (biomarqueurs énergétiques et structuraux ainsi que les défenses antioxydante) sont maintenues au cours du temps.

Carregosa et al. (2014), préconisent l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs étudiant différents paramètres physiologiques et biochimiques incluant les niveaux de protéines, du glycogène et de la peroxydation lipidique ainsi que des enzymes antioxydants (catalase, superoxyde dismutase, glutathion réduit ou oxydé). Le même type de batterie a été mise en place dans notre étude. Cependant, il apparaît nécessaire d'enrichir encore la batterie de biomarqueurs proposée au sein des laboratoires partenaires en développant des méthodes pour déterminer par exemple la concentration osmotique dans l'organisme (sodium, potassium) (Byrne et Dietz, 2006) ou la répartition des acides aminés (Goolish et Burton, 1988). Une stratégie adaptative commune à de nombreuses espèces d'invertébrés exposés à divers facteurs de stress est de moduler la répartition des protéines cellulaires en modifiant la concentration en acides aminés libres dans le cytosol des cellules afin d'empêcher la contraction ou le gonflement des cellules lors des variations de salinité (Berger et Kharazova, 1997).

Il serait également intéressant de faire des campagnes de prospection afin d'échantillonner *C. fluminea* et *S. plana* à des salinités naturellement hyper ou hyposalines respectivement. Ceci permettrait de déterminer si les niveaux de biomarqueurs obtenus sont maintenus chez les organismes subissant dans l'environnement ce changement salin ou si ces derniers sont adaptés à ce stress.

B. L'écotoxicité des nanoproduits et nanomatériaux sur les organismes

Pour mener des études dans le domaine des nanosciences, les scientifiques ont été amenés à développer des consortiums d'experts dans différents domaines (chimie, physique, (éco)toxicologie...) afin d'identifier le devenir, le comportement ainsi que les effets au niveau de l'environnement des nanoproduits et nanomatériaux standardisés. Les concepts développés jusque-là dans le domaine de l'écotoxicologie ont donc subi des ajustements afin de mieux répondre aux problématiques des nanotechnologies comprenant l'utilisation de milieux d'exposition plus complexes (micro-mésocosme), des doses proches de celles pouvant être retrouvées dans l'environnement et des durées d'exposition plus longues.

Durant cette thèse, différents nanoproduits commercialisés (NAP) et nanomatériaux standardisés (NM) d'argent (Ag) ou de dioxyde de cérium (CeO_2) ont été étudiés, afin de comprendre :

- Quels sont leur devenir et leur comportement le long d'un gradient de salinité couvrant le continuum eau douce-eau de mer ?
- Sous quelles formes sont-ils biodisponibles pour les organismes ?
- Dans quelles mesures pourront-ils être accumulés par les espèces endobenthiques sélectionnées ?
- Quels effets induisent-ils aux niveaux physiologique, biochimique et comportemental sur les deux espèces de bivalves ?

Pour répondre à ces nombreuses interrogations sur le devenir, le comportement et les effets toxiques des NAP et NM, différents plans d'expériences ont été développés. L'intégralité des conditions testées durant cette thèse ainsi que la synthèse des principaux résultats est présentée dans le tableau 4. Elles comprennent des approches en micro et mésocosmes soumis ou non à un régime alimentaire particulier, le long du gradient de salinité spécifique à l'espèce étudiée sur un palier de temps plus ou moins long. Suite à l'ensemble des expositions, des tests d'enfouissement au niveau individuel et de réponses physiologiques et biochimiques au niveau sub-individuel ont été réalisés afin de répondre aux questions précédemment évoquées.

Les paramètres physico-chimiques (température, pH, salinité, potentiel rédox, oxygène dissous) des milieux ont été suivis pour chaque plan d'expérience et ce tout au long de l'exposition. L'ensemble des différents paramètres mesurés s'est révélé stable durant l'ensemble des expériences en micro et en mésocosme. Ces résultats ont permis de conclure sur la bonne répliquabilité des milieux d'exposition.

Tableau 4 : Ensemble des expériences réalisées durant cette thèse et synthèse des principaux résultats. Seuls les biomarqueurs jouant un rôle significatif ($VIP > 1$, d'après les modèles PLS-DA) dans la discrimination des différentes conditions expérimentales sont listés dans ce tableau.

TAC= total antioxidant capacity ; CAT= catalase ; GPx= glutathion peroxydase ; GST= glutathion-S-transférase ; MT= métallothionéine ; ROS= espèce réactive de l'oxygène ; CSP-3= Caspase-3 ; LOOH= hydroperoxide lipidique ; MDA= malondialdéhyde ; LDH= lactate déhydrogénase ; ETS= electron transport système, Prot= Protéines ; Trigly= Triglycérides ; Chol= Cholestérol.

Dispositif expérimental	Microcosme	Microcosme	Mécoscosme
Métal	Argent	Argent	Dioxyde de cérium
Nanomatériaux	NM-300K	NM-300K	NM-212
Agent de dispersion	NM-300K DIS	Surnageant Acticoat™	Envirox™
Nanoproduits	10 µg/L	10 µg/L (*50µg/L)	90,9 µg/L * 11 injections = 1mg/L
Concentrations	non nourris	nourris / non nourris	nourris
Régime alimentaire	<i>S. plana</i>	<i>C. fluminea</i> <i>S. plana</i>	<i>S. plana</i>
Espèces	30	1,5/15 30/15	30/15
Salinités (psu)	15		
Test d'enfouissement en comparaison au contrôle	↘	↘	↘
Niveau individuel	ETS GPx; GST; TAC; MT; TBARS	LDH ACP; GST; MT; CAT	ETS TAC CSP-3
7d	Prot; Trigly; Chol	LOOH; CSP-3	Trigly CSP-3 Trigly; LDH
Niveau cellulaire			CSP-3 CAT
14d			LDH TAC; GPx CSP-3
21d			LDH; ETS CAT; TAC CSP-3
28d			ETS TAC; ACP; GST CSP-3; LOOH

Les biomarqueurs énergétiques et structuraux sont en italique.

Les biomarqueurs impliqués dans la réponse antioxydante et antitoxique sont en gras.

Les biomarqueurs de dommages cellulaires et d'apoptose sont en caractères simples.

a. Les nanoproduits

Dans cette thèse, deux types de nanoproduits ont été étudiés, ceux d'argent (Acticoat™) et ceux de dioxyde de cérium (Envirox™). L'originalité de ces travaux a porté sur l'étude des nanoproduits lors de leur entrée dans l'environnement aquatique de manière directe (Acticoat™) mais également à des stades différents de leur cycle de vie (Envirox™ avant et après utilisation). L'objectif était de s'approcher d'une part des conditions dans lesquelles ils se disperseront dans l'écosystème et d'autre part de développer des milieux d'exposition les plus réalistes possible d'un point de vue environnemental (gradient de salinité, présence de source alimentaire).

Dans le cas du pansement Acticoat™, le vieillissement du nanoproduit a été suivi durant l'expérience (7 jours). Comme montré précédemment par Dunn et Edwards-Jones (2004), les résultats ont montré l'impact de la salinité sur la cinétique de libération de l'argent sous forme d'argent dissous par le pansement (Tella et al, 2014).

Le rôle de la salinité et du carbone organique dissous (COD) sur le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent (AgNP) présentant un revêtement de surface (citrate ou de polyvinylpyrrolidone (PVP)) a été étudié par Wang et al. (2014). Les résultats ont permis de mettre en évidence que la salinité était le facteur de stress dominant sur la stabilité et l'agrégation des AgNP suivi par les COD. Des effets négatifs de cet argent libéré dans le milieu ont été mis en évidence suite à l'exposition des organismes. La variation de la salinité dans le milieu a entraîné des modifications de la disponibilité et l'accumulation de l'argent dans les organismes en présence d'algues. Ng et al. (2005) ont observé une accumulation des éléments traces métalliques comprenant l'argent, le zinc et le cadmium sur le phytoplancton assimilés par trois espèces différentes de bivalves (*Perna viridis*, *Ruditapes philippinarum*, *Balanus amphitrite*). De plus, l'exposition des organismes aux nanoproduits d'argent a induit une réduction de la vitesse d'enfouissement des organismes et ce quelle que soit la salinité testée. Divers mécanismes de défenses et de dommages cellulaires ont été activés suite à l'exposition des organismes aux nanoproduits d'Ag. La littérature indique que les effets toxiques des AgNP sur les organismes concernaient principalement des dommages aux membranes cellulaires et des composants sub-cellulaires (Lapresta-Fernández et al., 2012).

Dans le cas de l'Envirox™, des études ont porté sur le vieillissement du nanoproduit contenant des nanomatériaux de dioxyde de cérium. L'altération du nanoproduit survient lors de son passage dans le banc à moteur à une température d'environ 850°C. Le laboratoire partenaire du CEREGE a ainsi réalisé une combustion du nanoproduit à 850°C et nommé ce produit de dégradation Combusted Envirox™. Afin d'étudier le devenir des NAP sous forme brute (Envirox™) et des nanoproduits altérés (Combusted Envirox™), des études ont été menées dans des conditions réalistes d'un point de vue environnemental (mésocosme d'eau douce ou marin) en présence d'organismes endobenthiques pour une durée d'exposition allant jusqu'à 28 jours.

Le suivi de la répartition des nanoproduits dans les différents compartiments du mésocosme ont montré une forte sédimentation du cérium et plus particulièrement suite à l'exposition en milieu d'eau douce (1,5 et 15 psu en présence de *C. fluminea*). Au sein du laboratoire, une étude préalable avait été réalisée portant sur le devenir et le comportement de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO₂-NPs) nues ou enrobées de citrate (bare-CeO₂ ou citrate-CeO₂ respectivement). Les résultats de cette expérience ont montré que les CeO₂-NPs nues étaient accumulées elles-aussi à la surface du sédiment (Tella et al., 2014) et plus biodisponibles pour les espèces se nourrissant à l'interface eau- sédiments comme les gammares (Garaud et al., 2015). Dans l'étude présentée en chapitre VI de ce manuscrit, une plus faible bioaccumulation du cérium a été observée chez *C. fluminea* en comparaison à celle mesurée chez *S. plana*. Néanmoins, au regard de la concentration chronique injectée, la bioaccumulation mesurée restait stable durant l'ensemble de l'expérience et négligeable en comparaison à la répartition du cérium au sein du mésocosme (sédiment et colonne d'eau). Ce résultat a également été observé suite à l'injection chronique de nanoparticules de dioxyde de cérium avec la moule d'eau douce (*Dreissena polymorpha*) (Garaud et al., 2015). Les travaux réalisés dans le cadre cette thèse ont également mis en évidence l'activation au cours du temps des biomarqueurs de défense et de dommage mais aussi des effets sur la cinétique d'enfouissement des organismes. L'altération de l'Envirox™ suite à sa combustion a entraîné des modifications de la réponse des biomarqueurs sur les organismes de manière significativement différente de celles induites par l'Envirox™. Les résultats obtenus aux différents pas de temps de l'exposition ont mis en évidence la difficulté d'obtenir un patron de réponse physiologique, biochimique et comportemental spécifique à l'exposition aux nanoproduits.

En résumé, le devenir et le comportement des nanoproduits sont régis par le gradient de salinité couvrant le continuum eau douce-eau de mer. Dans le cas du pansement, l'argent est principalement libéré sous forme ionique et bioaccumulable par les organismes. Dans le cas des nanoproduits d'Envirox™, le cérium est fortement présent sous forme nanoparticulaire sédimentée. La bioaccumulation du cérium dans l'organisme représente une fraction négligeable au regard de la concentration injectée. Cependant, des effets néfastes pour les organismes ont été observés après l'exposition aux deux nanoproduits au niveau physiologique, biochimique et comportemental.

b. Les nanomatériaux standardisés

Deux types de NM standardisés fournis par le JRC ont été étudiés, ceux d'argent (NM-300K) et ceux de dioxyde de cérium (NM-212). L'étude de ces NM standardisés a été rendue possible grâce au projet NanoREG (« A common European approach to the regulatory testing of nano-materials », N° 310584) appartenant au programme : European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) dans lequel le laboratoire MMS est impliqué. Les objectifs de l'étude de ces nanomatériaux standardisés par l'ensemble de la communauté scientifique étaient (i) d'améliorer les connaissances en étudiant des NM largement caractérisés et (ii) de développer pour le futur des NM et NAP ayant un impact aussi neutre que possible sur l'environnement (Singh et al., 2014). Les études menées sur le NM-300K ont été systématiquement accompagnées de l'étude de la solution de dispersion dans laquelle les nanomatériaux se trouvaient. Le but de cette approche était de mettre en évidence les effets respectifs de l'agent de stabilisation et des NM d'argent.

La première étude présentée en chapitre V et portant sur les réponses des NM-300K le long du gradient de salinité, a montré une augmentation de la dissolution des NM-300K, des modifications de la biodisponibilité et de l'accumulation de l'argent par les organismes. A la salinité de 30 psu, les NM-300K ayant subi une dialyse préalable ont montré des effets négatifs aux niveaux sub-individuels et individuels sur *S. plana*, significativement différents de ceux observés après exposition au nitrate d'argent (Ag sous forme ionique) et au contrôle. Ce résultat a donc mis en évidence des effets spécifiques de l'argent sous forme nanométrique malgré la forte libération d'ions argent dans la condition NM-300K, en accord avec des études précédentes comme rapporté par Lapresta-Fernández et al. (2012). Suite à l'exposition des deux espèces à la condition NM-300K, une réduction de la vitesse d'enfouissement a été observée y compris lors de l'exposition à l'agent dispersant. Les études de la solution de dispersion dans laquelle les nanomatériaux se trouvaient ont donc mis en évidence des effets négatifs aux niveaux sub-individuels et individuels sur les deux espèces. La solution de dispersion est composée de Tween 20 qui interagirait avec l'ADN et endommagerait la chromatine induisant des phénomènes d'apoptose (Eskandani et al., 2013). Suite à l'exposition des organismes à la condition NM-300K, l'activation de divers mécanismes de défense a été mesurée, malgré tout suivie de l'apparition de dommages cellulaires. Les effets spécifiques observés pour les NM-300K étaient également différents de ceux observés après l'exposition des organismes au nanoproduct d'argent l'Acitocat™.

L'étude présentée en chapitre VI portant sur les réponses des bivalves exposés aux NM-212 le long du gradient de salinité en mésocosme, a montré des réponses distinctes entre l'effet de la salinité et du traitement sur les deux espèces.

Dans les mésocosmes d'exposition de *C. fluminea*, le cérium est retrouvé majoritairement dans la partie superficielle du sédiment tandis qu'une très faible quantité du cérium injecté a été mesurée dans ceux contenant *S. plana*. Après 28 jours d'exposition à la condition d'hypersalinité, une augmentation de l'activité de la LDH, couplée à une diminution de la vitesse d'enfouissement, est observée chez les organismes témoins en comparaison à ceux exposés au NM-212.

Au contraire, chez *S. plana* aucune bioaccumulation n'a été observée durant l'exposition. Cependant des effets de la salinité sur les organismes ont été observés après 14 et 21 jours d'exposition aux NM-212.

Les investigations sur les nanomatériaux standardisés ainsi que sur l'agent de dispersion semblent (i) indispensables afin d'acquérir une large base de données sur le comportement et les effets des nanomatériaux dans l'objectif de l'évaluation du risque environnemental et (ii) ainsi permettre de mieux comprendre les impacts des nanomatériaux dans un maximum de conditions environnementales différentes. Il est également nécessaire d'utiliser cette substance standardisée en respectant dans l'ensemble des laboratoires un protocole de préparation des solutions identique afin de pouvoir être le plus homogène et permettre ainsi l'obtention de données comparables.

En résumé, ces études ont montré que des effets au niveau des nanoproduits à différents stades de leur cycle de vie (pansement ou additif d'huile de moteur diesel) et de nanomatériaux standardisés ont pu être mis en évidence sur les deux espèces de bivalves endobenthiques d'eau douce et estuarien à différents niveaux : physiologique, biochimique et comportemental malgré les faibles bioaccumulations. Des effets spécifiques aux nanomatériaux standardisés ont été observés, de même que pour les nanoproduits d'argent et de dioxyde de cérium. Cependant, les patrons de réponses entre les NM et les NAP n'étaient pas identiques malgré des plans d'expérience similaires (concentrations et durées d'exposition). En effet, à la différence de ce qui a pu être rencontré jusque-là en écotoxicologie, les résultats obtenus pour les nanomatériaux standardisés ne peuvent être extrapolés à l'ensemble des nanoproduits.

C. Autres facteurs de stress

Deux autres types de facteurs de stress ont été ajoutés dans les expériences : la durée de l'exposition et la présence ou l'absence d'une source alimentaire.

a. La durée d'exposition

La durée d'exposition est un critère important lors de l'étude des effets d'un contaminant très souvent relié à la concentration d'exposition. Dans le cas des NM et des NAP, différents temps d'exposition ont pu être testés en microcosme (2 et 7 jours) et en mésocosme (7, 14, 21 et 28 jours).

Cette gamme de temps d'exposition dépend bien évidemment des conditions expérimentales auxquelles les organismes sont soumis. En effet, le développement de milieux de plus en plus réalistes d'un point de vue environnemental tels que les unités des mésocosmes (colonne d'eau, sédiment, algues), participe également à l'augmentation des possibilités de maintien des organismes au sein du laboratoire. Les expositions sur des pas de temps courts (Tableau 4) ont été réalisées en microcosme à des concentrations comprises entre 10 et 50 $\mu\text{g Ag/L}$ et ont modifié les réponses des biomarqueurs. Les expériences menées en mésocosme ont été réalisées suite à l'ajout chronique de cérium (concentration finale d'1mg Ce/L) et ont provoqué des modifications des réponses de la batterie de biomarqueurs. Ces deux expériences ont été réalisées à des échelles expérimentales (micro et mésocosme) et des types de nanomatériaux différents (argent et dioxyde de cérium) ; néanmoins, le temps semble être un critère plus important lorsque le milieu se complexifie au regard des résultats obtenus. A l'avenir, il serait important de définir une durée d'exposition la plus appropriée possible pour l'évaluation des risques liés à la salinité et aux NAP et NM. En effet, les possibilités d'augmentation de la durée d'exposition ne sont pas illimitées. Le maintien des organismes au sein de milieux complexes (mésocosmes) mais aussi l'intendance technique qu'ils requièrent, seront bien évidemment des facteurs limitants du prolongement des expériences.

b. Le régime alimentaire

Les expositions au laboratoire ont également été menées en présence ou en absence de source alimentaire pour les bivalves étudiés. L'ajout d'algues comme source alimentaire pour les organismes a été choisi afin d'étudier l'impact du transfert trophique suite à l'exposition aux nanomatériaux standardisés et aux nanoproduits. Selon le devenir des nanomatériaux et nanoproduits testés, les substances (argent ou dioxyde de cérium) peuvent s'adsorber (homo-agrégation) ou s'absorber aux algues. Lors de la filtration du milieu par les organismes, l'augmentation de l'entrée des substances dans l'organisme due au transfert trophique peut être importante et ainsi influencer la bioaccumulation dans l'organisme. De plus, la présence d'algues dans le milieu d'exposition inciterait les organismes à filtrer d'avantage le milieu augmentant ainsi la mise en contact entre l'organisme et le contaminant. Il est toutefois important de souligner qu'aucune exposition prolongée n'aurait pu être envisagée si les organismes n'avaient pas été nourris afin de ne pas induire un stress supplémentaire de jeûne.

Dans les expériences, le suivi de la concentration algale a été réalisé et semble avoir des effets combinés avec d'autres facteurs de stress (salinité, traitements). Cependant, aucun suivi de l'adsorption ou l'absorption des NAP ou NM standardisés au niveau des algues n'a été réalisé durant ces expériences. Dans les prochaines études, ces paramètres seront à prendre en compte afin de mieux comprendre l'effet de la ressource alimentaire.

D. Pertinence des modèles biologiques

Les études menées durant cette thèse dans le cadre du programme ANR, ont permis pour la première fois d'identifier les effets des nanomatériaux et des nanoproduits le long du continuum eau douce-eau de mer. L'originalité de ces travaux était d'utiliser deux espèces euryhalines et endobenthiques représentatives des milieux dulcicoles (*C. fluminea*) et estuariens et marins (*S. plana*) qui sont de réelles cibles pour les nanomatériaux et nanoproduits à l'interface eau-sédiments.

L'ensemble des analyses a été réalisé sur la glande digestive car il est l'organe de détoxification chez les bivalves (Marigómez et al., 2002). Les résultats acquis durant cette thèse montrent que la glande digestive des bivalves endobenthiques est une des principales cibles de la bioaccumulation et des effets des NAP et NM. Il était donc indispensable de mesurer les effets au niveau de cet organe cible.

Ces organismes sont très importants dans la structure et le fonctionnement de l'écosystème en particulier dans la bioturbation du sédiment. Il est important de souligner que l'exposition prolongée en mésocosme pour l'évaluation des effets des nanomatériaux et nanoproduits est tout à fait envisageable avec ces deux modèles biologiques dont la durée de vie moyenne est 3-4 ans. Par ailleurs, il reste très important de tenir compte de la saison lors des campagnes d'échantillonnage et de la taille (longueur de la coquille inférieure à 2 cm) afin de s'affranchir au maximum de facteurs tels que la période de reproduction. Du fait de leur faible taille, il est possible dans le cas de protocole expérimental de disposer de grands groupes d'échantillons ; cependant, la contrainte de la taille des systèmes expérimentaux demeure un critère limitatif à prendre en compte.

Ces deux organismes euryhalins ont été exposés à une salinité de test commune, 15 psu, cependant les résultats obtenus à cette salinité ne sont pas comparables comme le présente l'ACP obtenue dans le chapitre III intitulé « Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana* ». Malgré des mécanismes physiologiques différents, leur tolérance commune à la salinité de 15 psu ne signifie pas pour autant que les niveaux de base des biomarqueurs pour les deux espèces sont identiques. Cette contrainte de réponses des biomarqueurs différents a ainsi réduit les possibilités de comparaisons inter-espèces.

L'une des contraintes d'utilisation de ces modèles est qu'ils ont la possibilité de s'isoler du milieu en fermant leur coquille. Elles peuvent alors ne plus être en contact avec le milieu extérieur posant le problème de l'absorption du contaminant. Le taux de filtration pourrait permettre d'évaluer le contact de l'organisme avec le milieu d'exposition. Des études de mouvements valvaires pourraient également permettre de répondre à ces interrogations grâce au dispositif du Multi Freshwater Biomonitoring (MFB) qui sont des enceintes permettant d'étudier un signal représentatif de différents types de comportement (par exemple le mouvement valvaire).

L'une des approches non abordées dans cette thèse mais qui sera réalisée dans le programme NanoSALT est la caractérisation des NM dans la matrice biologique. Des techniques seront mises en place telle que la spéciation d'un type de nanomatériau par spectroscopie d'adsorption des rayons X. Il serait intéressant d'étudier également les effets biologiques au niveau des branchies qui font parties des premiers tissus en contact avec les contaminants.

E. Pertinence des milieux d'exposition

Les études menées durant cette thèse étaient basées sur le développement de systèmes de plus en plus complexes depuis les microcosmes (organismes, algues) jusqu'aux mésocosmes (sédiment, circulation de l'eau, cycle des marées) afin de mieux appréhender les réponses des organismes aux différents facteurs de stress que sont la salinité, les nanoproduits altérés ou non et les nanomatériaux standardisés, le temps d'exposition et le régime alimentaire.

Ces travaux ont donc permis d'étudier les nanomatériaux et nanoproduits en développant des conditions expérimentales plus réalistes que celles notamment utilisées dans les tests de toxicité aigüe ou chronique couramment utilisés en écotoxicologie. La figure 32 présente les deux types d'approches comprenant d'une part des systèmes simples et reproductibles que sont les microcosmes et d'autres part des systèmes complexes mais plus représentatifs de l'environnement que sont les expositions en mésocosme.

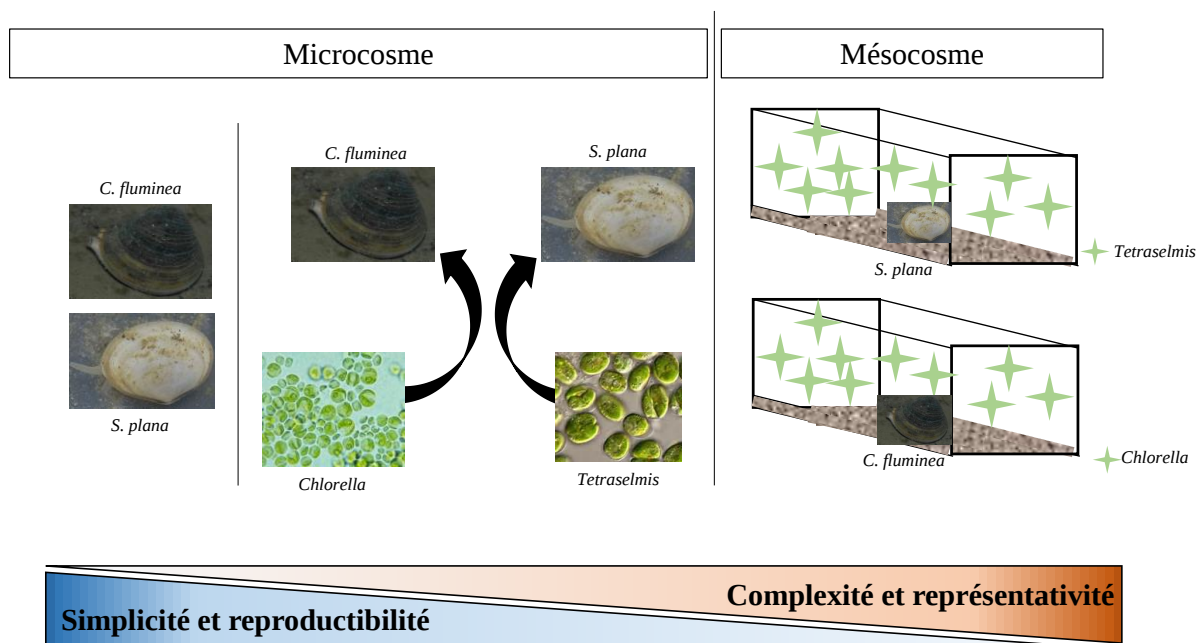


Figure 33 : Différentes approches d'exposition réalisées durant cette thèse.

Dans les milieux en microcosme, deux types d'études peuvent être réalisés comprenant d'une part, des études basées sur l'exposition des organismes seuls et d'autre part l'exposition des organismes en présence d'une source alimentaire (ici des algues). Cependant, il existe des limites à ces techniques d'exposition. Du fait de leur simplicité ces milieux d'exposition permettent une meilleure reproductibilité des expériences. Néanmoins, les expériences en milieu plus complexe tels que les mésocosmes permettent une meilleure représentativité environnementale des résultats obtenus. Durant cette thèse, des expériences en méosocosme ont donc été réalisées sur un pas temps d'exposition plus long (28 jours) dans un milieu complexe comprenant du sédiment, des algues et une colonne d'eau caractérisée par un gradient de salinité et un ajout chronique de contaminants. Ce type de milieu expérimental plus représentatif du milieu naturel réduit le suivi de l'évolution du contaminant dans le milieu (dégradation, transformation, cycle de vie) (Lowry et al., 2012; Nowack et Bucheli, 2007). Les facteurs limitant le développement en milieu plus complexe sont la maintenance de l'ensemble des systèmes et le temps consacré à ce maintien. Par conséquent, le nombre de répliques est limité lors de la mise en place de l'évaluation des effets des contaminants. Par conséquent, seules certaines combinaisons des facteurs de stress peuvent être évaluées parallèlement.

De nombreuses avancées technologiques ont été faites dans le domaine de la caractérisation des NM dans des matrices complexes. En effet, la mesure des paramètres tels que le diamètre hydrodynamique, les phénomènes d'aggrégations par les techniques actuellement disponibles (DLS, Nanosizer) ne sont pas adaptées aux mesures des particules dans des milieux chargés de matière en suspension comme cela est le cas dans les mésocosmes (sédiment contenant du CaCO_3 et kaolinite à de taille nanométrique). L'accès à ces nouveaux outils de caractérisation sont toutefois limités (coût, préparation des échantillons).

F. Pertinence des réponses biologiques mesurées

En écotoxicologie, le biomarqueur est défini comme étant un indicateur sensible et précoce de toutes les réponses biologiques à un contaminant indiquant un changement par rapport au niveau de base. De plus, l'ensemble des expositions réalisé durant cette thèse a permis de mettre en évidence des différences entre les groupes expérimentaux exposés aux NM ou aux nanoproduits en comparaison avec les groupes contrôles. Certes, les réponses observées chez les organismes exposés sont différents de celles observées chez les groupes contrôles (considéré comme le niveau de base).

La principale difficulté dans le domaine de l'écotoxicologie est de comprendre le lien entre les réponses obtenues au niveau sub-individuel (marqueurs biochimiques, physiologiques) et individuel (état de santé général de l'organisme). La figure 34 illustre les différents mécanismes physiologiques mis en place par les organismes suite à leur exposition à des contaminants. Il existe donc quatre niveaux dans les mécanismes physiologiques spécifiques à l'état de santé de l'organisme.

Il comprend l'homéostasie, préalablement discutée, la compensation, qui est une réponse à un état de stress, l'absence de compensation qui est la réponse d'un organisme à une maladie curable ou non et la mort de l'organisme (Depeldge et al., 1993). Cette difficulté d'interprétation des variations des biomarqueurs a été rencontrée durant les différentes expériences réalisées. En effet, que signifie une variation significative (positive ou négative) des biomarqueurs ? Il est toujours aussi difficile de répondre à cette question. Chez les organismes étudiés, *C. fluminea* et *S. plana*, la plus grande difficulté est de définir des seuils pour chaque état de santé de l'individu (normal, stress, pathologie). L'utilisation d'une condition non exposée permet de garder le pouvoir prédictif des biomarqueurs. Les modifications des réponses rapportées aux valeurs du contrôle ne traduisent cependant pas l'état de santé de l'organisme. La seconde partie de la figure 33 présente les divers types de réponses des biomarqueurs pouvant être observées suite à l'exposition au contaminant. Selon la durée ou la concentration à laquelle l'exposition a été réalisée, l'évaluation des réponses des biomarqueurs peut se définir comme dans les exemples 1, 2, 3 ou 4. Il est cependant difficile de définir lequel de ces quatre patrons de réponse est le bon, et quel est la relation entre les valeurs mesurées et l'état de santé général des individus sur la base des seules réponses biomarqueurs. D'une manière générale, même si les biomarqueurs sont de bons outils, les temps d'échantillonnage des groupes exposés ne permettent pas toujours de prédire de l'état de santé de l'organisme.

Afin de pallier ces limites d'interprétation, une des propositions possibles serait de mesurer les niveaux des biomarqueurs pour une espèce échantillonnée à différents endroits dont la qualité du milieu est comprise entre moyenne et très bonne à différentes périodes de l'année afin de définir un intervalle pour laquelle l'état de l'organisme est à son niveau de base ((Barrick et al., 2016).

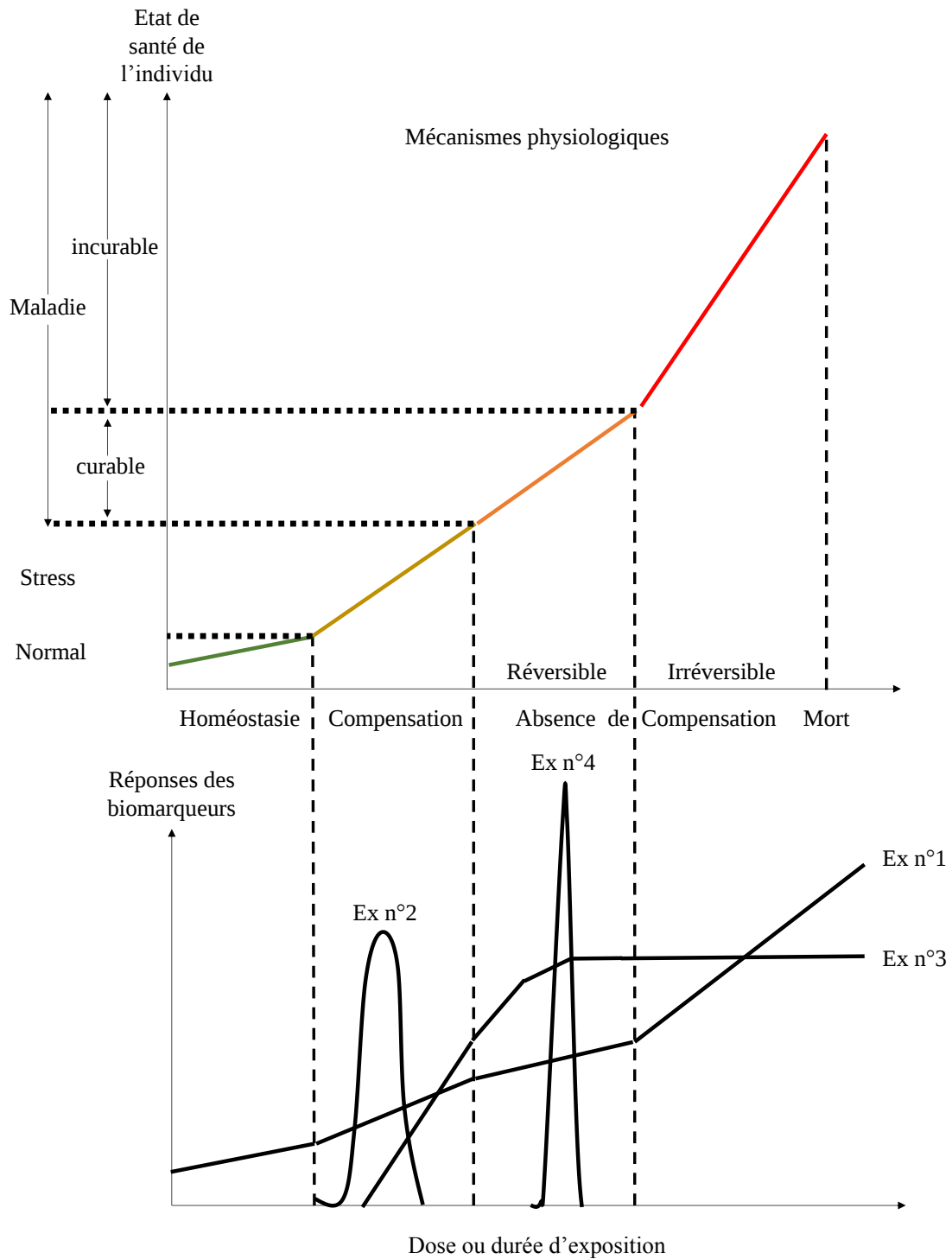


Figure 34 : Mécanismes physiologiques mise en place par les organismes exposés à des contaminants et les réponses des biomarqueurs pouvant être observées (Depeldge et al., 1993). Ex= exemple.

G. Gestion de la donnée

Différents outils statistiques ont été utilisés pour étudier les données des biomarqueurs recueillis suite à l'exposition aux facteurs de multi-stress. Les réponses des biomarqueurs suite à l'exposition aux nanomatériaux ont été séparées en différents groupes de conditions et discriminées en utilisant différents outils statistiques tels que l'analyse en composante principale (ACP), l'analyse linéaire discriminante (LDA), la régression des moindres carrés partiels (PLS) couplée à l'analyse discriminante (Discriminant Analysis, DA) aussi nommé PLS-DA ou encore l'IBR (Integrated Biomarker Response). Ces outils statistiques ont permis d'intégrer de larges jeux de données de biomarqueurs et d'identifier les effets en fonction de différents critères (type de contaminants, concentration du contaminant, temps d'exposition...). Des limites d'utilisation de ces outils ont été observées et ont précédemment été évoquées dans le chapitre II-E (Outils statistiques). La PLS-DA revient souvent comme étant un outil permettant de sélectionner les biomarqueurs les plus impliqués dans la séparation des conditions grâce aux VIP (Variable Importance in the Projection). Ces outils statistiques mettent en évidence les relations entre les conditions d'exposition et les réponses physiologiques, biochimiques et comportementales. Ils ont notamment permis de mettre en évidence que la caspase-3 est systématiquement impliquée dans les réponses aux expositions aux NAP et NM.

Ces études réalisées dans le cadre de NanoSALT pourront être intégrées de manière plus globale par des approches de modélisations telle que l'évaluation du cycle de vie (Life Cycle Assessment : LCA) des nanomatériaux et nanoproduits. L'évaluation du risque environnemental reste cependant difficile dans le domaine des nanotechnologies à cause du manque d'informations sur les quantités de nanomatériaux et nanoproduits libérés dans l'environnement, leur devenir et leur comportement dans le compartiment où elles sont retrouvées. Cette évaluation est défini en trois principales étapes comprenant (i) la formulation de la problématique pour identifier le risque, (ii) l'analyse incluant l'évaluation de l'exposition et des effets toxiques et la caractérisation du danger. Après l'acquisition de ces informations, des modèles prédictifs sont utilisés pour la maîtrise du risque. Au vue de la pluralité des nanomatériaux et nanoproduits, l'une des principales limites de l'utilisation du modèle LCA est qu'il est spécifique d'un type de nanomatériel ou nanoproduits et qu'aucune réponse ne peut être généralisée à l'ensemble des nanotechnologies.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre du programme ANR NanoSALT. Il avait pour objectif de déterminer les effets écotoxicologiques des nanoproduits et des NM d'argent et de dioxyde de cérium à différentes étapes de leur cycle de vie chez deux espèces de bivalves endobenthiques tolérant un large gradient de salinité : *Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana*. L'originalité de notre démarche était d'adopter une approche intégrée des différentes interactions se produisant dans l'environnement suite à l'exposition aux nanoproduits à différents stade de leur cycle de vie et des NM standardisés sur deux espèces euryhalines. Nous nous sommes pour cela inscrit dans une perspective "multi-stress", en couplant l'exposition aux NAP et NM à un stress salin, puis en ajoutant des facteurs de stress liés à la présence d'alimentation et au temps.

En parallèle, la bioaccumulation des métaux suite à l'exposition aux NAP et NM a été étudiée chez les deux espèces de bivalves. Afin de comprendre les réponses à ces différents facteurs de stress, des outils biologiques (biomarqueurs) couvrant une large gamme de fonctions biochimiques, physiologiques et comportementales ont été utilisés. A l'aide d'outils statistiques intégratifs, les réponses des organismes au niveau sub-individuel et individuel ont été décrites et un ensemble de biomarqueurs spécifiques aux types d'exposition a pu être défini.

Les résultats obtenus suite à l'exposition des organismes à un seul stress salin soulignent la nécessité de mieux définir les contours de termes tels qu'euryhalinité ou tolérance. En effet, les deux espèces modèles sont définies par la littérature comme euryhalines, possédant des spectres de tolérance à la salinité très large. Pourtant, nous avons pu mettre en évidence que des réponses sub-létales des organismes étaient mesurables, après 7 jours d'exposition. Les conséquences à long terme de ces modifications physiologiques et comportementales n'ont pas été évaluées, mais il semble néanmoins indispensable de ne pas négliger ce facteur de stress, y compris quand ces variations sont censés être dans le spectre de tolérance de l'espèce cible.

Par ailleurs, la salinité du milieu a également des effets sur le comportement et le devenir des NAP et NM utilisés lors de cette thèse. Ses effets ne sont pas uniformes selon le type de NAP et NM utilisés. Dans le cas de l'argent, la salinité entraîne l'augmentation de la dissolution des NAP et des NM modifiant sa disponibilité pour les organismes tandis que dans le cas du cérium, principalement retrouvés en surface du sédiment, peu de formes labiles sont mesurées.

C'est dans ce contexte de changement de salinité que nous avons évalué les effets écotoxicologiques des différents types NAP et NM testés durant cette thèse. Sur les deux espèces, différents types d'exposition ont été réalisés en micro et mésocosmes, en présence ou en absence d'une ressource alimentaire, le long d'un gradient de salinité (1.5, 15 et 30 psu), à des doses les plus environnementalement réalistes possibles et sur des temps d'exposition pouvant atteindre un mois. La combinaison de plusieurs marqueurs biochimiques et comportementaux (approche multi-biomarqueurs) a permis de mettre en évidence l'effet des NAP et NM standardisés d'argent et de dioxyde de cérium au travers du continuum eau douce-eau de mer sur ces organismes bivalves.

L'approche multi-biomarqueur s'avère indispensable lorsque plusieurs facteurs de stress sont appliqués simultanément. Comme le montre le tableau 4 dans la partie discussion, les biomarqueurs dont les variations permettent de distinguer les conditions expérimentales diffèrent fortement selon la nature et l'amplitude des facteurs de stress. Pour limiter le risque de ne pas détecter un effet écotoxicologique, les approches d'évaluation du risque ont donc tout intérêt à multiplier les réponses biologiques mesurées, surtout dans le cadre du multi-stress.

Au regard des concentrations prédites pouvant être retrouvés dans l'environnement à des seuils inférieurs aux $\mu\text{g/L}$, les effets observés aux concentrations testées et dans les conditions méthodologiques proposés semblent impacter les organismes. Cependant, des effets devront être étudiés d'une part à des niveaux trophiques supérieurs et sur des échelles populationnelles si l'on cherche à accroître encore le réalisme des situations expérimentales. Pour ce faire, il serait intéressant d'étudier le transfert trophique des NAP et NM en mésocosmes mais également d'allonger le temps d'exposition pour étudier les impacts aux niveaux de la descendance.

Bibliographie

- Abele, D., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystems. *Oxidative Stress Aquat. Ecosyst.* 1–5.
- Akberali, H.B., Davenport, J., 1982. The detection of salinity changes by the marine bivalve molluscs *Scrobicularia plana* (Da Costa) and *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 58, 59–71.
- Allsopp, M., Walters, A., Santillo, D., 2007. Nanotechnologies and nanomaterials in electrical and electronic goods: A review of uses and health concerns. *Greenpeace Res. Lab. Lond.*
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Amiard, C., Amiard, J.C., Rainbow, P., 2013. *Ecological Biomarkers: Indicators of ecological effects.* CRC Press.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 15, 87–110. doi:10.1080/10807030802615543
- Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Amiard-Triquet, C., Amiard, C., Mouneyrac, C., 2015. *Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks.* Elsevier, Boston, MA, pp 153-171.
- Anses, 2014. Enjeux et mise à jour des connaissances 19/180.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M.A., others, 1993. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: *Corbiculidae*) in Europe. *Am. Malacol. Bull.* 10, 39–49.
- Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiery, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO₂ nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water Res.* 47, 3921–3930. doi:10.1016/j.watres.2012.11.063
- Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., Rose, J., 2014a. Long-term aging of a CeO₂ based nanocomposite used for wood protection. *Environ. Pollut.* 188, 1–7. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.016

- Auffan, M., Matson, C.W., Rose, J., Arnold, M., Proux, O., Fayard, B., Liu, W., Chaurand, P., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., Di Giulio, R.T., 2014b. Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology* 8, 167–176. doi:10.3109/17435390.2013.869627
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4, 634–641. doi:10.1038/nnano.2009.242
- Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. *Sci. Rep.* 4. doi:10.1038/srep05608
- Banta, G., Andersen, O., 2003. Bioturbation and the fate sediment pollutants. Experimental case studies of selected infauna species. *Vie Milieu* 52, 233–248.
- Bardos, P., Bone, B., Černík, M., Elliott, D.W., Jones, S., Merly, C., 2015. Nanoremediation and International Environmental Restoration Markets. *Remediat. J.* 25, 83–94.
- Barrick, A., Châtel, A., Marion, J.-M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2016. A novel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the marine polychaete *Hediste diversicolor*. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 275–280. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.056
- Bartosz, G., 2003. Bartosz total antioxidant capacity.pdf. *Adv. Clin. Chem.* 37, 219–292.
- Batley, G.E., Halliburton, B., Kirby, J.K., Doolette, C.L., Navarro, D., McLaughlin, M.J., Veitch, C., 2013a. Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel fuel catalyst: Characterization and risk of nano-CeO₂ as a diesel catalyst. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1896–1905. doi:10.1002/etc.2246
- Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J., 2013b. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Acc. Chem. Res.* 46, 854–862. doi:10.1021/ar2003368
- Baumann, J., 2014. The Ecotoxicity of Iron Oxide Nanoparticles - Acute, Chronic and Mixture Effects on *Daphnia magna* -. Bremen.
- Beadle, L.C., Cragg, J.B., 1940. Studies on adaptation to salinity in *Gammarus spp.* *J. Exp. Biol.* 17, 153–163.
- Beisel, J.-N., Peltre, M.-C., Usseglio-Polatera, P., 2011. Impact de la pollution saline sur la biocénose aquatique de la Moselle.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J.R.Statist.Soc.B* 57, 289–300.

- Beresford, Q., Phillips, H., Bekle, H., 2001. The salinity crisis in Western Australia: a case of policy paralysis. *Aust. J. Public Adm.* 60, 30–38.
- Berger, V.J., Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs, in: *Interactions and Adaptation Strategies of Marine Organisms*. Springer, pp. 115–126.
- Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. doi:10.1002/etc.3428
- Boltovskoy, D., Izaguirre, I., Correa, N., 1995. Feeding selectivity of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) on natural phytoplankton. *Hydrobiologia* 312, 171–182.
- Bonnard, M., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 15, 11–26. doi:10.1080/10807030802614934
- Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., others, 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part. *Fibre Toxicol.* 3, 11.
- Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Toxicity of CeO₂ nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology* 1–11. doi:10.3109/17435390.2015.1053422
- Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015b. Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 120, 230–236. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.012
- Britton, J., Morton, B., 1979. *Corbicula* in North América: The evidence reviewed and evaluated, *Proceedings of the First International Corbicula Symposium*. ed. Texas christian University.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 66, 267–278. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.001
- Buffet, P.-E., Amiard-Triquet, C., Dybowska, A., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 191–198. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.07.010
- Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Faverney, C.R., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013a. Biochemical and

- behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 117–124. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.019
- Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Lopes, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Perrein-Ettajani, H., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014a. Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. *Chemosphere* 100, 63–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.069
- Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013b. A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environ. Sci. Technol.* 130110104824003. doi:10.1021/es303513r
- Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84, 166–174. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.003
- Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014b. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114
- Bury, N.R., Hogstrand, C., 2002. Influence of chloride and metals on silver bioavailability to Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Yolk-Sac Fry. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2884–2888. doi:10.1021/es010302g
- Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17–MR71.
- Byrne, R.A., Dietz, T.H., 2006. Ionic and Acid-Base Consequences of Exposure to Increased Salinity in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Biol. Bull.* 211, 66–75.
- Cammen, L.M., Corwin, S., Christensen, J.P., 1990. Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. *Mar Ecol Prog Ser* 65, 171–182.
- Cañedo-Argüelles, M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.-J., 2013. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173, 157–167. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.011

- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21. doi:10.1016/j.marenvres.2011.06.005
- Canesi, L., Corsi, I., 2016. Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.085
- Caputo, F., De Nicola, M., Sienkiewicz, A., Giovanetti, A., Bejarano, I., Licocchia, S., Traversa, E., Ghibelli, L., 2015. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. *Nanoscale* 7, 15643–15656. doi:10.1039/C5NR03767K
- Carregosa, V., Figueira, E., Gil, A.M., Pereira, S., Pinto, J., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2014a. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 171, 36–43. doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.009
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2014b. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 177–178, 1–9. doi:10.1016/j.cbpb.2014.08.001
- Cassee, F.R., Campbell, A., Boere, A.J.F., McLean, S.G., Duffin, R., Krystek, P., Gosens, I., Miller, M.R., 2012. The biological effects of subacute inhalation of diesel exhaust following addition of cerium oxide nanoparticles in atherosclerosis-prone mice. *Environ. Res.* 115, 1–10. doi:10.1016/j.envres.2012.03.004
- Chandrashekar, M.K., Sharma, V.K., 2008. Tidal rhythms, in: *Ultradian Rhythms from Molecules to Mind*. Springer, pp. 201–226.
- Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I., Hackley, V.A., 2011. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Sci. Total Environ.* 409, 2443–2450. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.020
- Ciacci, C., Canonico, B., Bilaničová, D., Fabbri, R., Cortese, K., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., Canesi, L., 2012. Immunomodulation by Different Types of N-Oxides in the Hemocytes of the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE* 7, e36937. doi:10.1371/journal.pone.0036937
- Clavero, M., Araujo, R., Calzada, J., Delibes, M., Fernández, N., Gutiérrez-Expósito, C., Revilla, E., Román, J., 2012. The first invasive bivalve in African fresh waters: invasion portrait and management options: INVASIVE CORBICULA IN AFRICA. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 22, 277–280. doi:10.1002/aqc.2231
- Cleveland, D., Long, S.E., Pennington, P.L., Cooper, E., Fulton, M.H., Scott, G.I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E.J., Wood, L., 2012. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products. *Sci. Total Environ.* 421–422, 267–272. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.01.025

- Collin, B., Auffan, M., Johnson, A.C., Kaur, I., Keller, A.A., Lazareva, A., Lead, J.R., Ma, X., Merrifield, R.C., Svendsen, C., White, J.C., Unrine, J.M., 2014. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. *Env. Sci Nano* 1, 533–548. doi:10.1039/C4EN00149D
- Colman, B.P., Espinasse, B., Richardson, C.J., Matson, C.W., Lowry, G.V., Hunt, D.E., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S., 2014. Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5229–5236. doi:10.1021/es405454v
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1517–1524. doi:10.1021/es404549u
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquat. Toxicol.* 76, 258–267. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.012
- Counts, C., L., 1981. *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Sphaeriacea) in British Columbia. *Nautilus* 95, 12–13.
- Courtemanche, R.J.M., Taylor, N.S., Courtemanche, D.J., 2015. Initiating silver recycling efforts: Quantifying Ag from used burn dressings. *Environ. Technol. Innov.* 4, 29–35. doi:10.1016/j.eti.2015.04.003
- Covich, A.P., Austen, M.C., Bärlocher, F., Chauvet, E., Bradley J. Cardinale, Biles, C.L., Inchausti, P., Dangles, O., Solan, M., Gessner, M.O., Statzner, B., Moss, B., 2004. The role of biodiversity in the functioning of freshwater and marine benthic ecosystems. *BioScience* 54.
- Dahle, J., Arai, Y., 2015. Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 12, 1253–1278. doi:10.3390/ijerph120201253
- Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S., Hickman, J.J., 2007. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 28, 1918–1925. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.036
- Delorenzo, M.E., 2015. Impacts of climate change on the ecotoxicology of chemical contaminants in estuarine organisms. *Curr. Zool.* 61, 641–652.
- Depeldge, M., Amral-Meddes, J., Daniel, B., Halbrook, R., Kloepper-Sams, P., Moore, M., Peakall, D., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach, in: *The Conceptual Basis of the Biomarker Approach*. NATO ASI Series, pp. 15–29.
- Desagher, S., Martinou, J.-C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369–377.

- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna straus*. *Chemosphere* 45, 553–560.
- Direction Générale de la compétitivité de l'industrie et des services (DGCIS, 2011. Les réalités industrielles dans le domaine des nanomatériaux en France: analyse de la réalité du poids des nanomatériaux dans la filière industrielle conernée.
- Dogra, Y., Arkill, K.P., Elgy, C., Stolpe, B., Lead, J., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2016. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress in the sediment-dwelling amphipod *Corophium volutator*. *Nanotoxicology* 10, 480–487. doi:10.3109/17435390.2015.1088587
- Dreamstime, 2016. dreamstime [WWW Document]. URL <https://fr.dreamstime.com>
- Dron, D., Cohen, J.-C., Dambrin, B., Spohr, C., 2011. Impacts à long terme du changement climatique sur le littoral métropolitain.
- Ducrotoy, J.-P., 2010. Les restaurations écologiques des estuaires, Lavoisier. ed. Broché.
- Dunlop, J.E., McGregor, G., Horrigan, N., 2005. Characterisation of impacts and a discussion of regional target setting for riverine ecosystems in Queensland, in: Potential Impacts of Salinity and Turbidity in Riverine Ecosystems, Aquatic Ecosystem Health Unit Water Quality and Monitoring Natural Resource Sciences. The National Action Plan for Salinity and Water Quality, p. 64.
- Dunn, M., Edwards-Jones, V., 2004. The role of acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 30 Suppl S1–S9.
- Durou, C., Smith, B.D., Roméo, M., Rainbow, P.S., Mouneyrac, C., Mouloud, M., Gnassia-Barelli, M., Gillet, P., Deutsch, B., Amiard-Triquet, C., 2007. From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: Assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 402–411. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.02.016
- Dutta, H. M., Haghighi, A. Z., 1986. Methyl mercuric chloride and serum cholesterol level in the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36:181-185.
- Eriksson, L., Johansson, E., Katteneh-Wold, S., 1999. Introduction to Multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA and PLs). *Umetrics Umea Seden* 225–246.
- Eskandani, M., Hamishehkar, H., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., 2013. Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20). *DNA Cell Biol.* 32, 498–503. doi:10.1089/dna.2013.2059
- European Commission, 2011. Commission recommendation of 18/10/2011 on the definition of nanomaterial. Off. J. Eur. Union.
- Evans, L.P., Murphy, C.E., Britton, J.C., Newland, L.W., 1977. Salinity relationships in *Corbicula fluminea* (Müller 1774). *First Int. Corbicula Symp.* 193–214.

- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517–531. doi:10.1016/j.envint.2010.10.012
- Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Mar. Environ. Res.* 76, 114–121. doi:10.1016/j.marenvres.2011.10.003
- Fanlo, I., Ayora, C., 1998. The evolution of the Lorraine evaporite basin: implications for the chemical and isotope composition of the Triassic ocean. *Chem. Geol.* 146, 135–154.
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70.
- Field, C.B., Barros, V.R., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Abdrabo, M.-K., Adger, N., Anokhin, Y.A., Anisimov, O.A., Arent, D.J., Barnett, J., 2014. Summary for policymakers. *Clim. Change 2014 Impacts Adapt. Vulnerability Part Glob. Sect. Asp. Contrib. Work. Group II Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Change* 1–32.
- Fossi-Tankoua, O., 2011. Perturbation du comportement et de la reproduction: des outils pour l'évaluation précoce de la dégradation de la qualité de l'environnement estuarien et côtier. Université de Nantes, Nantes.
- Fossi-Tankoua, O., Buffet, P.-E., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C., Berthet, B., 2011. Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1253–1263. doi:10.1007/s11356-011-0479-3
- Freire, C.A., Welker, A.F., Storey, J.M., Story, K.B., Hermes-Lima, M., 2011. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, Wiley-Blackwell. ed. Abele Doris, Vazquez-Medina José Pablo, Zentno-Savin Tania.
- Frenkiel, L., Mouëza, M., 1979. Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Mar. Biol.* 55, 187–195.
- Frontier, S., Pichod-Viale, D., 1991. *Ecosystèmes: structures, fonctionnement, évolution*, 1er ed, Sciences Sup. Masson.
- Gaffet, E., 2011. *Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development*.
- Gagné, F., 2014. *Biochemical ecotoxicology: principles and methods*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016a. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* in press.

- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016b. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–10. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquat. Toxicol.* 158, 63–74. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.004
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 84, 51–59. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.009
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 208–214. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.004
- Goolish, E.M., Burton, R.S., 1988. Exposure to fluctuating salinity enhances free amino acid accumulation in *Tigriopus californicus* (Copepoda). *J. Comp. Physiol. B* 158, 99–105.
- Gosling, E.M., 2003. Bivalve molluscs: biology, ecology, and culture, Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK. ed, Fishing news books. Fishing News Books, Oxford ; Malden, MA.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2008. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 107, 404–415. doi:10.1093/toxsci/kfn256
- Guerlet, E., 2007. Utilisation de biomarqueurs cellulaires chez plusieurs espèces d'invertébrés pour l'évaluation de la contamination des milieux dulçaquicoles. Université de Metz.
- Guillard, Ryther, 1962. F/2 medium.
- Gupta, S.M., Tripathi, M., 2011. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chin. Sci. Bull.* 56, 1639–1657. doi:10.1007/s11434-011-4476-1
- Hamer, B., Jaksic, Z., Pavici-Hamer, D., Peric, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schroder, H.-C., Muller, W., Smolaka, N., Batel, R., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.* 89, 137–151. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.015
- Hazel, J. R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57:19-42
- Health Canada, 2010. Interim Policy Statement on Health Canada's working Definition for Nanomaterials.

- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120, 437–448.
- Hoecke, K.V., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., Schamphelaere, K.A.C.D., Elsaesser, A., Meeren, P.V. der, Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D., Rydzyński, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., Samber, B.D., Vincze, L., Janssen, C.R., 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4537–4546. doi:10.1021/es9002444
- Hughes, 1969. Study of feeding in *Scrobicularia plana*. *J.mar.biol.Ass.U.K.* 49, 805–823.
- Hughes, R.N., 1970. An Energy Budget for a Tidal-Flat Population of the Bivalve *Scrobicularia plana* (Da Costa). *J. Anim. Ecol.* 39, 357. doi:10.2307/2976
- Inventaire national du patrimoine naturel, 2003. Muséum national d'Histoire naturelle [WWW Document]. URL https://inpn.mnhn.fr/habitat/cd_hab/17394/tab/classification (accessed 11.7.16).
- Isom, B., 1986. Historical review of Asiatic clam (*Corbicula*) invasion and biofouling of waters and industries in the Americas. *Am. Malacol. Bull.* 1–5.
- Janssen, F., Neumann, T., Schmidt, M., 2004. Inter-annual variability in cyanobacteria blooms in the Baltic Sea controlled by wintertime hydrographic conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 275, 59–68.
- Jourmi, L. El, Amine, A., Boutaleb, N., Abouakil, N., Lazar, S., Antri, S. El, 2015. The use of biomarkers (catalase and malondialdehyde) in marine pollution monitoring: Spatial variability. *J. Mater. Environ. Sci.* 6, 1592–1595.
- Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* 400, 396–414.
- Jung, H., Kittelson, D.B., Zachariah, M.R., 2005. The influence of a cerium additive on ultrafine diesel particle emissions and kinetics of oxidation. *Combust. Flame* 142, 276–288. doi:10.1016/j.combustflame.2004.11.015
- Karatayev, A.Y., Padilla, D.K., Minchin, D., Boltovskoy, D., Burlakova, L.E., 2007. Changes in Global Economies and Trade: the Potential Spread of Exotic Freshwater Bivalves. *Biol. Invasions* 9, 161–180. doi:10.1007/s10530-006-9013-9
- Kay, W.R., Halse, S.A., Scanlon, M.D., Smith, M.J., 2001. Distribution and environmental tolerances of aquatic macroinvertebrate families in the agricultural zone of southwestern Australia. *J. North Am. Benthol. Soc.* 20, 182–199.
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

- Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1962–1967.
- Kelly, V.R., Findlay, S.E.G., Schlesinger, W.H., Menking, K., Charttrchyan, A., 2010. Road salt, moving toward the solution.
- Khaksar, M., Jolley, D.F., Sekine, R., Vasilev, K., Johannessen, B., Donner, E., Lombi, E., 2015. In Situ chemical transformations of silver nanoparticles along the water–sediment continuum. *Environ. Sci. Technol.* 49, 318–325. doi:10.1021/es504395m
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D.H., Cho, M.-H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 3, 95–101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825. doi:10.1897/08-090.1
- Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Carley, S., Handy, R.D., Kapustka, L., Nowack, B., Kammer, F. von der, 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 3–14. doi:10.1002/etc.733
- Klein, C.L., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T.A.J., Van Doren, E., De Temmerman, P.-J., Mast, J., Wick, P., Krug, H., Locoro, G., Hund-Rinke, K., Kördel, W., Friedrichs, S., Maier, G., Werner, J., Linsinger, T., Gawlik, B.M., Comero, S., 2011. NM-Series of representative manufactured nanomaterials NM-300 silver characterisation, stability, homogeneity. Publications Office, Luxembourg.
- Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., Self, W.T., 2007. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem. Commun.* 1056. doi:10.1039/b615134e
- Kramer-Wilt, E., 2008. *Corbicula fluminea* (OF Müller, 1774)–Asian Clam.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologies-Aspects fondamentaux, Masson. ed.
- Land & Water Australia, Murray-Darling Basin Commission (Australia), Land & Water Australia, 2007. Salt, nutrient, sediment and interactions: findings from the National River contaminants program. Land and Water Australia, Canberra, A.C.T.
- Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., Blasco, J., 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends Anal. Chem.* 32, 40–59. doi:10.1016/j.trac.2011.09.007
- Levard, C., Mitra, S., Yang, T., Jew, A.D., Badireddy, A.R., Lowry, G.V., Brown, G.E., 2013. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5738–5745. doi:10.1021/es400396f

- Likus, W., Bajor, G., Siemianowicz, K., 2013. Nanosilver-does it have only one face? *Acta Biochim. Pol.* 60, 495–501.
- Limbach, L.K., Bereiter, R., Müller, E., Krebs, R., Gälli, R., Stark, W.J., 2008. Removal of Oxide Nanoparticles in a Model Wastewater Treatment Plant: Influence of Agglomeration and Surfactants on Clearing Efficiency. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5828–5833. doi:10.1021/es800091f
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 380–385.
- Liu, J., Jiang, G. (Eds.), 2015. *Silver Nanoparticles in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Li, Z., Sahle-Demessie, E., Hassan, A.A., Sorial, G.A., 2011. Transport and deposition of CeO₂ nanoparticles in water-saturated porous media. *Water Res.* 45, 4409–4418. doi:10.1016/j.watres.2011.05.025
- Löfgren, S., 2001. The chemical effects of deicing salt on soil and stream water of five catchments in southeast Sweden. *Water. Air. Soil Pollut.* 130, 863–868.
- Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte, S.C., Lead, J.R., 2012. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6893–6899. doi:10.1021/es300839e
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.
- Lucas, A., Rate, A., Zhang, H., Salmon, S.U., Radford, N., 2012. Development of the Diffusive Gradients in Thin Films Technique for the Measurement of Labile Gold in Natural Waters. *Anal. Chem.* 84, 6994–7000. doi:10.1021/ac301003g
- Majdi, N., Bardon, L., Gilbert, F., 2014. Quantification of sediment reworking by the Asiatic clam *Corbicula fluminea* Müller, 1774. *Hydrobiologia* 732, 85–92. doi:10.1007/s10750-014-1849-x
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs: Distribution of Metals in Molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Martínez, M.L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P., Landgrave, R., 2007. The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecol. Econ.* 63, 254–272. doi:10.1016/j.ecolecon.2006.10.022
- McCarthy, M.P., Carroll, D.L., Ringwood, A.H., 2013. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 123–128. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.015
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1235–1244. doi:10.1139/f02-105

- Medler, S., Thompson, C.C., Dietz, T.H., Silverman, H., 1999. Ionic effects on intrinsic gill muscles in the freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 122, 163–172.
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., 2006. Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat. Sci.* 68, 434–442. doi:10.1007/s00027-006-0858-x
- Meybeck, M., Helmer, R., 1989. The quality of rivers, from pristine stage to global pollution. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. Glob. Planet. Change Sect.* 75, 283–309.
- Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J. Hazard. Mater.* 225–226, 139–145. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.009
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014
- Morton, B., 1982. Some aspects of the population structure and sexual strategy of *Corbicula cf. fluminalis* (Bivalvia: *Corbiculacea*) from the Pearl River, People's Republic of China. *J. Molluscan Stud.* 48, 1–23.
- Morton, B., Tong, K.Y., 1985. The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: *Corbiculoidea*) from Hong Kong. *Malacol. Rev.* 18, 91–95.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestoigammarus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Métais, I., Durou, C., Minier, C., Pellerin, J., 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 133–141. doi:10.1016/j.ygcen.2008.04.010
- Mueller S, Riedel HD, Stremmel W: Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 90: 4973-4978, 1997.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4447–4453. doi:10.1021/es7029637
- Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 92, 592–599. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.060
- Nanotechproject, 2016. Nanotechproject [WWW Document]. Proj. Emerg. Nanotechnologies. URL <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/?sort=-timestamp> (accessed 8.25.16).
- Nanotechproject, 2011. The project on emerging nanotechnologies [WWW Document]. URL <http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/> (accessed 5.7.16).

- Navya, P.N., Daima, H.K., 2016. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Conver.* 3. doi:10.1186/s40580-016-0064-z
- Nedea, E.J., Smith, Allan K., Stone, J., Jepsen, S., 2009. Freshwater mussels of the Pacific Northwest, second edition. ed. The Xerces Society in Portland, Oregon.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311, 622–627. doi:10.1126/science.1114397
- Ng, T., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P., Amiard, J., Wang, W., 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 299, 179–191. doi:10.3354/meps299179
- Nikalje, A.P., 2015. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med. Chem.* 5. doi:10.4172/2161-0444.1000247
- Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Sci. Total Environ.* 540, 43–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.045
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22. doi:10.1016/j.envpol.2007.06.006
- OECD, 2016. OECD, [WWW Document]. OECD Better Policies Better Lives. URL <http://www.oecd.org/science/nanosafety/> (accessed 1.9.16).
- OFI asset management, 2016. Les nanotechnologies [WWW Document]. OFI-AmFr. URL http://www.ofi-am.fr/actualites.php?art_id=4005 (accessed 8.31.16).
- Organisation internationale de normalisation, 2015. ISO/TS 80004-2:2015(fr) [WWW Document]. URL <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:fr>
- Pan, J.-F., Buffet, P.-E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Joubert, Y., Pilet, P., Guibolini, M., Risso de Faverney, C., Roméo, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environ. Pollut.* 168, 37–43. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.051
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.-P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., Martin, P., 2008. Hazard and Risk Assessment of a Nanoparticulate Cerium Oxide-Based Diesel Fuel Additive—A Case Study. *Inhal. Toxicol.* 20, 547–566. doi:10.1080/08958370801915309
- Park, B., Martin, P., Harris, C., Guest, R., Whittingham, A., Jenkinson, P., Handley, J., 2007. Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of Envirox™ – a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. *Part. Fibre Toxicol.* 4, 12. doi:10.1186/1743-8977-4-12

- Pathak, Y., Thassu, D. (Eds.), 2009. Drug delivery nanoparticles formulation and characterization, Drugs and the pharmaceutical sciences. Informa Healthcare, New York.
- Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7981–7989. doi:10.1128/AEM.00650-10
- Periasamy, A.P., Umasankar, Y., Chen, S.-M., 2009. Nanomaterials - Acetylcholinesterase Enzyme Matrices for Organophosphorus Pesticides Electrochemical Sensors: A Review. Sensors 9, 4034–4055. doi:10.3390/s90604034
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. J. Exp. Biol. 210, 2999–3014. doi:10.1242/jeb.006007
- Petersen, K., Kristensen, E., Bjerregaard, P., 1998. Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. Mar. Environ. Res. 45, 403–415.
- Petridis, P., Jha, A.N., Langston, W.J., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. Aquat. Toxicol. 94, 8–15. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.010
- Pfenninger, M., Reinhardt, F., Streit, B., 2002. Evidence for cryptic hybridization between different evolutionary lineages of the invasive clam genus *Corbicula* (Veneroida, Bivalvia). J. Evol. Biol. 15, 818–829.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Piscart, C., 2004. Rôle de la salinité dans la dynamique et la régulation de la biodiversité des communautés de macroinvertébrés dulçaquicoles. Metz.
- Piscart, C., Usseglio-Polatera, P., Moreteau, J.-C., Beisel, J.-N., 2006. The role of salinity in the selection of biological traits of freshwater invertebrates. Arch. Für Hydrobiol. 166, 185–198. doi:10.1127/0003-9136/2006/0166-0185
- Pratihary, A.K., Naqvi, S.W., Naik, H., Thorat, B.R., Narvenkar, G., Manjunatha, .R., Rao, V.P., 2009. Benthic fluxes in a tropical Estuary and their role in the ecosystem. Estuar. Coast. Shelf Sci. 85, 387–398.
- Pritchard, D.W., 1967. What is an Estuary:Physical viewpoint. Am. Assoc. Adv. Sci. 3–5.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. BioMed Res. Int. 2014, 1–19. doi:10.1155/2014/761264

- Rajapogal, S., Van des Velde, G., Bij de Vaate, A., 2000. Reproductive biology of the Asiatic clams *Corbicula fluminalis* and *Corbicula fluminea* in the river Rhine. Arch. Für Hydrobiol. 149, 403–420.
- Raleigh, J., Keegan, B., 2006. The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (Mollusca: Bivalvia) in Mweeloon Bay (Galway, west coast of Ireland). J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 86, 1157–1162.
- Rao, C.N.R., Thomas, P.J., Kulkarni, G.U., 2007. Basics of Nanocrystals. Nanocrystals Synth. Prop. Appl. 1–23.
- Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Toxicol. Chem. 18, 89–108.
- Raven, P.H., Johnson, G., Losos, J., Singer, S., 2007. Biologie, 1st ed. ed. De Boeck Unviersité, Bruxelles.
- R core team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R [WWW Document]. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reid, W.V., Millennium Ecosystem Assessment, World Resources Institute (Eds.), 2005. Ecosystems and human well-being: synthesis ; a report of the Millennium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington, DC.
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K., Lynch, I., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. Materials 6, 2295–2350. doi:10.3390/ma6062295
- Renard, E., Bachman, V., Cariou, M.L., Moreteau, J.C., 2000. Morphological and molecular differentiation of invasive freshwater species of the genus *Corbicula* (Bivalvia, *Corbiculidea*) suggest the presence of three taxa in French rivers. Mol. Ecol. 9, 2009–2016. doi:10.1046/j.1365-294X.2000.01104.x
- Rice, K.M., Nalabotu, S.K., Manne, N.D.P.K., Kolli, M.B., Nandyala, G., Arvapalli, R., Ma, J.Y., Blough, E.R., 2015. Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs. J. Prev. Med. Pub. Health 48, 132–141. doi:10.3961/jpmph.15.006
- Ricklefs, R.E., Miller, G.L., 2005. Ecologie. De Boeck Supérieur.
- Risso-de-Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.-P., Rahmani, R., 2001. Toxic Effects of Wastewaters Collected at Upstream and Downstream Sites of a Purification Station in Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 129–141. doi:10.1007/s002440010230
- Rivera-Ingraham, G.A., Barri, K., Boe l, M., Farcy, E., Charles, A.-L., Geny, B., Lignot, J.-H., 2016. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? J. Exp. Biol. 219, 80–89. doi:10.1242/jeb.128595

- Rocha, T.L., Gomes, T., Sousa, V.S., Mestre, N.C., Bebianno, M.J., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Mar. Environ. Res.* doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.013
- Roder, C., Berumen, M.L., Bouwmeester, J., Papathanassiou, E., Suwailem, A. Al-, Voolstra, C.R., 2013. First biological measurements of deep-sea corals from the Red Sea. *Sci. Rep.* 3. doi:10.1038/srep02802
- Roebben, G., Rasmussen, K., Kestens, V., Linsinger, T.P.J., Rauscher, H., Emons, H., Stamm, H., 2013. Reference materials and representative test materials: the nanotechnology case. *J. Nanoparticle Res.* 15. doi:10.1007/s11051-013-1455-2
- Rondon, C., 2010. Etude des mécanismes de libération d'actif nanodispersé-Application au traitement de puits. Université Bordeaux 1.
- SAGE du Marais et du bassin versant de la Baie de Bourgneuf, Observatoire de l'eau du bassin de la Baie de Bourgneuf, 2016. Suivi de la qualité de l'eau superficielle du bassin versant de la Baie de Bourgneuf.
- Salama, R.B., Otto, C.J., Fitzpatrick, R.W., 1999. Contributions of groundwater conditions to soil and water salinization. *Hydrogeol. J.* 7, 46–64.
- Salieri, B., 2013. The challenges and the limitations in life cycle impact assessment for metal oxide nanoparticles, a case study on nano-TiO₂. Bologna.
- Santos, S., Luttikhuisen, P.C., Campos, J., Heip, C.H.R., van der Veer, H.W., 2011. Spatial distribution patterns of the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along the European coast: A review. *J. Sea Res.* 66, 238–247. doi:10.1016/j.seares.2011.07.001
- Schmidt-Nielsen, K., 1997. Animal physiology, adaptation and environment, 5th Ed. ed. Cambridge University Press.
- Schoffeniels, E., Gilles, R., 1971. Iono and osmoregulation in *Mollusca*, M.Florkin and B.T. Scheer. ed, Academic press. New York.
- Schwabe, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., Quad, A. von, Nowack, B., 2015. Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂ - nanoparticles by three crop plants. *Metallomics* 7, 466–477. doi:10.1039/C4MT00343H
- Seitkalieva, A.V., Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2015. Phosphatases of echinoderms and bivalve mollusks of the Japan and Okhotsk seas. *Russ. J. Mar. Biol.* 41, 51–59. doi:10.1134/S1063074015010071
- Selvan, V.A.M., Anand, R.B., Udayakumar, M., 2009. Effects of cerium oxide nanoparticle addition in diesel and diesel–biodiesel–ethanol blends on the performance and emission characteristics of a CI engine. *J Eng Appl Sci* 4, 1819–6608.
- Sereda, J., Bogard, M., Hudson, J., Helps, D., Dessouki, T., 2011. Climate warming and the onset of salinization: Rapid changes in the limnology of two northern plains lakes. *Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters* 41, 1–9. doi:10.1016/j.limno.2010.03.002

- Singh, A., 2015. Engineered nanoparticles: structure, properties and mechanisms of toxicity. Academic Press.
- Singh, C., Friedrichs, S., Ceccone, G., Gibson, N., Alstrup Jensen, K., Levin, M., Goenaga Infante, H., Carlander, D., Rasmussen, K., Institute for Health and Consumer Protection, 2014. Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, characterisation and test item preparation JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Publications Office, Luxembourg.
- Sokolova, I.M., Bock, C., Pörtner, H.-O., 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I: Anaerobic metabolism and energetics. J. Comp. Physiol. B 170, 91–103.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Mar. Environ. Res. 79, 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003
- Sola, J.C.J., 1997. Reproduction, population dynamics, growth and production of *Scrobicularia plana* *da costa* (pelecypoda) in the Bidasoa estuary, Spain. Neth. J. Sea Res. 30, 282–296. doi:10.1007/BF02085872
- Solé, M., Kopecka-Pilarczyk, J., Blasco, J., 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. Environ. Int. 35, 523–531. doi:10.1016/j.envint.2008.09.013
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. Ann. Limnol. - Int. J. Limnol. 44, 85–94. doi:10.1051/limn:2008017
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharm. Res. 21, 201–230.
- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. J. Invertebr. Pathol. 55, 118–125.
- Tella, M., Auffan Mélanie, Brousset Lenka, Issartel Julien, Kieffer Isabelle, Pailles Christine, Morel Elise, Santaella Catherine, Angeletti Bernard, Artells Ester, Rose Jérôme, Thiéry Alain, Bottero Jean-Yves, 2014. Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b
- Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. Environ. Sci. Technol. 40, 6151–6156. doi:10.1021/es060999b
- UNESCO/ICES/SCOR/IAPSO, 1981. Background papers and supporting data on the Practical Salinity Scale 1978.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Vale, G., Franco, C., Diniz, M.S., Santos, M.M.C. dos, Domingos, R.F., 2014. Bioavailability of cadmium and biochemical responses on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* – the role of TiO₂ nanoparticles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 109, 161–168. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.035
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquat. Toxicol.* 170, 162–174. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.019
- van Dooremalen C, Ellers J, 2010. A moderate change in temperature induces changes in fatty acid composition of storage and membrane lipids in a soil arthropod. *J Insect Physiol* 56:178–184
- Vengosh, A., 2014. Salinization and Saline Environments, in: *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, pp. 325–378.
- Verdelhos, T., Cardoso, P.G., Dolbeth, M., Pardal, M.A., 2014. Recovery trends of *Scrobicularia plana* populations after restoration measures, affected by extreme climate events. *Mar. Environ. Res.* 98, 39–48. doi:10.1016/j.marenvres.2014.03.004
- Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015a. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecol. Indic.* 52, 96–104. doi:10.1016/j.ecolind.2014.11.022
- Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015b. Behavioral and mortality responses of the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule* to temperature, as indicator of climate change's potential impacts. *Ecol. Indic.* 58, 95–103. doi:10.1016/j.ecolind.2015.05.042
- Vidal, M.-L., 2001. L'UNIVERSITE BORDEAUX I. Université Bordeaux I.
- Vilgrain, V., Ronot, M., Abdel-Rehim, M., Zappa, M., Assignies, G. d', Bruno, O., Vullierme, M.-P., 2013. Hepatic steatosis: A major trap in liver imaging. *Diagn. Interv. Imaging* 94, 713–727. doi:10.1016/j.diii.2013.03.010
- Vinu Chandran, R., 2002. Intracellular osmoregulation in the estuarine mollusc *villorita cyprinoides* Var. *cochinensis* (Mollusca: Bivalvia) Hanley. Cochin University of Science and Technology, India.
- Voyer, R., Cardin, J., Heltshe, J., Hoffman, G., 1982. Viability of embryos of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* exposed to mixtures of cadmium and silver in combinaison with selected fiwed salinities. *Aquat. Toxicol.* 2, 223–233.
- Waldbusser, G.G., Marinelli, R.L., Whitlatch, R.B., Visscher, P., 2004. The Effects of Infaunal Biodiversity on Biogeochemistry of Coastal Marine Sediments. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1482–1492.

- Wallace, W.J., 1974. The Development of the Chlorinity/ Salinity Concept in Oceanography, Elsevier Oceaography series. ed. Elsevier Scientific publishing company, New York.
- Wang, Z., Zhao, J., Li, F., Gao, D., Xing, B., 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles, *Chemosphere*, 77 (1): 67-73
- Wang, H., Burgess, R.M., Cantwell, M.G., Portis, L.M., Perron, M.M., Wu, F., Ho, K.T., 2014. Stability and aggregation of silver and titanium dioxide nanoparticles in seawater: Role of salinity and dissolved organic carbon: Stability and aggregation of silver and titanium dioxide. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1023–1029. doi:10.1002/etc.2529
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002
- Way, C.M., Hornbach, D., Miller-Way, C.A., Payne, B., Miller, A., 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Can. J. Zool.* 68, 115–120.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., Goetz, N. von, 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242–2250. doi:10.1021/es204168d
- Welsh, D.T., 2003. It's a dirty job but someone has to do it: The role of marine benthic macrofauna in organic matter turnover and nutrient recycling to the water column. *Chem. Ecol.* 19, 321–342.
- Williams, W.D., 2001. Anthropogenic salinisation of inland waters, in: *Saline Lakes*. Springer, pp. 329–337.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2004. *Environmental physiology of animals*, 2nd ed. Wiley-Blackwell.
- Wong, K.K.Y., Liu, X., 2010. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *MedChemComm* 1, 125. doi:10.1039/c0md00069h
- Yazami, R. (Ed.), 2014. *Nanomaterials for lithium-ion batteries: fundamentals and applications*. Pan Stanford Publ, Singapore.
- Zeyons, O., 2008. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Zhang, H., Davison, W., 2001. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin film (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. *Pure Appl Chem* 73, 9–15.
- Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO₂ exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3725–3730. doi:10.1021/es103309n
- Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K.-B., Garfunkel, E., Schwander, S., Tetley, T.D., Chung, K.F., Porter, A.E., Ryan, M., Kipen, H., Liou, P.J., Mainelis, G., 2013. Impacts of a nanosized ceria additive on diesel engine emissions of particulate and gaseous pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13077–13085. doi:10.1021/es402140u

- Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y., Zhang, Z., 2012. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89, 530–535. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.044
- Zinchenko, T.D., Golovatyuk, L.V., 2013. Salinity tolerance of macroinvertebrates in stream waters (review). *Arid Ecosyst.* 3, 113–121. doi:10.1134/S2079096113030116

Thèse de Doctorat

Carole BERTRAND

Nanomatériaux à travers un gradient de salinité : exposition et effets ecotoxicologiques au cours de leur cycle de vie

Nanomaterials across a salinity gradient: exposure and ecotoxicological effects within a life cycle perspective

Résumé

Les nanotechnologies sont en plein essor grâce aux nombreuses innovations et opportunités industrielles qu'elles offrent. Les nanomatériaux manufacturés (NM) présentent des propriétés physico-chimiques particulières, bien différentes de celles des matériaux conventionnels. A ce jour, un grand nombre d'incertitudes demeurent sur les effets des NM, qui se retrouvent libérés accidentellement ou non dans l'environnement. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR NanoSALT et a été réalisée dans 2 laboratoires partenaires : LIEC (Metz) et MMS (Angers-Nantes). Les objectifs étaient d'évaluer en milieu aquatique, l'impact de NM d'argent et de dioxyde de cérium sur deux espèces de bivalves couvrant un large gradient de salinité, *Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana*. Les organismes ont été exposés à des doses chroniques et réalistes de ces NM à différents stades de leur cycle de vie et à différentes salinités. Les recherches ont été menées en laboratoire, en utilisant des conditions d'exposition de plus en plus réalistes d'un point de vue environnemental (micro- et mésocosmes). Ce travail montre l'impact de la salinité sur les caractéristiques physico-chimiques et le devenir des NM. L'évaluation de l'écotoxicité des NM sur les deux modèles biologiques en intégrant plusieurs marqueurs biochimiques et comportementaux (approche multi-biomarqueurs) a permis de mettre en évidence l'effet des NM au travers du continuum eau douce-eau de mer sur ces organismes bivalves.

Mots clés

nanomatériaux, *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, micro-mésocosme, dioxyde de cérium, argent

Abstract

Due to numerous innovations and industrial opportunities, increased attention is given to nanotechnology. Nanomaterials present particular physico-chemical properties, largely different in comparison to the bulk material. A large number of uncertainties remains on accidental (or not) release of engineered nanomaterials (ENM) at different stages of the value chain (usage, end of life) in aquatic environment. In the framework of the ANR NanoSALT program, this PhD has been achieved in two partner laboratories (LIEC (Metz) and MMS (Angers-Nantes)). The aim was to assess the impact of silver and cerium dioxide ENM on two bivalve species living across a large salinity gradient, *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. Organisms have been exposed to realistic and chronic ENM concentrations at different stage of the value chain and at different salinities. Research have been conducted in laboratory using more and more realistic exposure conditions (micro and mesocosm). This work highlight salinity impact on physico-chemical fate and behavior on ENM. Ecotoxicity assessment of ENM on both endobenthic species, using a battery of biochemical and behavioral biomarkers (multi-marker approach), allowed to highlight ENM effects through fresh-marine water continuum on both bivalves.

Key Words

nanomaterials, *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, micro-mesocosm, cerium dioxide, silver