

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE VENAM

2012

N°

Evaluation du risque environnemental des nanoparticules métalliques : biodisponibilité et risque potentiel pour deux espèces clés des écosystèmes estuariens

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline Pharmacie
Spécialité Écotoxicologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Pierre-Emmanuel BUFFET

Le 26 octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Président	Mr BUSTAMANTE P., Professeur, Université de La Rochelle
Rapporteurs	Mme BEBIANNO M., Professeur, Algarve, Portugal
	Mr BOTTERO J-Y., Directeur de recherche CNRS, Aix-en-Provence
Examineurs	Mme GIAMBERINI L., Professeur, Université de Lorraine
	Mme POIRIER L., Maître de conférences, Université de Nantes

Mme AMIARD-TRIQUET C., Directrice de recherche CNRS, Université de Nantes
Mme MOUNEYRAC C., Professeur, Université Catholique de l'Ouest

Résumé

L'avènement des nanotechnologies conduit à l'augmentation de la production de nanoparticules qui pourraient être libérées dans l'environnement. Les nanoparticules métalliques sont utilisées dans diverses applications commerciales (bactéricides, protection UV, imagerie médicale) et leur toxicité est une source de préoccupation. Le but de ce travail a été d'évaluer le devenir de nanoparticules métalliques (Ag, Au, CuO, Cd, ZnO) dans l'environnement marin ainsi que leurs effets sur deux invertébrés marins endobenthiques : le bivalve *Scrobicularia plana* et le ver *Hediste diversicolor* en utilisant un ensemble de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (comportement, réponses biochimiques et génotoxicité). Les effets ont été évalués après l'exposition à différentes sources environnementales (eau, nourriture, sédiments indépendamment ou en combinaison dans des mésocosmes). Dans un certain nombre de cas, ce travail révèle un effet toxique des nanoparticules qui n'est pas dû au métal constitutif mais directement aux propriétés nanoparticulaires. Les résultats montrent que les biomarqueurs sont des outils prometteurs pour évaluer l'écotoxicité des nanoparticules et pourrait être utilisés pour améliorer l'évaluation des risques.

Mots-clés: Nanoparticules métalliques, Ecotoxicité, Biomarqueurs, *Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*

The advent of nanotechnologies is leading to the increase production of nanoparticles which could be released in the environment. Metal nanoparticles are used in a variety of commercial applications (bactericides, UV protection, medical imaging) and their toxicity is a source of concern. The aim of this work was to evaluate the fate of metal-bearing nanoparticles (Ag, Au, CuO, Cd, ZnO) in the marine environment and their effects on two marine endobenthic species : the bivalve *Scrobicularia plana* and the worm *Hediste diversicolor* by using a set of biomarkers at different levels of biological organization (behaviour, biochemical responses and genotoxicity). Effects were evaluated after exposure to different environmental sources (water, food, sediment independently or combined in mesocosms). In a number of cases, our work revealed a toxic effect of nanoparticles which is not due to the constituent metal but directly to the nanoproperties. Results show that biomarkers are promising tools to evaluate the ecotoxicity of nanoparticles and could be used to improve risk assessment.

Keyword: Metallic Nanoparticles, Ecotoxicity, Biomarkers, *Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*

Table des matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	11
Communication des travaux de recherche.....	12
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	19
Première partie : Les Enjeux Technologiques et Economiques des Nanoparticules.....	19
1. Propriétés spécifiques des nanoparticules.....	21
1.1. Définitions.....	21
1.2. Effet de la taille des nanoparticules	22
1.3. Effet de l'augmentation de l'activité surfacique.....	23
1.4. Influence de l'effet quantum	24
2. Origines des nanoparticules.....	24
2.1. Nanoparticules d'origine naturelle.....	24
2.2. Nanoparticules générées involontairement par les activités humaines	25
2.3. Nanoparticules manufacturées.....	25
3. Synthèse des nanoparticules	26
3.1. Approche ascendante « Bottom-up »	26
3.2. Approche descendante « Top-down ».....	27
4. Les types de nanoparticules manufacturées et leurs usages.....	28
4.1. Les carbones	28
4.2. Les métaux et oxydes métalliques	29
5. Les enjeux économiques des nanoparticules	31
6. Réglementation sur les nanotechnologies.....	33
6.1. En Europe.....	33
6.2. En France	34
Deuxième partie : Les Enjeux Environnementaux et Sanitaires des Nanoparticules.....	35
1. Comprendre le devenir des nanoparticules entrant dans l'environnement	38
1.1. Les nanoparticules atmosphériques	39
1.2. Les nanoparticules en phase aqueuse.....	41

1.3.	Les nanoparticules dans les sols et les sédiments	43
1.4.	Les outils de caractérisation des nanoparticules dans l'environnement.....	44
2.	La toxicité des nanoparticules pour l'homme.....	45
2.1.	Le stress oxydant	46
2.2.	Apoptose/nécrose.....	47
2.3.	Génotoxicité	47
3.	Ecotoxicité des nanoparticules dans l'environnement.....	48
3.1.	Bioaccumulation des nanoparticules dans les organismes	67
3.2.	Toxicité des nanoparticules pour les micro-organismes	68
3.3.	Toxicité des nanoparticules dans l'eau douce	68
3.4.	Toxicité des nanoparticules dans l'eau de mer.....	70
3.5.	Toxicité des nanoparticules via l'alimentation.....	71
3.6.	Toxicité des nanoparticules dans le sol et les sédiments	71
4.	Les outils pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules pour la santé et l'environnement. ..	72
4.1.	Echelle cellulaire	72
4.1.1.	Métallothionéine	74
4.1.2.	Catalase	75
4.1.3.	Glutathion S-transférase	76
4.1.4.	Superoxyde dismutase.....	76
4.1.5.	Lactate déshydrogénase.....	77
4.1.6.	Acétylcholinestérase.....	77
4.1.7.	Thiobarbituric réactive substances	78
4.1.8.	Caspase-3.....	78
4.1.9.	Test des comètes	79
4.2.	De l'échelle individuelle vers la population	79
5.	Adapter les techniques et les protocoles aux études écotoxicologiques sur les nanoparticules	80
	Synthèse du chapitre 1	82
	Chapitre 2 : Démarche scientifique	83
1.	Les espèces sentinelles pour l'étude des effets écotoxicologiques des nanoparticules	85
1.1.	Les espèces sentinelles	85
1.2.	Des espèces cibles des nanoparticules	87
2.	<i>Scrobicularia plana</i> (da Costa, 1778).....	87
2.1.	Répartition géographique	88

2.2.	Régime alimentaire	88
2.3.	Biologie de la reproduction	89
3.	<i>Hediste diversicolor</i> (O. F. Muller, 1776)	90
3.1.	Répartition géographique	90
3.2.	Régime alimentaire	91
3.3.	Biologie de la reproduction	92
4.	Choix du site de prélèvement	93
5.	Réflexion sur le choix des nanoparticules étudiées	95
6.	Réflexion sur le design expérimental.....	97
6.1.	Choix des milieux d'exposition.....	97
6.2.	Approcher les conditions environnementales	98
6.2.1.	Utilisation de dose réaliste.....	98
6.2.2.	Reproduire les conditions de l'environnement	99
7.	Techniques envisagées pour comprendre le comportement et les effets des nanoparticules dans l'environnement.....	102
7.1.	Evaluation de l'exposition aux nanoparticules.....	103
7.1.1.	Caractérisation des nanoparticules dans le milieu d'exposition	103
7.1.2.	Les capteurs passifs (Diffusive Gradients in Thin film: DGT).....	105
7.1.3.	Dosages des nanoparticules dans les sédiments marquage avec des isotopes	106
7.2.	Evaluation de la bioaccumulation dans les tissus mous des invertébrés	107
7.3.	Localisation des nanoparticules dans les tissus des invertébrés	107
7.4.	Les biomarqueurs biochimiques	108
7.5.	Les biomarqueurs du comportement.....	110
7.6.	La génotoxicité	112
	Synthèse du chapitre 2	114
	Chapitre 3 : Effet de la taille des nanoparticules d'or sur la localisation, la bioaccumulation et les réponses biochimiques et comportementales chez <i>Scrobicularia plana</i>.	117
1.	Contexte de l'étude.....	119
	Publication 1: Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam <i>Scrobicularia plana</i>	123
	Publication 2: Gold nanoparticles localization and cellular damage in the estuarine bivalve <i>Scrobicularia plana</i>	133
2.	Résultats additionnels	158
3.	Conclusion et perspectives	159

Synthèse du chapitre 3	161
Chapitre 4 : Réponses biochimiques et comportementales des invertébrés <i>Scrobicularia plana</i> et <i>Hediste diversicolor</i> exposés aux nanoparticules d'argent par la colonne d'eau ou l'alimentation.	163
1. Contexte de l'étude.....	165
Publication 3 : Behavioural and biochemical responses of the endobenthic bivalve <i>Scrobicularia plana</i> to silver nanoparticles in seawater and microalgal food.....	169
2. Résultats complémentaires	195
3. Conclusion et perspectives	197
Chapitre 5 : Réponses biochimiques et comportementales des invertébrés <i>Scrobicularia plana</i> et <i>Hediste diversicolor</i> exposés aux quantum dots de sulfure de cadmium par la colonne d'eau ou l'alimentation.	199
1. Contexte de l'étude.....	201
Publication 4 : Behavioural and biochemical responses of the endobenthic invertebrates <i>Scrobicularia plana</i> and <i>Hediste diversicolor</i> to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure.....	203
2. Conclusion et perspectives	228
Synthèse des chapitres 4 et 5.....	230
Chapitre 6 : Comportement des nanoparticules d'oxyde de zinc marquées par un isotope stable (⁶⁷Zn) dans le sédiment et leurs effets sur deux espèces endobenthiques <i>Scrobicularia plana</i> et <i>Hediste diversicolor</i>.	231
1. Contexte de l'étude.....	233
Publication 5 : Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam <i>Scrobicularia plana</i> and the ragworm <i>Hediste diversicolor</i>	237
2. Conclusion et perspectives	247
Synthèse du chapitre 6	248
Chapitre 7 : Réponses comportementales et biochimiques de deux invertébrés marins <i>Scrobicularia plana</i> et <i>Hediste diversicolor</i> exposés à des nanoparticules d'oxyde de cuivre: Comparaison d'une expérience en laboratoire et d'une expérience en mésocosme	249
1. Contexte de l'étude.....	251
Publication 6: Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates <i>Scrobicularia plana</i> and <i>Hediste diversicolor</i> to copper oxide nanoparticles.....	253
Publication 7 : A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (<i>Scrobicularia plana</i> , <i>Hediste diversicolor</i>)	265
2. Conclusion et perspectives	294

Synthèse du chapitre 7	298
Conclusion générale et perspectives.....	299
1. Les nouveaux concepts pour les études de nanotoxicologie et de nanoécotoxicologie	301
1.1. La concentration n'est plus suffisante pour décrire l'exposition	302
1.2. Stabilité et dissolution.....	302
1.3. La bioaccumulation des NP dans les invertébrés aquatiques	303
1.4. Les biomarqueurs : des outils adaptés aux études d'écotoxicologie sur les NP	304
2. La gestion du risque.....	305
2.1. LCA : un outil important.....	307
2.2. Control banding	308
Bibliographie.....	311
Annexe 1	333
Annexe 2	334
Annexe 3	335

Liste des figures

Figure 1 : Les différents types de nano-objets (Iso 2008).	21
Figure 2 : Stratégies bottum-up et top-down modifiées d'après Nam et Lead (2008).	27
Figure 3 : Structure des nanoparticules de carbone (C60, nanotube de carbone mono-couche et multi-couches).	28
Figure 4 : Evolution du nombre de nano-produits commercialisés de 2005 à 2010 d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (Woodrow Wilson).	31
Figure 5 : Répartition des nano-produits commercialisés dans les différents secteurs d'activités d'après la base de données The Project on Emerging Nanotechnologies (Woodrow Wilson).	32
Figure 6 : Evolution du marché des nanotechnologies d'après Hullmann (2006) et Hwang and Bradley (2010).	32
Figure 7 : Les voies d'entrée des nanoparticules dans l'environnement d'après the Royal commission on Environmental pollution (2008).	37
Figure 8 : Propriétés à prendre en compte dans la caractérisation des nanoparticules d'après Hassellöv et Kaegi (2009).	39
Figure 9 : Origine et évolution saisonnière des densités des particules mesurées dans l'air de villes du Royaume Unis d'après Hester et Harrison (2007).	40
Figure 10 : Devenir des nanoparticules dans l'environnement d'après Klaine et al. (2008).	41
Figure 11 : Formation d'agglomérats, d'aggrégats et fonctionnalisation des nanoparticules dans l'environnement.	42
Figure 12 : Interaction entre les nanoparticules, les polluants et les organismes dans l'environnement d'après Novack et Buchelli (2007).	43
Figure 13 : Biomarqueurs de défense et de dommage impliqués dans la réponse des organismes face aux nanoparticules.	74
Figure 14 : Régime alimentaire mixte de <i>S. plana</i> suspensivore à marée haute (A) et dépositivore à marée basse (B) (photographie : Rodger Jackman).	89
Figure 15 : Régime alimentaire de <i>H. diversicolor</i> captation en surface (A), captation en surface par l'intermédiaire de filet de mucus (B), captation de la nourriture dans le terrier (C) (Illustrations: Hughes 1969).	92
Figure 16 : Localisation du site de collecte, la Baie de Bourgneuf sur la façade atlantique.	93
Figure 17 : Photographie du site de collecte (photographie : P-E. BUFFET, Janvier 2010).	94

Figure 18 : Pourcentage des différentes NP métalliques étudiées dans un échantillon de 101 articles scientifiques sur la toxicité et l'écotoxicité des NP.	96
Figure 19 : Pourcentage des milieux d'exposition choisis dans un échantillon de 51 articles scientifiques sur l'écotoxicité des NP.	98
Figure 20 : Préparation de l'exposition par voie alimentaire: Pièces de <i>H. diversicolor</i> contaminées A et culture des algues <i>Nitzschia</i> sp. B.....	100
Figure 21 : Système d'oxygénation des sédiments avant l'ajout d'eau de mer.	101
Figure 22 : Dispositif expérimental installé dans un mésocosme pour reproduire le cycle tidal et alimenter l'eau en oxygène.	102
Figure 23 : Méthodologie d'évaluation des effets écotoxicologiques d'après Lagadic et al. (1997).	103
Figure 24 : Schéma de fonctionnement de la DLS (Diffusive Light Scattering).	104
Figure 25 : Nanoparticules agglomérées après déshydrations sur une grille TEM.	104
Figure 26 : Capteurs passifs pour la mesure des métaux labiles dans l'eau et les sédiments (A). Structure d'un capteur passif (B). Capteurs passifs en place dans l'eau et les sédiments lors d'une exposition (C).	106
Figure 27 : Lecteur de microplaque Tecan® Sunrise® (A) et microplaque (B) pour le suivi des activités enzymatiques.	108
Figure 28 : Figure 26: Adduit MDA-TBA.	110
Figure 29 : Multispecies Freshwater Biomonitor: matériel d'acquisition (A), interface du logiciel de mesure des fréquences (B), chambre pour la mesure du comportement de <i>H. diversicolor</i> (C) et <i>S. plana</i> (D).	112
Figure 30 : Principe de l'évaluation des dommages à l'ADN par test comète (A) et interface de lecture sur le logiciel Komet 6, Kinetic Imaging Ltd (B).	113
Figure 31 : Mécanisme hypothétique de la pénétration des Au NP dans les noyaux des cellules digestives.	159
Figure 32 : Abondance naturelle des isotopes du Zinc.	235
Figure 33 : Concentration moyenne de chlorophylle a dans le sédiment en fonction du temps d'exposition et du traitement.	295
Figure 34 : Formation d'une galerie en U de <i>H. diversicolor</i> dans un mésocosme expérimental.	296
Figure 35 : Gestion du risque des nanoparticules adapté d'après Kandlikar <i>et al.</i> (2007).	306
Figure 36 : Les incertitudes pour la gestion du risque des nanoparticules d'après Klaine et al. (2012).	307
Figure 37 : Evaluation du risque par la méthode du "control banding" modifié d'après Paik et al. (2008).	309

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution du pourcentage d'atomes situés en surface en fraction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule d'après Klabunde (2001).	23
Tableau 2 : Les sources naturelles et anthropiques de nanoparticules d'après Simeonova (2007).	25
Tableau 3 : Propriétés et applications des nanoparticules modifié d'après Bigorgne (2011).	30
Tableau 4 : Les méthodes de caractérisation des nanoparticules d'après Hassellöv et Kaegi (2009).	45
Tableau 5 : Etudes toxicologiques et écotoxicologiques traitant des nanoparticules métalliques.	49
Tableau 6 : Classification de <i>Scrobicularia plana</i>	87
Tableau 7 : Classification de <i>Hediste diversicolor</i>	90
Tableau 8 : Concentration en métaux (Cd, Hg, Ni, Pb, V, Zn, Cu mesurée $\mu\text{g.g}^{-1}$ dw) dans les sédiments de la Baie de Bourgneuf (Amiard et al. 2007) et valeurs préconisées par la convention OSPAR.	95
Tableau 9 : Bioaccumulation et réponses des biomarqueurs biochimiques et comportementaux chez <i>H. diversicolor</i> exposés à trois tailles d'Au NP (5, 15 et 40 nm). Les lettres différentes en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$).	158
Tableau 10 : Bioaccumulation et réponses des biomarqueurs biochimiques et comportementaux chez <i>H. diversicolor</i> exposés à l'Ag sous forme soluble ou nanoparticulaire par la colonne d'eau ou par l'alimentation. Les lettres différentes en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$)	196
Tableau 11 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez <i>S. plana</i> et <i>H. diversicolor</i> selon la forme de l'Ag et la voie d'exposition (colonne d'eau ou alimentation). Induction significative du biomarqueur $\nearrow$, inhibition significative du biomarqueur $\searrow$, tendance à l'induction du biomarqueur (non significatif) $\nearrow$, pas de variation significative =	197
Tableau 12 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez <i>S. plana</i> et <i>H. diversicolor</i> selon la forme de Cd et la voie d'exposition (colonne d'eau ou alimentation). Induction significative du biomarqueur $\nearrow$, inhibition significative du biomarqueur $\searrow$, pas de variation significative =	229
Tableau 13 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez <i>S. plana</i> et <i>H. diversicolor</i> exposées aux CuO NP par l'eau ou dans les mésocosmes. Induction significative du biomarqueur $\nearrow$, inhibition significative du biomarqueur $\searrow$, pas de variation significative =.	296
Tableau 14 : Comparaison de l'écotoxicité des métaux sous forme soluble ou nanoparticulaire chez <i>S. plana</i> et <i>H. diversicolor</i>	305

Liste des abréviations

AAS : Spectrométrie d'absorption atomique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AChE : Acétylcholine Estérase
AFSSET : L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
CAT: Catalase
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CE : Commission Européenne
CEE : Communauté économique européenne
CSP : Caspase
DGT : Diffusive Gradient in Thin film
DLS : Dynamic Light Scattering
ECHA : European Chemicals Agency
FAO: Food and Agriculture Organization
GDR: Groupement de Recherche
GST : Glutathion S-Transférases
ICEINT: International Consortium for the Environmental Implication of Nanotechnology
IML: Intrinsiq Materials Ltd
ISO: International Organization for Standardization
ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry
JRC: Joint Research Center
LCA: Life Cycle Assessment
LDH: Lactate dehydrogenase
MDA: Malondialdéhyde
MFB : Multispecies Freshwater Biomonitor
MT: Métallothionéine
MWCNT : Nanotubes de Carbone Multi-Feuillet
NanoReTox: The Reactivity and Toxicity of engineered Nanoparticles
NATO: North Atlantic Treaty Organization Scientific Affairs Division
NHM: Natural History Museum
NOM: Natural Organic Matter
NP: Nanoparticules(s)
OCDE – OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economique
PNEC : Predicted No Effect Concentration
REACH : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques
RNO : Réseau National d'Observation
ROS: Reactive Oxygen Species
SAGE: Schéma d'Aménagement et de Gestion de l'Eau
SOD: Superoxyde Dismutase
SCENIHR : Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SWCNT : Nanotubes de Carbone Simple Feuillet
TBARS : Thiobarbituric Reactive Substances
TEM : Microscopie Electronique à Transmission
TSP : Total Suspended Particles
UFP : Ultrafine Particle
UV: Ultra Violet

Communication des travaux de recherche

Publications dans des journaux scientifiques internationaux

Dans le cadre de la thèse:

- BUFFET P.E., FOSSI TANKOUA O., 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.
- PAN J.F., BUFFET P.E., POIRIER, L., AMIARD-TRIQUET C. GILLILAND D., GUIBBOLINI M., RISSO DE FAVERNEY C., ROMEO M., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C., 2012. Size Dependent Bioaccumulation and Ecotoxicity of Gold Nanoparticles in an Endobenthic Invertebrate: the Tellinid Clam *Scrobicularia plana*. **Environmental Pollution**, 168, 37-43.
- BUFFET P.E., AMIARD-TRIQUET C., DYBOWSKA A., RISSO DE FAVERNEY C., GUIBBOLINI M., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>. (sous presse)
- JOUBERT Y., PAN J.F., BUFFET P.E., PILLET P., MOUNEYRAC C., AMIARD-TRIQUET C. Gold nanoparticles induce in vivo DNA damage in an estuarine bivalve *Scrobicularia plana* (**En preparation**).
- BUFFET P.E., PAN J.F., POIRIER L., AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.C., GAUDIN P., RISSO-DE FAVERNEY C., GUIBBOLINI M., GILLILAND D., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Behavioural and biochemical responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. (**Soumise**).
- BUFFET P.E., POIRIER L., ZALOUK-VERGNOUX A., CHARLES S., AMIARD J.C., GAUDIN P., RISSO DE FAVERNEY C., GUIBBOLINI M., GILLILAND D., PERREIN-ETTAJANI H., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Behavioural and biochemical responses of the endobenthic invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dot (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure. (**En préparation**)
- BUFFET P.E., RICHARD M., CAUPOS F., ZALOUK-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., BERHANU D., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). (**Soumise**)

Dans le cadre de collaborations scientifiques:

- KALMAN J., BUFFET P.E., AMIARD J.-C., DENIS F., MOUNEYRAC C., AMIARD-TRIQUET C., 2010. Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. **Biomarkers**, 15, 461-469.
- 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 biomarker tools in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in monitoring programmes of estuarine quality. **Environmental Science and Pollution Research**, 18, 1253-1263.
- FOSSI TANKOUA O., BUFFET P.E., AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C., GILLET, P., MOUNEYRAC C., BERTHET B., 2011. Intersite variations of a battery of biomarkers at different levels of biological organisation in the estuarine endobenthic worm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). **Aquatic Toxicology**, 114-115, 96-103).
- FOSSI TANKOUA O., BUFFET P.E., AMIARD J.C., BERTHET B., MOUNEYRAC C., AMIARD-TRIQUET C., 2012. Integrated assessment of estuarine sediment quality based on a multi-biomarker approach in the bivalve *Scrobicularia plana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** (accepté sous modification).

Communications dans des congrès internationaux

Dans le cadre de la thèse:

- BUFFET P.E., FOSSI TANKOUA O., 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., 2010.. Behavioural and biochemical responses of two marine organisms *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* to copper oxide nanoparticles. In : **20th Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry annual meeting (SETAC), Sevilla (Spain), 21-27 May 2010.**
- PAN J-F., BUFFET P.E., POIRIER L., AMIARD-TRIQUET C., GILLILAND D., GUIBBOLINI M., RISSO C., ROMÉO M., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Ecotoxicology of gold nanoparticles in endobenthic invertebrates, the tellinid clam *Scrobicularia plana* and the polychaete worm *Nereis diversicolor*. In: **21st Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry annual meeting, Milano (Italy), 15-19 May 2011.**
- PAN, J-F., AMIARD-TRIQUET, C., BUFFET, P.E., GILLILAND, D., MOUNEYRAC, C., POIRIER, L., JOUBERT, Y. The influence of gold nanoparticle sizes on their bioaccumulation and effects at the cellular level in an estuarine clam *Scrobicularia plana*. In: **15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), Hong Kong (China), 3-8 July 2011.**

- BUFFET P.E., AMIARD-TRIQUET C., DYBOWSKA A., GUIBBOLINI M., RISSO DE FAVERNEY C., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Fate of isotopically labelled ZnO nanoparticles in sediment and biochemical and behavioural responses of two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*. In : **22nd Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry annual meeting (SETAC) World Congress, Berlin (Germany), 20-24 May 2012.**
- BUFFET P.E., CHATEL A., AKCHA F., REIP P., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C. Impact genotoxique de nanoparticules metalliques chez deux especes estuariennes : *S. plana* et *N. diversicolor*. In: **ECOBIM, Reims (France), 5-8 juin 2012.**
- BUFFET P.E., RICHARD M., CAUPOS F., VERGNOUX A., PERREIN-ETTAJANI H., THOMAS-GUYON H., LUNA-ACOSTA A., AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.C., RISSO DE FAVERNEY C., GUIBBOLINI M., REIP P., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C., 2012. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Nereis diversicolor*). In: **22nd Goldschmidt, Montréal (Canada), 24-29 June 2012.**

Dans le cadre de collaborations scientifiques:

- AMIARD-TRIQUET C., BUFFET P.E., FOSSI TANKOUA O., KALMAN J., AMIARD J.C., DEDOURGE-GEFFARD O., MÉTAIS I. & MOUNEYRAC C., 2009. Biomarkers in the polychaete *Nereis diversicolor* as a sentinel species in estuaries. In : **14th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), Metz (France), 30 August-4 September 2009.**
- FOSSI TANKOUA O., BUFFET P.E., AMIARD J.C., BERTHET B., DEDOURGE-GEFFARD O., MÉTAIS I., MOUNEYRAC C. & AMIARD-TRIQUET C., 2009. Cascading effects of chemical stress at different levels of biological organisation in endobenthic invertebrates. In : **20th Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry annual meeting (SETAC), Sevilla (Spain), 21-27 May 2010.**

Introduction

Le « nanomonde », les nanotechnologies et les nanosciences sont au cœur des plus grandes innovations du XXI^{ème} siècle. Les progrès technologiques notamment dans le domaine de la microscopie ont laissé entrevoir le « monde » dans des dimensions jusqu'alors inexplorées. Ils permettent d'observer des objets de l'ordre du nanomètre correspondant à un milliardième de mètre, la dimension des atomes et des molécules. Dans un discours donné le 29 décembre 1959 à la réunion annuelle de l'American Physical Society, Richard Feynman évoquait déjà le nanomonde : "*There's Plenty of Room at the Bottom*". Ces paroles visionnaires traduisent les possibilités innombrables qu'offre le monde de l'infiniment petit et l'intérêt des scientifiques le concernant. La pierre angulaire de la course à la miniaturisation est alors posée. L'homme souhaite pouvoir créer des objets en les assemblant atome par atome. Ces concepts précurseurs sont à l'origine des nanotechnologies. La synthèse de la molécule de fullerène a largement contribué à attirer l'attention des scientifiques vers les nanoparticules. Jusqu'à des temps récents, les scientifiques pensaient que le carbone pur existait à l'état de graphite ou de diamant. En 1985, H. Kroto, B. Curl et R. Smalley, une équipe de chercheurs travaillant sur les chaînes constituant les amas carbonés interstellaires, ont pour la première fois synthétisé des structures carbonées en cages, bouleversant les idées reçues concernant la structure du carbone pur. Les fullerènes sont des molécules rappelant une sphère ou un tube composés de structures pentagonales ou hexagonales empêchant la formation de feuillets. Le premier fullerène décrit est une structure à 60 carbones (C60) avec une taille proche du nanomètre. Le C60 fût synthétisé par vaporisation de graphite au sein d'un courant d'hélium balayé par un plasma très chaud. Il fût nommé buckminster fullerène rendant ainsi hommage à Richard Buckminster Fuller, un architecte qui mit au point le dôme géodésique. Ces structures couplant légèreté et résistance ont motivé l'engouement de la communauté scientifique et de l'industrie voyant en elles une véritable révolution. De nombreux autres types de nanomatériaux ont ensuite été synthétisés à base de carbone, de métaux et de silice avec des formes variées : des nanoparticules (NP), des nanofibres, des nanoplaques. Depuis, les NP envahissent les revues scientifiques, les médias mais aussi l'industrie et le commerce. Le marché important que représente le secteur des nanotechnologies, évalué à 3 trillions de dollars pour l'horizon 2015 (Hwang et Bradley 2010, Lux Research) attire les convoitises.

Les NP suscitent pourtant beaucoup d'interrogations et de peur. Même si la communauté scientifique ne souhaite pas se priver des bénéfices que peuvent nous apporter les NP, il ne faut pas reproduire les erreurs passées liées à l'utilisation précoce de nouveaux produits (plomb, amiante...) et négliger leur potentiel toxique sans faire les démarches scientifiques nécessaires pour assurer leur innocuité sur la santé humaine et environnementale. Toute la problématique concernant les NP est axée sur l'évaluation bénéfices / risques qui passe par le développement des connaissances et de la surveillance de ces nouveaux produits. En effet, de nombreuses questions se posent sur le devenir et les effets des NP manufacturées sur la santé humaine et l'environnement (Moore 2006; Wiesner et al. 2006; Klaine et al. 2008; Gao et al. 2009; Stone et al. 2010) et ont fait l'objet de rapports détaillés (Afsset 2006; Royal Commission on Environmental Pollution 2008; European Commission 2009; Afsset 2010). Des études préliminaires sur les NP révèlent un potentiel toxique pour les cellules humaines ou de mammifères (Arora et al. 2008; Park et al. 2008; Wang et al. 2008; Fahmy et Cormier 2009; Fröhlich et al. 2009; Ahamed et al. 2010; Li et al. 2010; Sizova et al. 2012). La toxicité des NP est surtout étudiée chez les organismes aquatiques d'eau douce (Federici et al. 2007; Lovern et al. 2007; Heinlaan et al. 2008; Navarro et al. 2008; Chae et al. 2009; Griffitt et al. 2009; Hao et al. 2009; Ispas et al. 2009; Peyrot et al. 2009; Allen et al. 2010; Bai et al. 2010; Bilberg et al. 2010; Johnston et al. 2010; Zhu et al. 2010; Xiong et al. 2011), d'eau marine (Koehler et al. 2008; Tedesco et al. 2008; Cong 2011; Gomes et al. 2011; Kadar et al. 2011; Zuykov et al. 2011; Gomes et al. 2012) et terrestres (Hu et al. 2010; Kool et al. 2011; Amorim et Scott-Fordsmand 2012). Cependant un grand nombre de ces travaux concerne l'évaluation de la toxicité des NP pour des doses très élevées parfois très éloignées de celles qui pourraient se retrouver dans l'environnement. Les études portant sur les effets chroniques résultant de faibles niveaux d'exposition sont peu nombreuses (Klaper et al. 2009). Dans la majorité des études, l'exposition est réalisée par voie directe : dans le milieu de culture pour les expériences *in vitro* ou dans l'eau pour les expériences *in vivo* en milieu aquatique. Pourtant les NP et spécifiquement celles d'origine métallique ont tendance à s'agréger et à sédimenter avec pour résultat leur transfert de la colonne d'eau vers les sédiments (Klaine et al. 2008). A l'heure actuelle, il n'existe pas de moyens techniques spécifiques pour quantifier les NP dans des matrices complexes comme celles retrouvées dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques. Il existe également peu de données concernant les effets des NP à des

concentrations réalistes (proches de celles prédites par les modèles en l'absence de données de terrain) et intégrant des paramètres environnementaux tels que le support d'exposition (eau de mer, nourriture, sédiments) et ses composantes (biofilm), l'effet du cycle de marée et les fluctuations naturelles. De plus, peu de données existent concernant la toxicité des NP et prenant en compte une variété de paramètres biologiques. L'utilisation de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique : des biomarqueurs au niveau sub-individuel (biochimiques), individuel (comportement) jusqu'à la génotoxicité, peut nous donner des informations sur les effets potentiels qui pourraient se répercuter à des niveaux d'organisation biologique plus élevés (e.g. populationnel) à plus long terme des NP.

Au niveau international, des groupements de recherche ont vu le jour afin d'associer les compétences d'équipes renommées pour étudier la production et les effets des NP sur la santé et l'environnement, notamment le GDRI international Consortium for the Environmental Implication of Nanotechnology (ICEINT). En Europe, la mise sur le marché des substances chimiques est régulée par la réglementation européenne sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des produits chimiques (REACH) qui est entrée en vigueur en juin 2007. Cependant, le texte original sur les substances chimiques n'est pas adapté car il prend en compte la nature de la substance et non sa taille. D'importants efforts sont réalisés par l'Union Européenne afin de répondre aux interrogations concernant le risque environnemental lié à l'utilisation des nanomatériaux.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du programme Européen (FP7) NanoReTox (The **R**eactivity and **T**oxicity of engineered **N**anoparticles: risks to the environment and human health, convention de subvention no. [214478]) regroupant des équipes pluridisciplinaires internationales hautement qualifiées pour faire face aux conséquences environnementales et humaines de l'exposition aux NP manufacturées. Ce programme regroupe des institutions/organismes de recherche: the Natural History Museum (Londres), the Imperial College (Londres), the King's College (Londres), Roskilde Universitetscenter (Danemark), l'Université de Nice Sophia Antipolis (France), l'Université Catholique de l'Ouest (France), l'Universidad del Pais Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (Espagne), the Joint Research Centre (Italie), l'Universita di Pisa (Italie), the United States Geological Survey

(Etats-Unis), et deux entreprises : Intrinsic Materials Ltd. (Londres) et AHAVA-Dead Sea Laboratories (Israël).

Les problématiques de recherche du programme sont axées sur la synthèse, la caractérisation et la réactivité des NP dans les milieux biologiques et environnementaux, les aspects d'accumulation et de toxicité *in vitro* et *in vivo* des NP métalliques manufacturées. Cette thèse est intégrée dans le groupe de travail (WP3) focalisé sur l'exposition *in vivo* des organismes aquatiques. L'objectif de ce WP est de répondre aux problématiques suivantes :

- Comment les propriétés physico-chimiques et la composition des NP métalliques affectent leur biodisponibilité et leurs effets chez les organismes aquatiques ?
- Les NP sont-elles plus biodisponibles quand elles sont dissoutes ou en suspension dans l'eau, ou lorsqu'elles sont présentes dans les aliments et les sédiments ingérés par les organismes ?
- Est-ce que la pénétration des NP dans les tissus génère des réponses qui peuvent être utilisées comme biomarqueurs dans des tests de toxicité mais aussi pour être intégrées dans les programmes de biosurveillance ?

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Première partie : Les Enjeux Technologiques et Economiques des Nanoparticules

1. Propriétés spécifiques des nanoparticules

1.1. Définitions

Les nanomatériaux ou nano-objets sont à l'heure actuelle définis comme des substances comportant au minimum une échelle « nano ». Cette échelle est comprise entre 1 et 100 nm. Ces nanomatériaux sont classés de manière hiérarchique selon le nombre de dimensions inférieures à 100 nm qu'ils présentent (Figure 1).

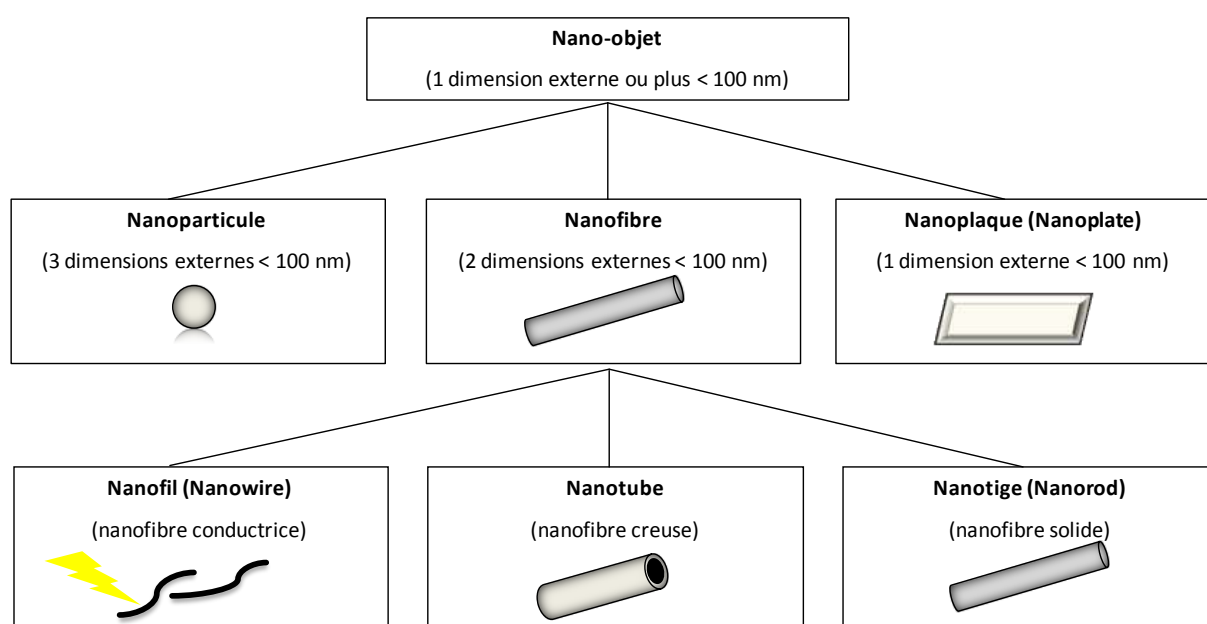


Figure 1 : Les différents types de nano-objets (Iso 2008).

Une NP est un cas particulier de nanomatériaux possédant 3 dimensions inférieures à 100 nm. Cependant, l'organisme international de normalisation (ISO), l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE), les structures ou comités nationaux et internationaux, possèdent leur propre description du terme « nanomatériau ». L'harmonisation de la définition même du terme « nanomatériau » est donc indispensable. La taille est une unité de mesure universellement applicable pour définir ces matériaux. Cependant, c'est la compréhension de la distribution de la taille des nanomatériaux qui semble l'examen le plus pertinent selon le Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR 2010). En effet, il est difficile d'étudier uniquement la taille externe des particules

puisqu'elles sont modifiées en surface par des composés organiques, et forment des agglomérats parfois micrométriques plus ou moins stables comportant de nombreuses NP. La communauté scientifique s'accorde donc sur la nécessité d'utiliser une description plus détaillée prenant en compte d'autres paramètres que la taille comme la surface, la charge, etc... afin de mieux décrire ses substances. La Commission Européenne (CE) recommande ainsi qu'un produit soit considéré comme « nanomatériau » s'il remplit au moins l'un des critères suivants :

- Matériau constitué de particules ayant une ou plusieurs dimensions externes de taille comprise entre 1 et 100 nm, avec plus d'1% du nombre de particules respectant cette condition ;
- Matériau avec une structure interne ou une structure de surface dans une ou plusieurs dimensions, d'une taille comprise entre 1 et 100 nm ;
- Matériau avec une surface spécifique (par unité de volume) supérieure à $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$, à l'exclusion des particules de taille inférieure à 1 nm.

La recommandation de la CE met donc l'accent sur la distribution (en nombre) des NP ainsi que sur la notion de surface spécifique ($60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ correspondant à la surface spécifique de sphères de 100 nm de diamètre et de densité égale à $1 \text{ g}/\text{cm}^3$).

1.2. Effet de la taille des nanoparticules

À la taille nanométrique, les caractéristiques des matériaux diffèrent sensiblement par rapport aux matériaux microscopiques ou macroscopiques et repoussent les règles de la physique et de la chimie vers ses limites (Klaine et al. 2012). De plus, la taille des NP affecte directement leur comportement, leur transport et leur devenir dans l'environnement mais augmente aussi leur biodisponibilité vis-à-vis des tissus biologiques (Monteiro-Riviere 2007). Les propriétés d'adsorption, de dissolution, et d'oxydo-réduction des particules sont liées à la taille de ces particules (Bottero et al. 2011). Les NP peuvent rester en suspension dans l'air et l'eau et se déplacer sur de grandes distances constituant également des vecteurs pour d'autres contaminants (Kaegi et al. 2008). Elles peuvent atteindre des cibles biologiques plus facilement que les particules de plus grandes tailles car elles ont la capacité de passer de

nombreuses barrières biologiques par de multiples voies : respiratoire, digestive, cutanée. Ces propriétés leur confèrent un véritable intérêt pour la conception de nouveaux médicaments ou de vecteurs de médicaments (Parveen et al. 2012) ou encore pour la mise au point de marqueurs biologiques (Gao et al. 2002).

1.3. Effet de l'augmentation de l'activité surfacique

Lorsque la taille d'une particule diminue, le rapport surface sur volume augmente. Puisque la portion réactive d'une particule est située à sa surface, les effets de surface ne sont donc plus négligeables vis-à-vis de ceux du volume. L'augmentation de la proportion d'atomes en surface augmente l'activité surfacique (Tableau 1). Environ 35-40% d'atomes sont localisés à la surface d'une NP de 10 nm alors que moins de 20% sont en surface pour des particules dont la taille dépasse 30 nm (Auffan et al. 2009). Par conséquent, le comportement des NP est gouverné par les interactions chimiques avec la surface et les caractéristiques de ces surfaces (Wiesner et Bottero 2007). Les NP sont donc susceptibles de fortement interagir avec les molécules biologiques (ADN, protéines) et les organites cellulaires. De plus, elles ont également un fort pouvoir de catalyse des réactions biologiques et chimiques.

Tableau 1 : Evolution du pourcentage d'atomes situés en surface en fraction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule d'après Klabunde (2001).

		Nombre total d'atomes	Atomes en surface (%)
Un motif		13	92
Deux motifs		55	76
Trois motifs		147	63
Quatre motifs		309	52
Cinq motifs		561	45
Sept motifs		1415	35

1.4. Influence de l'effet quantum

A la taille nanométrique, le comportement des particules est régi par la physique classique mais également par la physique quantique (Sellers et al. 2009). Lorsque la taille du système atteint celle de la longueur d'onde des électrons, le rôle de la mécanique quantique est crucial. L'effet quantum est lié au confinement du mouvement des électrons qui modifie les caractéristiques essentielles optiques, électroniques et magnétiques de certaines NP (Wiesner et Bottero 2007; Grassian 2008; Sellers et al. 2009). A titre d'exemple, les propriétés optiques de certains métaux changent à l'échelle nanométrique. Les particules d'or nanométriques peuvent présenter des couleurs différentes selon leur taille et l'oxyde de zinc devient transparent à l'échelle nanométrique.

2. Origines des nanoparticules

2.1. Nanoparticules d'origine naturelle

Une quantité non négligeable de NP présentes dans l'environnement ont une origine naturelle bien que leur proportion soit plus faible par rapport à l'émission potentielle de NP manufacturées (Klaine et al. 2008). Dans l'atmosphère, les NP proviennent des processus de nucléation et de condensation des gaz et des vapeurs. Les processus de combustion, d'érosion et le volcanisme libèrent des particules ultrafines comportant également une proportion de particules nanométriques jouant un rôle non négligeable dans les processus naturels (Wiesner et Bottero 2007). Dans les systèmes aquatiques, dans les sols et les sédiments, les particules comprises entre 1 nm et 1 μ m sont appelées colloïdes. Ces derniers comportent des molécules organiques telles que les acides humiques et fulviques, des protéines et des composés inorganiques tels que des oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse. Leur petite taille leur confère une forte réactivité de surface et donc un fort pouvoir de liaison avec les contaminants organiques ou inorganiques.

2.2. Nanoparticules générées involontairement par les activités humaines

Certaines NP sont générées par l'homme non pas pour un usage particulier mais produites involontairement à la suite de processus ayant recours à la combustion (Tableau 2). Ces processus peuvent avoir lieu de manière industrielle lors de la production d'énergie dans les centrales thermiques, pour le transport (automobile et aviation) mais également lors de l'incinération des déchets. De plus, au quotidien l'ébullition, les fritures pour l'alimentation, les feux de chauffage produisent des NP au niveau domestique. Ces activités génèrent des NP notamment à proximité des grands centres urbains et industriels. Les efforts sont de plus en plus importants pour quantifier et évaluer la toxicité de ces particules. Les particules atmosphériques qui peuvent inclure des NP sont plus particulièrement étudiées autour des grands centres urbains.

Tableau 2 : Les sources naturelles et anthropiques de nanoparticules d'après Simeonova (2007).

Origine Naturelle	Origine Anthropique	
	Involontaire	Volontaire
Nucléation des gaz Feux de forêt Volcanisme Virus Biominéralisation	Moteurs à combustion	NP manufacturées
	Centrales à charbon	
	Incinérateurs	
	Aviation	
	Fumées (métaux, polymères)	
	Processus chaud	
	Moteurs électriques	

2.3. Nanoparticules manufacturées

Les nanomatériaux sont dits manufacturés quand ils sont produits intentionnellement et introduits dans l'environnement par l'homme (Afsset 2010). Ils doivent être distingués de l'ensemble des particules d'échelle nanométrique citées précédemment. L'étude des dangers et l'évaluation des risques associés aux nanomatériaux manufacturés est primordiale puisqu'ils sont produits en raison de leurs propriétés nouvelles et spécifiques (Handy et al. 2008).

Depuis une dizaine d'années, les nanomatériaux entrent dans la composition de nombreux produits commercialisés ou sont utilisés dans des procédés industriels pouvant conduire à une exposition humaine. La production de NP dans le monde dépasse plusieurs centaines de tonnes pour de nombreuses substances (485 000 t de silice, 469 000 t d'alumine, 300 000 t de carbonate de calcium, 250 000 t de dioxyde de titane et 240 000 t de carbone) selon le rapport de l'Afsset (2010). La production de NP manufacturées est en plein essor. Actuellement plus de 1300 produits utilisant des nanomatériaux sont sur le marché mondial (Woodrow Wilson Institut, The Project on Emerging Nanotechnology, <http://www.nanotechproject.org>). En 2014, 50% des produits électroniques et 16% des produits manufacturés pour la santé et les sciences de la vie utiliseront des nanomatériaux. En 2014, les produits utilisant des nanomatériaux représenteront environ 15% du total des produits manufacturés (Lux Research 2006).

3. Synthèse des nanoparticules

3.1. Approche ascendante « Bottom-up »

L'approche ascendante « Bottom-up » vise à construire atome par atome ou molécule par molécule (Figure 2) une structure nanoparticulaire (Biswas et al. 2012). Cette méthode implique la condensation ou la nucléation d'atomes ou de molécules en phase gazeuse ou liquide. Les techniques de synthèse ascendante sont nombreuses (dépôt en couche atomique, dépôt en phase vapeur...). La synthèse de NP d'argent par exemple est très souvent réalisée par précipitation de nitrate d'argent en utilisant un agent réducteur (tel que l'acide ascorbique). L'électrolyse d'une électrode d'argent produit des colloïdes comportant des NP d'argent mais aussi des ions argent (Sellers et al. 2009). La création d'objet atome par atome est complexe et les techniques d'auto-assemblage sont actuellement très étudiées. Elles visent à utiliser les forces d'attraction physico-chimiques pour construire des NP. Le principe est de rendre réversibles les interactions attractives entre les particules afin d'avoir un processus d'assemblage à l'équilibre, pour favoriser les organisations de cristaux stables. Cela revient à faire pousser un monocristal avec des NP.

3.2. Approche descendante « Top-down »

La deuxième approche dite descendante ou « Top-down » consiste à diviser une grande structure en de multiples structures de manière répétée afin d'obtenir des particules nanométriques (Figure 2). La déstructuration est réalisée par action mécanique (attrition ou fraisage), chimique (destruction des liaisons spécifiques) ou par volatilisation par ablation laser ou par four, suivie de la condensation des éléments volatilisés (Wiesner et Bottero 2007). Les techniques de lithographie sont aussi communément utilisées pour fabriquer des structures en deux dimensions de taille micrométrique à nanométrique tels que des circuits intégrés (Biswas et al. 2012). Le principe repose sur le dépôt d'un masque sur un matériau suivi d'une attaque de la matière exposée chimiquement (acide) ou mécaniquement (UV, rayon-X, electron-beam). La technique utilisée conditionne la résolution du produit final.

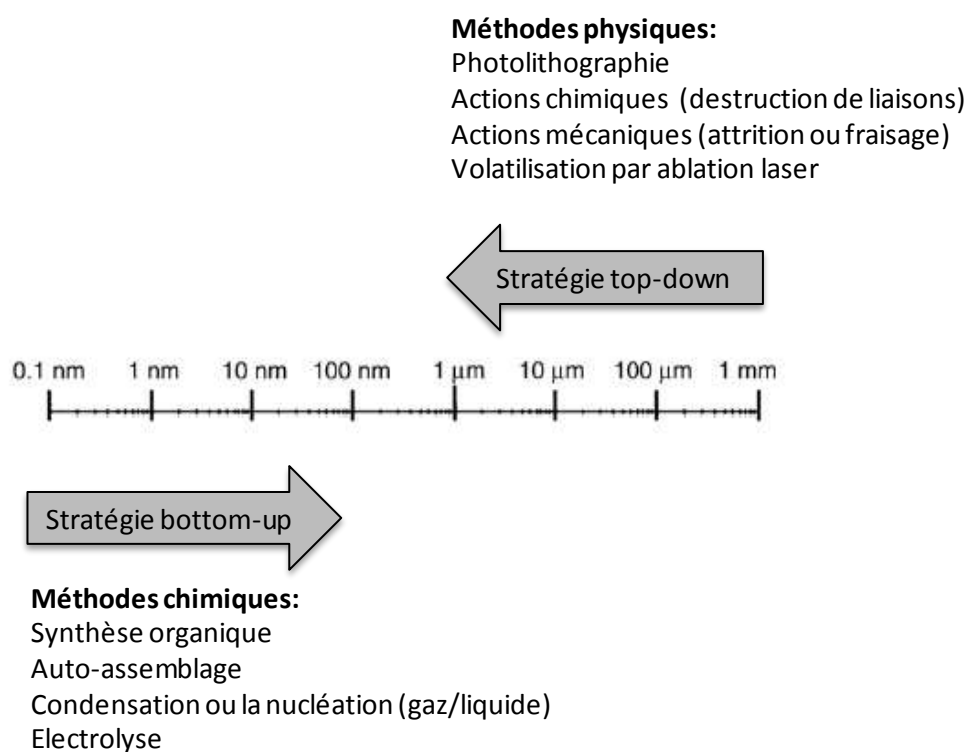


Figure 2 : Stratégies bottom-up et top-down modifiées d'après Nam et Lead (2008).

4. Les types de nanoparticules manufacturées et leurs usages

Les nanomatériaux utilisent une très grande variété chimique de nanocomposants. Cependant ce sont les matériaux à base de carbone, de métaux ou d'oxydes métalliques qui sont les plus largement commercialisés. Les plus utilisés sont l'argent (313 produits), les carbones (91 produits), le titane (59 produits), le zinc (31 produits) et l'or (28 produits) selon la base de données Woodrow Wilson Institut, The Project on Emerging Nanotechnology (2012)

4.1. Les carbones

Historiquement, les NP de carbone ont été les premières particules de taille nanométrique manufacturées. Le noir de carbone est constitué de fines particules de carbone possédant un fort pouvoir d'agglomération. Il est surtout intégré dans les processus de fabrication des gommages, des caoutchoucs et des plastiques. L'application la plus commune est l'ajout de noir de carbone dans les pneumatiques en automobile. Ils résistent ainsi à l'usure et adhèrent sur le sol sec; en effet la gomme se déforme de façon frictionnelle par rapport à la charge, du fait de l'établissement de liaisons moléculaires mécaniques. Les autres formes de carbone nanoparticulaire (Figure 3) couramment synthétisées sont les fullerènes : des nanosphères de carbone, des nanotubes de carbones mono-couche (single-walled carbone nanotubes SWCNT) ou des nanotubes de carbones multi-couches (multi-walled carbone nanotubes MWCNT) dont les feuillets de carbones sont enroulés de manière concentrique.

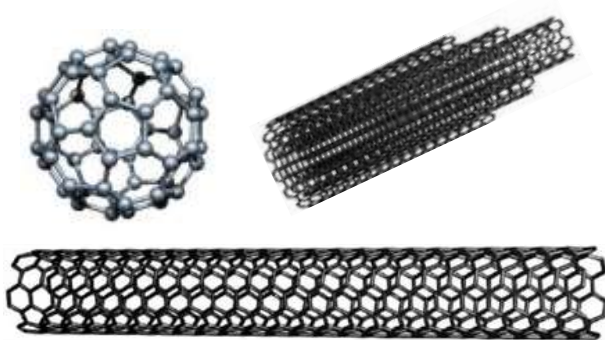


Figure 3 : Structure des nanoparticules de carbone (C60, nanotube de carbone mono-couche et multi-couches).

Les propriétés électriques rendent les nanomatériaux à base de carbone particulièrement intéressants en électronique (Liu et al. 1998) et pour le stockage d'énergie. En effet, les nanotubes de carbone disposant d'atomes agencés en lignes droites sur la longueur du tube sont de très bons conducteurs de l'électricité. Lorsque les atomes de carbone sont disposés en spirale, ils deviennent des semi-conducteurs (conductivité intermédiaire). D'autre part, la structure des nanotubes de carbone alliant résistance, souplesse et légèreté est couramment utilisée pour l'amélioration des équipements sportifs. Des mesures ont démontré que les nanotubes de carbone sont environ 200 fois plus durs que l'acier (Sellers et al. 2009). Les fullerènes sont utilisés en cosmétique pour assurer une meilleure pénétration des produits dans la peau et trouvent également des applications en optique et photochimie.

4.2. Les métaux et oxydes métalliques

Les NP métalliques sont également très largement utilisées et entrent dans la composition de nombreux produits commercialisés. Leurs propriétés varient selon le métal utilisé (Tableau 3) et la taille des NP produites. L'application la plus commune est l'utilisation de NP de TiO_2 et de ZnO dans les crèmes solaires, qui permettent de bloquer les ultra-violets. Les NP de TiO_2 sont également utilisées pour fabriquer des verres ou revêtements auto-nettoyants. Ces NP possèdent des propriétés photocatalytiques (un rayonnement de longueur d'onde adéquate proche des UV permet d'activer des réactions radicalaires provoquant l'oxydation des produits organiques) et super hydrophiliques permettant à l'eau de former un film nettoyant les surfaces et ne laissant pas de traces d'évaporation. Les NP d'argent sont utilisées principalement pour leurs propriétés antibactériennes sur des revêtements ou dans des textiles.

Tableau 3 : Propriétés et applications des nanoparticules modifié d'après Bigorgne (2011).

NP	Propriétés	Applications	Secteurs d'activité
carbone	électrique	stockage de l'électricité, fils conducteurs, semi-conducteurs	informatique, électronique
	mécanique	résistance des matériaux, ductilité, imperméabilité, allègement	équipements sportifs, bâtiment et travaux publics, véhicules
	filtration	membrane de filtration avec une affinité forte pour les composés hydrosolubles	traitement de l'eau
argent	antibactérien	vêtements, pansements, revêtements antibactériens	textile, médecine, pharmacie
dioxyde de titane	optique	crèmes solaires, vitrages anti-UV, anti-IR ou athermiques	cosmétiques, bâtiment et travaux publics
	photocatalytique / hydrophylque	vitrages ou revêtements auto-nettoyant	bâtiment et travaux publics
	filtration	systèmes de filtration ou de purification de l'air	bâtiment et travaux publics, véhicules
	pigment	pigment blanc dans les peintures, plastiques, colorant alimentaire	bâtiment et travaux publics, véhicules, cosmétiques, alimentation
oxyde de zinc	optique	crèmes solaires, fonds de teint	cosmétiques
oxyde de cuivre	antibactérien	solutions antibactériennes, revêtements antibactériens	agriculture, bâtiment et travaux publics
	thermique	nanofluides favorisant les échanges de chaleur	informatique, électronique, véhicules
or	biologique	distribution localisée de médicaments, traitement anti-cancer	médecine, pharmacie
	optique	imagerie médicale	médecine, pharmacie
	antibactérien	intégration dans des containers	industrie agro-alimentaire
oxyde de fer	filtration	composant pour la fabrication de membranes de filtration	traitement de l'eau
	thermique	nanofluides favorisant les échanges de chaleur	informatique, électronique, véhicules
oxyde d'aluminium	Filtration	composant pour la fabrication de membranes de filtration	traitement de l'eau, véhicules
cadmium	électrique	semi-conducteur	informatique, électronique
Silice	électrique	isolant, enrobage de fibres optiques	informatique, électronique
	anti-agglomérant	additifs dans les poudres alimentaires	alimentation
	mécanique	composant offrant une basse résistance au roulement	véhicules

5. Les enjeux économiques des nanoparticules

Les propriétés inhabituelles des NP ont accéléré la production des nanomatériaux et le nombre d'applications dans de nombreux domaines mobilisant l'attention des chercheurs, des gouvernements et des industriels (Ju-Nam et Lead 2008). Depuis 2007, le nombre d'articles dans des journaux scientifiques traitant des sujets liés aux nanotechnologies a été multiplié par 2. Ainsi en 2011, les contributions les plus importantes sont à attribuer à la Chine (24936 articles) et aux Etats-Unis (18747 articles). Entre 2005 et 2011 plus de 10 milliards de dollars ont été dépensés au Etats-Unis pour la recherche sur les nanotechnologies (Klaine et al. 2012). En Europe, l'Allemagne (6835 articles) et la France (4551 articles) ont produit le plus d'articles scientifiques concernant les nanotechnologies (selon la base de données ISI Web of Knowledge). Désormais, les NP ne sont plus seulement étudiées en laboratoire mais également accessibles à la vente et largement distribuées. Le nombre de nano-produits répertoriés a été multiplié par environ 24 depuis mars 2005 selon le Woodrow Wilson Institut, The Project on Emerging Nanotechnology (2012). Ce projet issu du partenariat entre le Woodrow Wilson Institute et The Pew Charitable Trust vise à répertorier tous les produits pouvant être acquis aisément par les consommateurs et clairement identifiés comme nano-produits. La base de données fournit la liste des nano-produits commercialisés dans le monde et est remise à jour régulièrement (Figure 4).

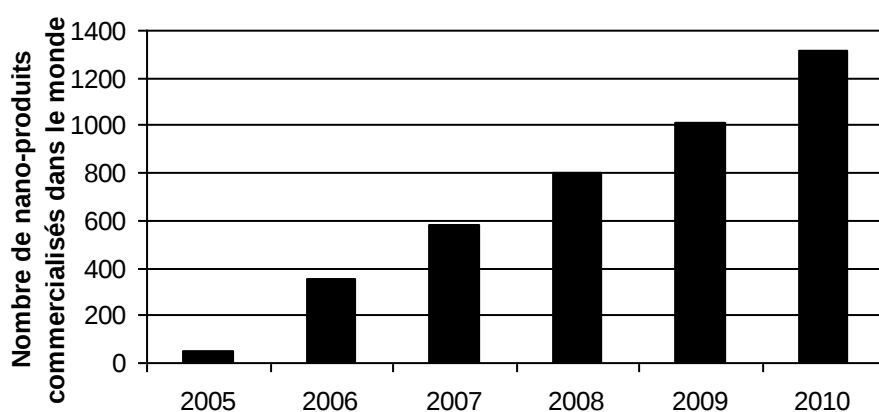


Figure 4 : Evolution du nombre de nano-produits commercialisés de 2005 à 2010 d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (Woodrow Wilson).

La répartition des nano-produits est assez inégale selon les secteurs d'activité (Figure 5). Les nano-produits sont majoritairement utilisés dans les domaines de la santé et de la forme (« fitness ») avec des ratios importants concernant leurs usages dans les cosmétiques et l'habillement.

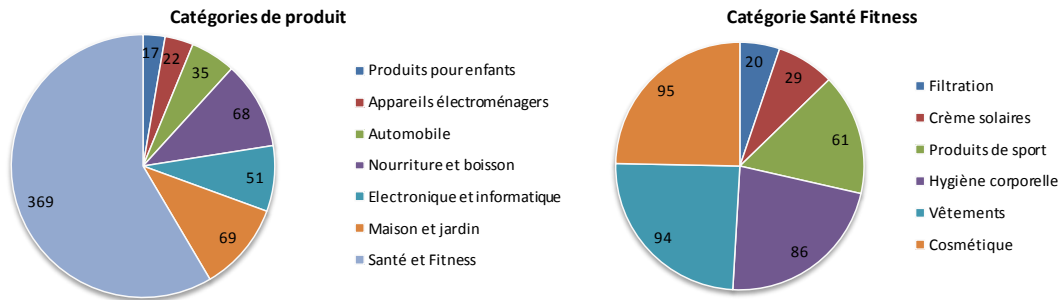


Figure 5 : Répartition des nano-produits commercialisés dans les différents secteurs d'activités d'après la base de données The Project on Emerging Nanotechnologies (Woodrow Wilson).

Des évaluations du marché des nanotechnologies (Figure 6) d'après des modèles basés sur des indicateurs financiers indiquent des perspectives de plusieurs centaines voire plusieurs milliers de milliards de dollars (Hullmann 2006). Le secteur des nanotechnologies est déjà considéré comme un secteur majeur de l'activité mondiale.

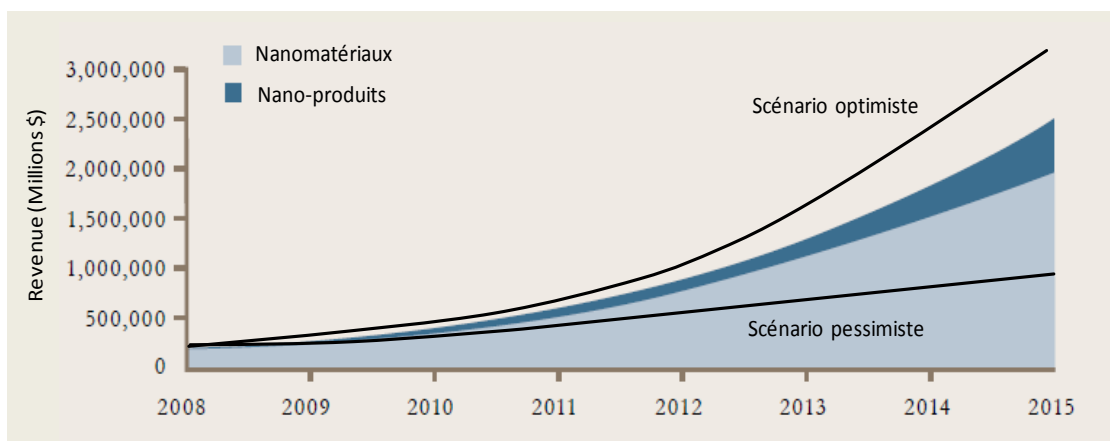


Figure 6 : Evolution du marché des nanotechnologies d'après Hullmann(2006) et Hwang and Bradley (2010).

6. Règlementation sur les nanotechnologies

Le défi réglementaire consiste à veiller à ce que la société puisse bénéficier des applications innovantes issues des nanotechnologies, tout en conservant un niveau élevé de protection de la santé humaine et environnementale selon le texte *Regulatory aspect of nanomaterials*, CE, Brussels (2008). De nombreuses législations cadrent actuellement la production et l'utilisation des substances chimiques et font l'objet d'un contrôle accru. Cependant, les enjeux réglementaires concernant les NP sont importants et délicats puisque ces particules sont composées de substances souvent déjà connues (carbone, silice, oxydes métalliques). Cependant, la taille nanométrique n'est pas prise en compte et justifie pourtant l'adaptation du cadre réglementaire. Reposant sur les connaissances scientifiques, la réglementation évolue rapidement.

6.1. En Europe

Les NP sont des substances chimiques qui entreront dans la réglementation européenne sur l'enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques (REACH).

La déclaration des nanomatériaux n'est pour le moment pas envisagée dans les textes qui prennent en compte la composition chimique des substances produites, mais aucun aspect concernant les dimensions des matériaux n'est jusqu'à présent considéré. De plus, à l'heure actuelle seules les substances produites, échangées ou commercialisées à plus de 10 t/an font l'objet d'évaluations et sont enregistrées pour des productions ou échanges supérieurs à 1 t/an. La législation actuelle couvre dans une large mesure les risques en matière de nanomatériaux, cependant elle doit être modifiée à la lumière des nouvelles informations disponibles, par exemple en matière de seuils. La réglementation repose sur les connaissances scientifiques concernant les propriétés et les risques des nanomatériaux et des données qui en résultent. L'ECHA (European Chemicals Agency) prépare actuellement une mise à jour de son guide des exigences d'information et d'évaluation de la sécurité chimique fondée sur les résultats des projets d'application de REACH sur les nanomatériaux de la Commission européenne. Dans l'attente de ce texte le principe de précaution doit être appliqué. Au niveau européen, un

nouveau règlement sur les cosmétiques prévoit des tests spécifiques et l'étiquetage « nano » obligatoire d'ici 2013 ainsi qu'une résolution parlementaire sur les « nouveaux aliments ». Ces législations soulignent le processus d'évolution de la réglementation pour un meilleur contrôle des nanoproducts.

6.2. En France

A partir de 2009 les lois Grenelle ont été mises en place obligeant les producteurs et importateurs de nanomatériaux à déclarer leurs activités aux autorités. Selon la directive «cosmétiques» 76/768/CEE, le fabricant ou l'importateur d'un produit cosmétique doit évaluer et attester la sécurité du produit avant sa mise sur le marché communautaire. Cela doit être fait en prenant «en considération le profil toxicologique général des ingrédients, leur structure chimique et leur niveau d'exposition». Les lois Grenelle ont également permis l'organisation d'un débat public en vue d'une meilleure information du public, des consommateurs et des travailleurs. Cependant les discussions ont été boycottées et le bien fondé du débat est sujet à controverse.

Le ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement a précisé dans la législation française en 2012 les définitions concernant les NP, les agrégats et agglomérats de NP et modifié la réglementation en matière de déclaration de substances chimiques nanoparticulaires. Selon le décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire, les articles L.523-1 à L.523-3 du code de l'environnement prévoient l'obligation de déclarer les quantités et les usages de substances à l'état nanoparticulaire produites, distribuées ou importées en France. Le dispositif a pour objet de mieux connaître ces substances et leurs usages, de disposer d'une traçabilité des filières d'utilisation, d'une meilleure connaissance du marché et des volumes commercialisés et enfin de collecter les informations disponibles sur leurs propriétés toxicologiques et écotoxicologiques. De plus, une déclaration est obligatoire dès que la quantité minimale de 100 grammes de substance a été produite, importée ou distribuée. Les déclarations et les données qu'elles contiennent sont gérées par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Ces nouvelles mesures entreront en vigueur en 2013.

**Deuxième partie : Les Enjeux Environnementaux et Sanitaires des
Nanoparticules**

Dans la chaîne de production des NP, les voies d'entrée dans l'environnement et les systèmes biologiques sont multiples : de la synthèse des NP à leur transport, jusqu'à leur utilisation et leur recyclage (Figure 7). De plus, l'usure des produits contenant des NP ne doit pas être négligée et peut donner lieu à une libération de ces particules dans l'environnement. Kaegi et al. (2008) ont montré que les peintures de façade de bâtiment contenant des TiO_2 NP peuvent être oxydées puis érodées et libérées dans l'environnement.

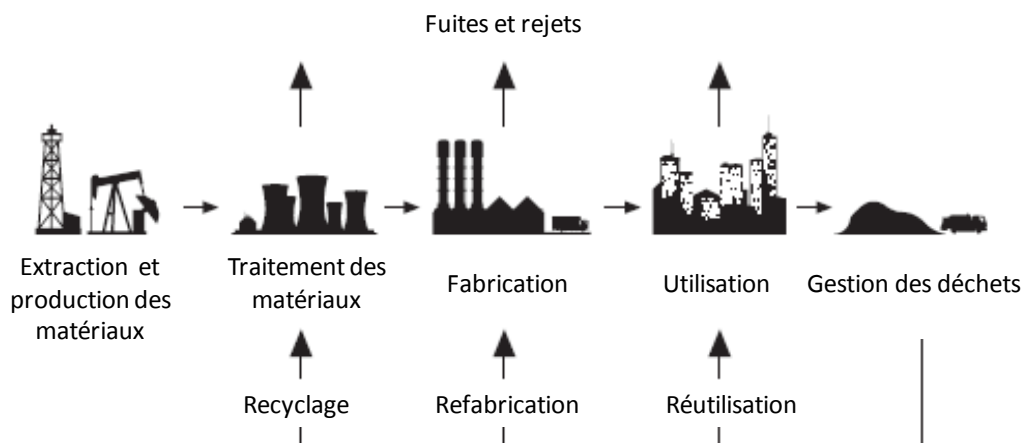


Figure 7 : Les voies d'entrée des nanoparticules dans l'environnement d'après the Royal commission on Environmental pollution (2008).

L'introduction de NP dans l'environnement n'est plus remise en doute (Moore 2006; Nowack et Bucheli 2007; Handy et al. 2008; Klaine et al. 2008). Il reste cependant de nombreuses questions sur les quantités qui vont entrer dans l'environnement et plus particulièrement dans les systèmes aquatiques qui constituent la destinée finale de nombreux contaminants. L'évaluation des risques imposée par l'utilisation croissante de nanomatériaux dans les produits commerciaux nécessite une meilleure compréhension de leur mobilité, de leur biodisponibilité et de leur toxicité. La mise au point d'outils adaptés à la détection des NP dans l'environnement ainsi que pour leur caractérisation dans le milieu est un pré-requis indispensable. L'évaluation du risque des nanomatériaux, nécessite à la fois des connaissances concernant leur potentiel d'exposition et les dangers qui peuvent subvenir à l'issue de l'exposition. Un effort important doit être mené pour évaluer le risque environnemental et pour la santé humaine provenant de la pénétration des NP dans les organismes.

1. Comprendre le devenir des nanoparticules entrant dans l'environnement

L'étude des NP dans l'environnement est une science relativement nouvelle nécessitant des outils adaptés à leur étude. A l'heure actuelle, il existe peu d'outils pour l'évaluation quantitative des concentrations en NP dans l'environnement (Nowack et Bucheli 2007) et le challenge est plus difficile à réaliser que pour les polluants solubles (Klaine et al. 2012). De ce fait, les données concernant les concentrations en NP manufacturées présentes dans les milieux sont rares voire absentes (Gottschalk et al. 2009; Tiede et al. 2009; Stone et al. 2010). Néanmoins, il est possible de prédire les concentrations en NP qui pourraient être retrouvées dans l'environnement à l'aide d'outils de modélisation (Gottschalk et al. 2009; Tiede et al. 2009). De nombreux auteurs s'accordent sur l'importance de caractériser rigoureusement les NP afin de pouvoir évaluer par la suite les effets de ces NP sur les organismes (Handy et al. 2008; Klaine et al. 2008). Stone et al. (2010) ont regroupé les caractéristiques principales les plus pertinentes : la taille, la dissolution, l'aire de la surface ainsi que sa charge et la composition de la particule qui sont primordiales pour comprendre leur comportement et les effets sur l'environnement d'après de précédents travaux (Oberdörster et al. 2005; Powers et al. 2006; Thomas et al. 2006; Powers et al. 2007; Klaine et al. 2008; Warheit 2008). Hassellöv et Kaegi (2009) proposent 10 facteurs clés pour la caractérisation des NP : la forme, la taille d'une particule primaire, la distribution des tailles, la structure, la composition, la surface spécifique, les fonctions de surface, la charge, l'état d'agglomération et la concentration (Figure 8). D'autres critères ont aussi une grande importance dans la cohérence des études sur les NP. Elles doivent être caractérisées dans leurs milieux d'exposition, à la concentration utilisée pour les tests de toxicité et avec plusieurs méthodes d'analyse (Domingos et al. 2009). En effet, de nombreuses questions apparaissent lorsque les NP pénètrent dans l'environnement. La taille et la structure des NP peuvent être modifiées et elles peuvent se lier avec les colloïdes ou les particules du milieu, s'agréger, s'agglomérer (Klaine et al. 2008). Dans ces conditions il est possible que les NP que l'on trouve dans le milieu soient très différentes des particules produites par l'industrie (Levard et al. 2012). Tous ces facteurs doivent être pris en compte pour prédire le devenir des NP dans l'eau et le sédiment mais aussi pour vérifier si les

organismes seront exposés à ces particules, sous quelle forme mais également si ils seront susceptibles de les accumuler. Dans une deuxième étape, la toxicité peut être évaluée.

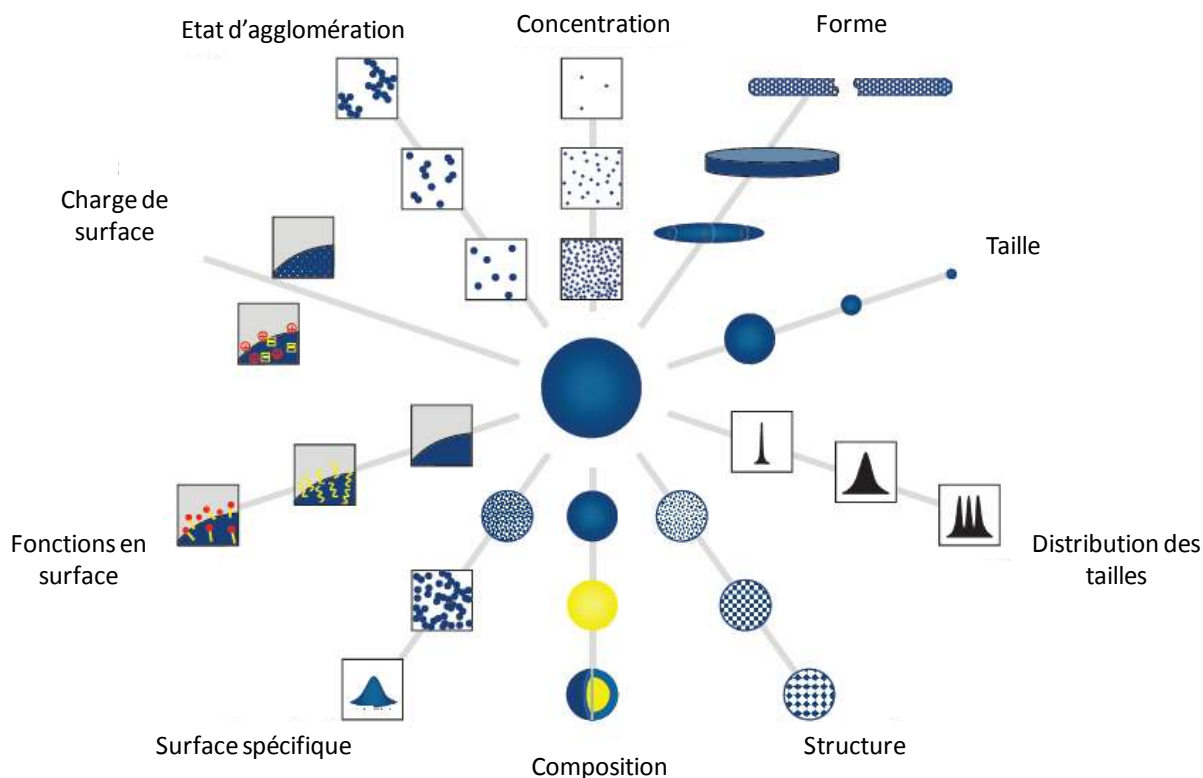


Figure 8 : Propriétés à prendre en compte dans la caractérisation des nanoparticules d'après Hassellöv et Kaegi (2009).

1.1. Les nanoparticules atmosphériques

Les particules présentes dans l'atmosphère peuvent être émises directement et sont alors appelées particules primaires ou sont issues des processus de condensation ou de nucléations de gaz présents dans l'atmosphère et sont des particules secondaires (Hester et Harrison 2007). Les TSPs (Total Suspended Particles) incluant les PM₁, PM_{2.5} et PM₁₀ (PMX particules de X μm) sont caractérisées selon leurs sources, leurs comportements dans l'atmosphère et leurs effets sur la santé. Plus récemment, les UFPs (Ultrafine particles <100 nm) ont fait l'objet

d'une attention croissante en raison de leurs effets sur la santé et l'environnement (Xia et al, 2009). Les NP représentent une faible proportion de l'ensemble des particules présentes en suspension dans l'atmosphère. Les PM_{0.1} qui appartiennent aux NP proviennent en grande partie du trafic routier (62%) et la part la plus faible correspond aux NP manufacturées (3%) (Hester et Harrison 2007). La composition des NP dans l'atmosphère est dominée par la présence de matières organiques entre 52 et 67% et les NP métalliques représentent 12 à 20% dans des villes américaines telles que Riverside et Azusa en Californie (Kuhn et al. 2005). Les densités mesurées dans les environnements urbains sont comprises entre 20 000 et plus de 100 000 particules par cm³ et varient quotidiennement avec la fréquentation des automobiles dans les villes mais peuvent aussi varier selon les saisons (Figure 9). Les densités de particules comprises entre 10 et 500 nm mesurées dans les environnements urbains sont 2 à 3 fois plus importantes qu'en milieu rural (Wang et al. 2010).

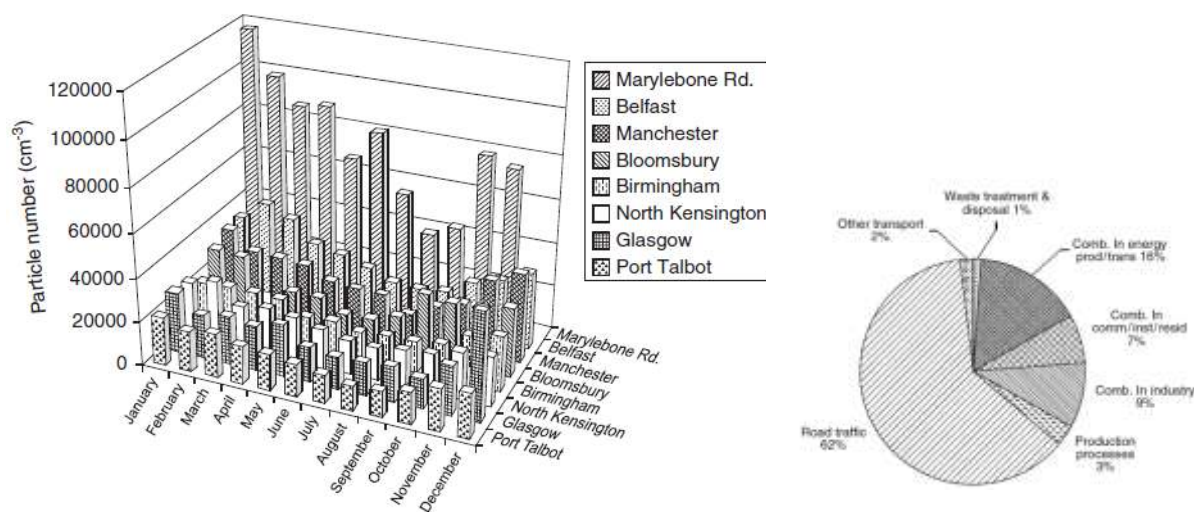


Figure 9 : Origine et évolution saisonnière des densités des particules mesurées dans l'air de villes du Royaume Uni d'après Hester et Harrison (2007).

Dans l'air comme dans tous les fluides, les NP s'agglomèrent entre elles, ou avec les autres particules dans l'air en fonction de leur nombre, leur densité et en fonction du temps (Oberdörster et al. 2005). Ces NP tendent à se déposer et peuvent être remises en suspension par le vent.

1.2. Les nanoparticules en phase aqueuse

Au-delà du relargage de NP manufacturées directement dans l'eau, le dépôt des NP atmosphériques combiné au ruissellement et à l'érosion des sols contribuent également à leur entrée dans les milieux aquatiques. Les courants marins et les vents conditionnent leur dispersion dans ces milieux, dans les eaux de surface ou en remettant en suspension les particules sédimentées (Figure 10).

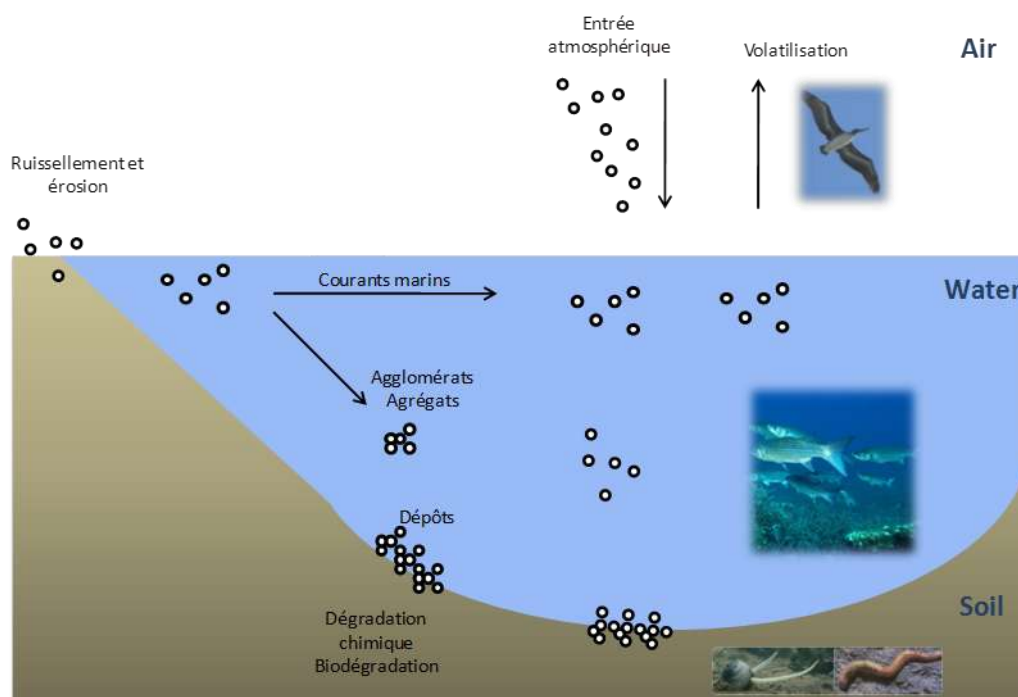


Figure 10 : Devenir des nanoparticules dans l'environnement d'après Klaine et al. (2008).

Le comportement des NP dans les milieux aqueux et notamment leur agglomération est principalement régi par les phénomènes de mouvement Brownien, mécanique des fluides et de gravité (Nowack et Bucheli 2007) mais aussi les interactions de Van der Waals, les interactions électrostatiques, les phénomènes de répulsion (Wiesner et Bottero 2007) et la force de dissolution (Sellers et al. 2009). L'agrégation des NP augmentera généralement avec la force ionique de la solution et la concentration de cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} . Ainsi les NP ont tendance à s'agréger davantage en eau de mer qu'en eau douce (Monteiro-Riviere 2007). Les conditions physicochimiques telles que la température, le pH, la salinité, les concentrations en matières organiques peuvent aussi influencer le comportement des NP

dans l'eau (Wiesner et Bottero 2007), c'est-à-dire leur dissolution, leur agglomération ou leur agrégation (Figure 11).

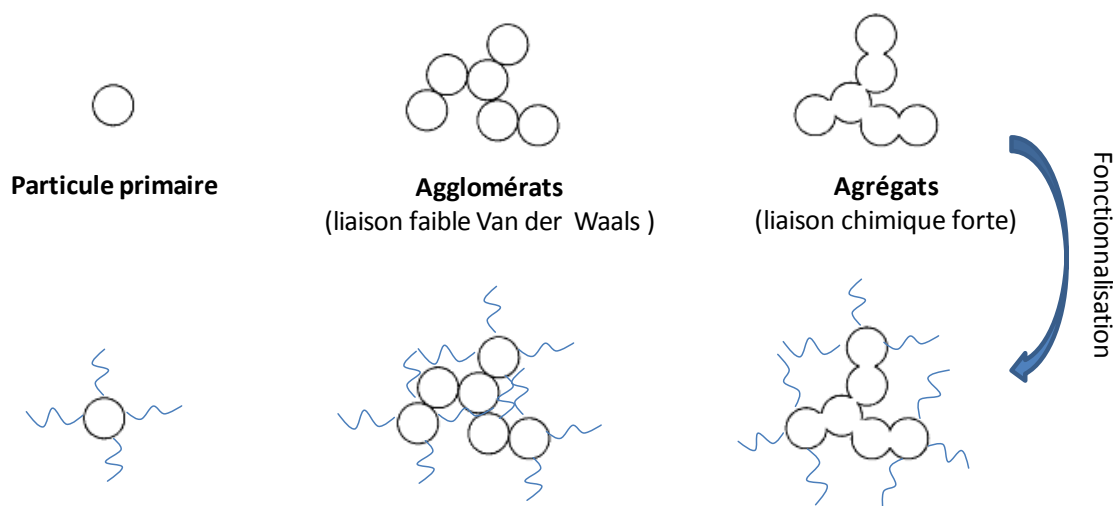


Figure 11 : Formation d'agglomérats, d'agrégats et fonctionnalisation des nanoparticules dans l'environnement.

Les milieux aquatiques contiennent une grande variété de complexes, des substances hétérogènes et polydispersées issues de l'érosion, des systèmes bactériens et sont soumis à d'autres processus qui ont le potentiel d'interagir avec les NP manufacturées et modifier sensiblement leur comportement (Lead et Wilkinson 2007). A titre d'exemple, le comportement des Ag NP dans l'environnement a été revu par Levard et al. (2012). Ces auteurs ont montré que la transformation des Ag NP provoquée par des réactions avec des ligands organiques ou inorganiques a des effets sur la stabilité physique et chimique de ces NP et donc aussi sur leur toxicité potentielle. Diegoli et al. (2008) ont constaté que les acides humiques améliorent la stabilité des particules à des valeurs de pH extrêmes en formant un revêtement de surface qui affecte ainsi la charge de surface et la chimie des particules en eau douce. La matière organique naturelle (NOM) peut également influencer la dispersion et la stabilité des nanotubes de carbone en eau douce (Hyung et al. 2007). Puisque de nombreux polluants sont actuellement présents dans les milieux aquatiques (Amiard-Triquet et Rainbow 2009), il est probable que les NP puissent se lier à ces polluants pour former des mixtures complexes dont le comportement et la toxicité restent difficiles à évaluer (Moore 2006).

L'interaction des NP avec des composés organiques toxiques (Figure 12) peut amplifier ou diminuer la toxicité des ces composés (Nowack et Bucheli 2007).

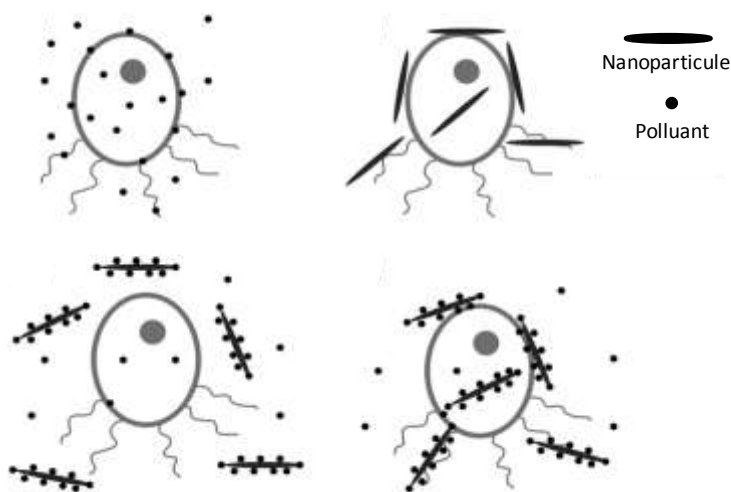


Figure 12 : Interaction entre les nanoparticules, les polluants et les organismes dans l'environnement d'après Novack et Buchelli (2007).

1.3. Les nanoparticules dans les sols et les sédiments

Des NP naturelles incluant des oxydes métalliques sont présentes dans tous les écosystèmes et jouent un rôle important dans les processus biochimiques (Wigginton et al. 2007). Les NP manufacturées et libérées dans l'environnement forment des agrégats et agglomérats dans l'eau, se déposent et sont stockées majoritairement dans les sédiments (Klaine et al. 2008). Leur dépôt augmente avec la taille des particules conduisant à une exclusion progressive des NP en suspension dans les fluides selon leur taille. Une fois dans les sédiments, les NP sont soumises aux conditions physico-chimiques (dégradation chimique) et interagissent avec le biota (biodégradation) mais aussi avec la matière organique (Farré et al. 2009). Le rôle de la biotransformation et biodéposition a été mise en évidence dans une étude portant sur le bivalve (*Corbicula fulminea*) exposé à des Au NP (Hull et al. 2011). Ces auteurs montrent que la biodégradation par les invertébrés benthiques est un processus important dans le devenir et le transport de NP persistantes dans les systèmes aquatiques. Les transferts dans la chaîne alimentaire pourraient être à l'origine de contamination des plus hauts niveaux trophiques (incluant l'homme), mais les démonstrations de transferts trophiques sont pour le

moment à leurs prémices (Ferry et al. 2009). Les particules sédimentaires sont connues pour jouer un rôle important dans la séquestration et le transport des contaminants sur de grandes distances via les courants marins. Ainsi, les caractéristiques hydrodynamiques et morphologiques des zones côtières et estuariennes qui déterminent en grande partie la distribution des NP liées à ces sédiments. En raison de la complexité du comportement des NP dans le sol, la caractérisation, les expériences d'exposition et les tests de toxicité associés sont difficiles à mettre en œuvre (Kool et al. 2011).

1.4. Les outils de caractérisation des nanoparticules dans l'environnement.

Les challenges concernant la caractérisation de nanomatériaux dans l'environnement sont multiples puisqu'il constitue un milieu non contrôlé avec de nombreux paramètres fluctuant. Le premier problème concerne la difficulté de localiser et de quantifier de faibles concentrations de nanomatériaux dans l'environnement. En outre, les nanomatériaux manufacturés ne représentent qu'une petite fraction de l'ensemble des NP incluant celles d'origine naturelle. Si la quantification des nanomatériaux dans l'eau est complexe, la séparation des nanomatériaux dans les sols et les sédiments est encore plus difficile. Des efforts sont nécessaires en termes de recherche pour identifier, isoler et caractériser les nanomatériaux dans des échantillons naturels (Monteiro-Riviere 2007). A l'heure actuelle, beaucoup de techniques de caractérisation exigent un prétraitement des échantillons (séchage, analyse sous vide) qui peut modifier leurs formes et leurs propriétés originales. De plus, pour l'étude de ces matériaux particuliers les mesures peuvent également être fortement biaisées en raison de manque d'homogénéité d'échantillonnage. Un consensus apparaît dans la littérature scientifique concernant l'importance d'utiliser de multiples techniques d'analyse afin d'éviter des biais résultant de l'échantillonnage (Gottschalk et al. 2009; Hassellöv et Kaegi 2009; Tiede et al. 2009; Stone et al. 2010). Certaines de ces techniques, et leurs capacités d'analyse sont présentées ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : Les méthodes de caractérisation des nanoparticules d'après Hassellöv et Kaegi (2009).

Méthode	Size (nm) 1 10 100 1000	Distribution des tailles	Forme	Agglomération	Concentration	Propriété de surface	Structure
Atomic force microscopy (AFM)		+++	oui	oui	ppb-ppm	++	non
Méthode N2-BET		non	non	non		+	non
Centrifugation		++	non	oui		non	non
Dialyse		++	non	non		non	non
Dynamic light scattering (DLS)		+	oui	oui	ppm	non	non
Electrophorèse		++	non	non	ppm	+	non
Electron energy loss spectroscopy (EELS) and energy dispersive X-ray (EDX)	●	non	non	non	ppm	non	non
Environmental scanning electron microscope (ESEM)		++	non	oui	ppb-ppm	non	non
Filtration		++	non	non		non	non
Flow field-flow-fractionation (Flow FFF)		+++	oui	oui	ppm	non	non
Sedimentation field-flow-fractionation (Sed FFF)		+++	oui	oui	ppb	non	non
Hydrodynamic chromatography		++	non	non		non	non
Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)		non	non	non	ppt-ppb	non	non
Laser induced breakdown detection (LIBD)		++	non	oui	ppt	non	non
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)		+++	non	oui	ppb-ppm	non	non
Size-exclusion chromatography (SEC)		++	non	non		non	non
Scanning electron microscope (SEM)		+++	oui	oui	ppb-ppm	non	non
Selective laser sintering (SLS)		+	oui	oui	ppm	non	non
Selected area electron diffraction (SAED)	●	non	non	non		non	oui
Spectrometrie		+	non	non	ppb-ppm	+	non
Transmission electron microscopy (TEM)		+++	oui	oui	ppb-ppm	+	oui
Turbidimètre		+	non	oui	ppb-ppm	non	non
Ultrafiltration		++	non	non		non	non
X-Ray Photoelectron Spectroscopy		non	non	non		+++	non
X-Ray diffraction		non	non	non		non	oui

2. La toxicité des nanoparticules pour l'homme

Même si la caractérisation et la quantification des NP restent complexes, il est primordial d'étudier dès à présent la toxicité de ces substances puisqu'elles sont manipulées et commercialisées dans de nombreux secteurs d'activité. A l'issue de leur entrée dans

l'environnement, les expositions chroniques ou accidentelles sont à envisager. Les risques pour l'homme peuvent intervenir soit par contamination directe via l'air dans les villes polluées, à proximité des sites de production de NP, mais aussi pour les travailleurs qui produisent et manipulent des nanomatériaux. La pénétration des NP peut intervenir par dépôt sur la peau, par injection (pour le cas de "nano" médicament directement dans le sang), par inhalation d'air contaminé via le tractus respiratoire ou par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés dans le tractus gastro-intestinal (Oberdörster et al. 2005). Lorsque les NP passent les barrières biologiques, elles peuvent atteindre tous les organes via le sang. Etudier la toxicité des NP est une tâche ardue puisqu'il existe une grande variété de NP basée sur des substances différentes, avec de multiples tailles, formes et intégrées dans des solutions, des gels qui peuvent modifier très largement les propriétés de ces NP et leur toxicité. Cependant les expériences de toxicité *in vitro* permettent de mettre en avant certains effets liés à l'exposition de cellules à des nanomatériaux pour prévoir les effets sur la santé humaine (revue de Xia et al. 2009; Arora et al. 2012).

2.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant provient de la génération de ROS (Réactive Oxygen Species) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroxyles ($OH\bullet$) qui peuvent endommager les cellules (péroxydation lipidique, dommages sur les protéines ou l'ADN, perturbation du fonctionnement des mitochondries). Les métaux actifs dans les réactions d'oxydo-réduction sont susceptibles de produire des ROS via la réaction de Fenton et conduisent à la production de radicaux libres (Winterbourn 1995; Karlsson 2010). Les NP sont également susceptibles de produire ce type de réaction et leur toxicité est communément associée à la génération de stress oxydant (revue de Xia et al. 2009). Ces auteurs présentent les mécanismes liés aux NP générant du stress oxydant : la photoactivation par les UV, les discontinuités et défauts en surface du cristal qui modifient l'état électronique des particules, le cycle Redox mais aussi la dissolution qui produit des ions libres susceptibles de générer des ROS. Karlsson et al. (2008) montrent que le stress oxydant varie fortement selon le type de NP auxquelles sont exposées les cellules (CuO , TiO_2 , $CuZnFe_2O_4$, Fe_3O_4 , Fe_2O_3 ou des nanotubes de carbone). De

nombreux travaux mettent en avant la génération de stress oxydant sous l'effet de NP métalliques dans des souches cellulaires humaines : les Ag NP dans les cellules de l'épiderme (Arora et al. 2008), les TiO₂ NP dans les cellules épithéliales bronchiales (Park et al. 2008), les CuO NP dans les cellules épithéliales de larynx (Fahmy et Cormier 2009), les AuNP dans des cellules de poumons de fœtus (Li et al. 2010), les NiFeO₃ NP dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines (Ahamed et al. 2011).

2.2. Apoptose/nécrose

La génération de ROS peut être à l'origine du déclenchement de processus d'apoptose. Ahmad et al. (2012) ont démontré que des NP de silice pouvaient induire l'apoptose dans les cellules hépatiques humaines, sous l'action des ROS et régulés notamment par une surexpression des gènes codant pour la caspase-3. Des résultats similaires ont été observés pour ces cellules de poumons humains exposés à des CuO NP (Ahamed et al. 2010) et des NiFeO₃ NP (Ahamed et al. 2011). Les travaux de Fröhlich et al. (2009) montrent que la cytotoxicité dans des cellules endothéliales exposées à des NP de polystyrène peut être liée au processus d'apoptose, de nécrose ou des troubles de la prolifération cellulaire. Arora et al. (2008) montrent qu'une fragmentation de l'ADN issue de l'apoptose de cellule de peau humaine survient après exposition à des NP d'argent. Les NP de TiO₂ sont aussi susceptibles de générer de l'apoptose chez des cellules épithéliales de bronche (Park et al. 2008).

2.3. Génotoxicité

Les NP sont des sources probables de génotoxicité puisque leur taille leur permet de pénétrer les noyaux cellulaires et d'interagir directement avec l'ADN. Les dommages génotoxiques peuvent intervenir par lésion de l'ADN, ou en perturbant le bon fonctionnement de la mitose (Afsset 2010). Chen and von Mikecz (2005) ont montré que des NP de silice peuvent pénétrer dans les noyaux cellulaires entraînant une inhibition de la réplication, de la transcription et de la prolifération cellulaire. Des lésions de l'ADN peuvent intervenir indirectement par une déplétion en substances antioxydantes, via une perturbation de l'activité

mitochondriale et/ou par l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN. Les NP peuvent également générer des composés oxydants provenant de l'endocytose et/ou de la phagocytose qui pénètrent dans le noyau et altèrent l'ADN. Ahamed et al. (2010) montrent par exemple que des CuO NP peuvent avoir un potentiel génotoxique indirect via la génération de stress oxydant. Bahrba et al. (2009) ont démontré que des NP de CoCr peuvent induire indirectement des dommages de fibroblastes humains sans passer la barrière de cellules confluentes qui les protège. Ces auteurs proposent que les effets génotoxiques apparaissent via une cascade de réactions conduisant à l'apparition de lésions dans les fibroblastes sous la barrière de cellules confluentes.

3. Ecotoxicité des nanoparticules dans l'environnement

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études paraissent concernant le danger potentiel des NP vis-à-vis de l'environnement. Ces études ont principalement été menées dans l'eau douce et quelques travaux ont été réalisés dans l'eau de mer (Tableau 5). Du fait de la complexité des techniques à mettre en œuvre pour étudier le comportement et les effets des NP dans le sol et les sédiments, peu de travaux sont actuellement disponibles à ce sujet (Tableau 5). Ces travaux ont pourtant une pertinence écologique élevée au regard des propriétés d'aggrégation et d'agglomération puis de sédimentation des NP dans l'atmosphère et dans les milieux aquatiques.

Tableau 5 : Etudes toxicologiques et écotoxicologiques traitant des nanoparticules métalliques.

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Ag	0.76–50µg.mL ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	7-20 nm	24h	<i>In vitro</i>	Human fibrosarcoma and human skin/carcinoma cells	Oxidative stress, apoptosis thresholds	Arora et al. 2008
Ag	0.1 mg.L ⁻¹ to 10 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Citrate or polyvinyl pyrrolidone	3-40 nm	24-48h	<i>In vitro</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Gill cells)	Moderate cytotoxic effects, activation of defense	Farkas et al. 2011
Ag, Au	0.063-17.4 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Sodium citrate	1-5 nm and 5-10 nm	2h-48h	<i>In vitro</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Hepatocytes)	Ag NP caused a reduction in membrane integrity and cellular metabolic activity, Au NP caused an elevation of ROS levels	Farkas et al. 2010
Au	1 nM	Synthesized in laboratory	Fetal bovine serum	22.1 ± 1.9 nm to 35.5 ± 3.9 nm	72h	<i>In vitro</i>	Human lung fibroblasts	Oxidative stress	Li et al. 2010
C60 fullerene, TiO ₂ , SiO ₂	1-10 g.mL ⁻¹	Sigma–Aldrich, Degussa Evonik	Uncoated or not specified	C60: 0.7, TiO ₂ : 22 and SiO ₂ : 12nm	30-60 min	<i>In vitro</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (hemocytes)	Lysozyme release, extracellular oxyradical and nitric oxide (NO) production, depending on the concentration and the NP type and inflammatory effects.	Canesi et al. 2010a
Carbon black	1-50 µg.mL ⁻¹	Degussa Evonik	Uncoated or not specified	35 ± 12 nm	30-60 min	<i>in vitro</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (hemocytes)	NCB induced significant changes in mitochondrial parameters and inflammatory processes.	Canesi et al. 2008

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Carboxyl polystyrene	0.1-1.0 mg.L ⁻¹	Invitrogen	Uncoated or not specified	20-500 nm	4-24h	<i>In vitro</i>	Human endothelial cells	Apoptosis, necrosis and reduction of proliferation	Frohlich et al. 2009
CoCr	0.036 mg.cm ⁻² and 0.36 mg.cm ⁻²	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	29.5 ± 6.3 nm	24h	<i>In vitro</i>	Human fibroblast cell	DNA damage	Bhabra et al. 2009
CuO	10-50 µg.mL ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	52.51 ± 10.23 nm	24h	<i>In vitro</i>	Human lung epithelial cells	Induce oxidative stress, genotoxic potential which may be mediated through oxidative stress	Ahamed et al. 2010
CuO, TiO ₂ , ZnO, CuZnFe ₂ O ₄ , Fe ₃ O ₄ , Fe ₂ O ₃ and MWCNT	2-80 µg.mL ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	CuO: 42 nm, TiO ₂ : 63 nm, ZnO: 71 nm, CuZnFe ₂ O ₄ : 29 nm, Fe ₃ O ₄ : 20-30 nm, Fe ₂ O ₃ : 29 nm and MWCNT: 110-170 (5-9 × 10 ⁻³)	18h	<i>In vitro</i>	Human lung epithelial cells	High variation among different NP to cause toxic effects. CuO NP were the most toxic (ROS, DNA damage). The toxicity was not explained by Cu ions	Karlsson et al. 2008
Fe ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ and CuO	10-80 µg.mL ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	Fe ₂ O ₃ : 30-60 nm, Fe ₃ O ₄ : 20-40 nm, TiO ₂ : 20-100 nm and CuO: 20-40 nm	18h	<i>In vitro</i>	Human alveolar epithelial cell	Increased toxicity of NP compared to micrometer particles of the same composition	Karlsson et al. 2009

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
NiFe ₂ O ₄	1-100 µg.mL ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	26 ± 17 nm	24h	<i>In vitro</i>	Human lung epithelial cells	Induce oxidative stress evidenced by generation of reactive oxygen species (ROS), induced apoptosis	Ahamed et al. 2011
SiO ₂	25 µg.mL ⁻¹	Kisker, Postnova or Polysciences	Uncoated or not specified	40 nm-5µm	few hours to 24h	<i>In vitro</i>	Human epithelial and epithelial, human nasal septum	Inhibition of replication, transcription, and cell proliferation	Chen and Von Mikecz 2005
SiO ₂ , FeO ₃ , CuO	80 µg.cm ⁻²	Alfa Aesar, Nanostructured and Amorphous Materials, Inc.	Uncoated or not specified	SiO ₂ : 80 nm, FeO ₃ : 20-40 nm, Cu: 30 nm	30 min-5h	<i>In vitro</i>	Laryngeal epithelial cells	ROS generated by CuO induced oxidative stress	Fahmy and Cormier 2009
SiO _x	1-200 µg. mL ⁻¹	Nanostructured & Amorphous Materials, Inc	Uncoated or not specified	14.23 ± 2.16 nm	72h	<i>In vitro</i>	human liver carcinoma	Oxidative stress in dose-dependent manner indicated by induction of ROS and lipid peroxidation and depletion of GSH. Induction of apoptosis	Ahmad et al. 2012
TiO ₂	5-40 µg.mL ⁻¹	Degussa Korea	Uncoated or not specified	21 nm	24-96h	<i>In vitro</i>	Human bronchial epithelial cells	The ROS triggered the activation of CSP and exert cytotoxicity by an apoptotic process.	Park et al. 2008

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Cu	2-24 mg.g ⁻¹ depending from target organs	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	103.0 ± 2.0 nm	3h-7 days	Injection	Wistar	Apoptosis index as a criterion for the assess- ment of safe introduction of copper NP into organism of living systems	Sizova et al. 2012
TiO ₂	500 µg per mice	Hangzhou Dayang Nanotechnology Co. Ltd.	Uncoated	80 nm	2, 10, 20 and 30 days	Intranasally	Mice	Oxidative damage expressed as lipid peroxidation increased significantly	Wang et al. 2008
Multiple metal oxyde and two carbon nanopowder	0,1-500 mg.L ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	<100 nm	15 min-96h	Aquaeous and solid phase	Bacteria, micro algae, micro invertebrate and fish	Risk to aquatic life in water column and sediment compartments, differential sensivity depending on species	Blaise et al. 2008
ZnO, Fe-ZnO, TiO ₂ and CeO ₂	0.1-10 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory or Meliorum Technologies, Evonik Degussa	Uncoated or not specified	300-1000 nm (in seawater)	96h	Culture	<i>Lytechinus pictus</i> (Embryo)	Physical characteristics of metal oxide NMs in seawater were linked with their toxicity	Fairbairn et al. 2011

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Ag	0.1-1 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Polyvinyl alcohol coated	5-35 nm	24h	Culture	Autotrophic and heterotrophic bacteria	Ag NP attached to the microbial cells, probably causing cell wall pitting. NP could have detrimental effects on the microorganisms	Choi et al. 2008
Ag	20-2000 µg.L ⁻¹	Stanford Materials Corp.	Citrate	65 ± 30 nm	4-24h	Culture	<i>Pseudomonas putida</i>	biofilms are impacted by Ag NP depending from medium types	Fabrega et al. 2009
Ag	0.2 -33 nM	Synthesized in laboratory	Sodium borohydride	13.5 ± 2.6 nm	24h	Culture	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i> were inhibited at the low concentration of Ag NP, whereas the growth-inhibitory effects on <i>S. aureus</i> were mild	Kim et al. 2007
Ag	0.04-0.71 nM	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	11.6 ± 3.5 nm	1.25-120 hours post fertilization	Culture	<i>Danio rerio</i> (embryo)	Toxicity of Ag NP and types of abnormalities are dependent on the dose of Ag NP	Lee et al. 2007
Ag	0.5-50 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Citrate or polyvinyl pyrrolidone	7-21 nm	1-3 days	Culture	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Growth inhibition, at least part of the toxicity was mediated ionic silver	Meyer et al. 2010

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Ag	2.12×10^{-10} - 1.3×10^{-7} M	Nanostructured & Amorphous Materials Inc.	Polyvinyl pyrrolidone	60-70 nm	48h	Culture	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	EPS may be involved in Ag detoxification	Miao et al. 2009
Ag	0.0016-1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Wake Forest University Center for Nanotechnology	Sodium citrate	15 ± 6 nm	48h	Culture	<i>Crassostrea virginica</i> (embryo)	Adverse effects on embryonic development, MT induction, NP or ionic effect	Ringwood et al. 2010
Ag	0.05-0.5 mg.L^{-1}	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	20 nm	24-72h	Culture	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Oxidative stress may have been an important mechanism in AgNP toxicity	Roh et al. 2009
Ag	<25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Biosynthesis in laboratory or chemically synthesized	Uncoated or Oleate	4 ± 1.5 nm	8-15h	Culture	<i>E. coli</i> , <i>S. oneidensis</i> and <i>B. subtilis</i>	Strain dependent inhibition depended on the synthesis procedure and the surface coat	Suresh et al. 2010
Al_2O_3 , SiO_2 , ZnO, and TiO_2	5-1000 mg.L^{-1}	Zhejiang Hongsheng Material Technology Co.	Uncoated or not specified	Al_2O_3 : 50-100 nm, SiO_2 : 20-50 nm, ZnO: 20 ± 5 nm and TiO_2 : 5-10 nm	2-6 days	Culture	<i>Chlorella</i> sp.	ZnO and TiO_2 NP inhibited the algal growth	Ji et al. 2011
Au, Ag, and Fe_3O_4	10-116 mg.L^{-1}	Synthesized in laboratory	Deoxygenated tetramethylammonium hydroxide	7.57-33.8 nm	5-15 min (bioluminescent test), 7 days (Seed germination test)	Culture	<i>Cucumis sativus</i> and <i>Lactuca sativa</i>	Low effects	Barrena et al. 2009
CdSE (quantum dot)	10-100 μL of QD solution	Evident Technologies	ZnS layer	6.2 ± 0.05 nm	24h	Culture	<i>Crassostrea virginica</i> (Hepatopancreatic cells)	Evidence of toxicity to hepatopancreatic cells	Ringwood et al. 2006

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
CdTe	1.6-8 mg.L ⁻¹	American Dye Source	Uncoated or not specified	10kDa-0.45 µm (in freshwater)	24h	Culture	<i>Elliptio complanata</i>	Immunotoxicity, oxidative stress and DNA damage	Gagné et al. 2008
CeO ₂ , SiO ₂ , TiO ₂	1 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory or Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	CeO ₂ : 15-30 nm, SiO ₂ : 7-10 nm, TiO ₂ : 7-20 nm	24-96h	Culture	<i>Daphnia magna</i> , <i>Chironomus riparius</i>	CeO ₂ only induced DNA damage	Lee et al. 2009
Cu	200-1000 mg.L ⁻¹	Korean Basic Science and Institute	Uncoated or not specified	ND	48h	Culture	<i>Phaseolus Radiatus</i> , <i>Triticum Aestivum</i>	Copper NP were toxic to both plants and also were bioavailable, toxicity clearly resulted from Cu NP	Lee et al. 2008
CuO	10-1000 mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	58 ± 45 nm	6 days	Culture	<i>Raphanus sativus</i> , <i>Lolium perenne</i> and <i>Lolium rigidum</i>	Induction of DNA damage	Atha et al. 2012
CuO	0.004-0.02 g.L ⁻¹	MTI Corporation	Uncoated or not specified	81 ± 16 nm	6h	Culture	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cellular aggregation, deteriorative effect on chlorophyll probably due to formation of reactive oxygen species	Saison et al. 2010
CuO, TiO ₂ , Cu-doped TiO ₂	20 mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich or synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	TiO ₂ : 20 nm, Cu-doped TiO ₂ : 20 nm, CuO: 40 nm	24h	Culture	<i>Mycobacterium smegmatis</i> and <i>Shewanella oneidensis</i>	Toxicity depending from the target species	Wu et al. 2010a

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
TiO ₂ (byproducts)	0.1-10 mg.L ⁻¹	BASF The chemical company	Aluminium hydroxide	14-16 nm	24h	Culture	<i>Eisenia fetida</i>	Increased expression of MT and SODm RNA (Real-time PCR) and induction of apoptotic activity.	Bigorgne et al. 2010
ZnO	50-1000 mg.kg ⁻¹	Nanjing Emperor Nano Material Co.	Uncoated or not specified	30 ± 5 nm	96h	Culture	<i>Eisenia fetida</i>	Dose and medium dependent toxicity	Li et al. 2011
ZnO, CuO	1.85-25 mg.L ⁻¹ (ZnO) and 31.25-500mg.L ⁻¹ (CuO)	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	ZnO: 50-70 nm, CuO: 30 nm	4-24h	Culture	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Toxicity of NP was due to dissolved metal ions	Mortimer et al. 2009
ZnO, CuO, TiO ₂	31.25–1000 mg.L ⁻¹ (ZnO), 10-160 mg.L ⁻¹ (CuO), 625–20000 mg.L ⁻¹ (TiO ₂)	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	ZnO: 50-70 nm, CuO: 30 nm, TiO ₂ :25-70 nm	16-18h	Culture	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CuO NP toxicity higher than bulk, ZnO NP toxicity is similar to bulk, explain in part from dissolution, TiO ₂ NP are not toxic	Kasemets et al. 2009
ZnO, TiO ₂	20-100 mg.L ⁻¹	NanoAmor	Uncoated or not specified	ZnO: 20 nm, TiO ₂ : 20 nm	10 min	Culture	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Shewanella oneidensis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Cyanothece</i> 51142	Exposing ZnONP to biological systems appears to have a much higher antimicrobial activity	Wu et al. 2010b

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
TiO ₂	1-100 mg.L ⁻¹	T-lite™ SF, BASF	Al(OH) ₃ and polydimethyl siloxane	10-50 nm	1, 4 and 8 weeks	Food and Soil	Lumbricus terrestris	Enhanced apoptotic frequency without significant bioaccumulation.	Lapied et al. 2011
Au	100 mg.L ⁻¹ (primary producers)	Nanocomposix San Diego	Tannic acid	5, 10, 15 nm	7 days	Food chain exposure	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Manduca sexta</i> (larvae),	Trophic transfer and biomagnification	Judy et al. 2011
⁶⁷ ZnO	algae exposed to 10-1000 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Diethylene glycol	20-110 nm	3-7h	Food exposure	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Damage digestion	Croteau et al. 2011a
TiO ₂	10-1000 mg TiO ₂ g ⁻¹ dry food	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	25-75 nm	3-14 days	Food exposure	<i>Porcellio scaber</i>	Responses to NP appeared to be unique	Drobne et al. 2009
TiO ₂	0,1 µg.g ⁻¹ -mg.g ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	15 nm	1-55 days	Food exposure	<i>Porcellio scaber</i>	Activities of antioxidant enzymes	Jemec et al. 2008
TiO ₂	10-100 mg.kg ⁻¹	DeGussa AG, Lawrence Industries	Uncoated or not specified	21 nm	8 weeks	Food exposure	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	TiO ₂ NP behave like other toxic dietary metals where growth rate and haematology can be protected during sub-lethal exposures	Ramsden et al. 2009
TiO ₂ , ZnO and C60	1/10 of the animal's weight	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	TiO ₂ : 10nm, ZnO: 85 nm, C60: ND	30 min	Food exposure	<i>Porcellio scaber</i>	Membrane destabilization potential	Valant et al. 2009

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
ZnO	2000-5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry food	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	84.9 nm	4 weeks	Food exposure	<i>Porcellio scaber</i>	Bioaccumulation of Zn depends most probably on Zn dissolution	Pipan-Tkalec et al. 2010
Au	2-8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Synthesized in laboratory	Bovine serum albumin or citrate	7.8, 15, 46 nm	345h	Freshwater	<i>Corbicula fluminea</i>	Size effect, biodeposition play a role in the fate and transport of NP	Hull et al. 2011
Ag	5-400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Sigma–Aldrich or synthesized in laboratory	Uncoated or organically coated	<100 nm and <150 nm	48h	Freshwater	<i>Daphnia magna</i>	AgNP used in this study have toxicity characteristics similar to those of ionic silver	Allen et al. 2010
Ag	63-300 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NanoAmor	Polyvinyl pyrrolidone	81 $\pm$ 2 nm	20h	Freshwater	<i>Perca fluviatilis</i>	impairment of the tolerance to hypoxia	Bilberg et al. 2010
Ag	10-50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	49.6 nm (acute toxicity test), 1-10 days (genes expression)	24-96h	Freshwater	<i>Oryzias latipes</i>	Cellular and DNA damage, carcinogenic and oxidative stresses	Chae et al. 2009
Ag	10-100000 nM	NanoSys GmbH	Carbonate coated	25 $\pm$ 13 nm	8 days	Freshwater	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Particles contributed to the toxicity as a source of Ag ⁺	Navarro et al. 2008
Ag, Cu, TiO ₂	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ag), 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu and TiO ₂)	Quantum Sphere Incorporated and Degussa	Uncoated or not specified	Ag: 26.6 $\pm$ 8.8 nm, Cu: 26.7 $\pm$ 7.1 nm, Al: 41.7 $\pm$ 8.1, Ni: 6.1 $\pm$ 1.4 nm, Co: 10.5 $\pm$ 2.3 nm, TiO ₂ : 20.5 $\pm$ 6.7	48h	Freshwater	<i>Danio rerio</i>	NP have a distinct biological effect not relied solely by release of soluble metal ions	Griffitt et al. 2009

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
C60, TiO ₂	0.5-500 ppm	Synthesized in laboratory	Uncoated or Tetrahydrofuran	20-200 nm	24h	Freshwater	<i>Daphnia pulex</i>	Significant production of the toxicity biomarkers GST and CAT indicating changes in reactive oxygen species. Functionalization alters both toxicity and oxidative stress.	Klaper et al. 2009
CdTe	0.4-4 mg.mL ⁻¹	Synthesized in laboratory	Thioglycolic acid	3.2 nm	12-72h	Freshwater	<i>Hydra vulgaris</i>	QDs caused time and dose dependent morphological damages more severe than Cd ²⁺ ions. Subtle genetic variations, in the absence of morphological damages	Ambrosone et al. 2012
CdTe (quantum dot)	0-8 mg.L ⁻¹	American Dye Source, Inc.	Thioglycolate	1kDa-0.45 µm (in freshwater)	24h	Freshwater	<i>Elliptio complanata</i>	Cd have effects on MT levels and can generate oxidative stress	Peyrot et al. 2009

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
CuO	0.25-1.5 mg.L ⁻¹	Quantum Sphere Incorporated	Uncoated or not specified	80 nm	48h	Freshwater	<i>Danio rerio</i>	CuNP are acutely toxic to zebrafish. Gill was the primary target organ for CuNP. Toxicity not explained solely by Cu ions.	Griffitt et al. 2007
CuO	0.5, 4, 50 175 mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	31 ±12.8 nm	48h	Freshwater	<i>Daphnia magna</i>	Ultrastructural changes in the midgut, solubilization explained only part of the toxicity	Heinlaan et al. 2011
Ni	10-1000 mg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	28, 63, 112 nm	5 days	Freshwater	<i>Danio rerio</i>	These results suggest that configuration of NP may affect toxicity more than size	Ipsas et al. 2009
TiO ₂	0.1, 0.5, or 1.0 mg.L ⁻¹	DeGussa AG, Lawrence Industries	Uncoated	21 nm	14 days	Freshwater	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Respiratory distress, oxidative stress, organ pathologies, and the induction of anti-oxidant defences	Frederici et al. 2007

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
TiO ₂	1-10 mg.L ⁻¹	Sigma Chemical	Uncoated or not specified	<40 nm	24-48h	Freshwater	<i>Daphnia magna</i>	Biochemical measurements showed that TiO ₂ NP exposure significantly increased the antioxidant defenses CAT, GPX and GST. Toxicity was mediated by ROS	Kim et al. 2010
TiO ₂	5-400 mg.L ⁻¹	Hongsheng Material Sci. & Tech. Co.	Uncoated or not specified	50 nm	1-8 days	Freshwater	<i>Cyprinus carpio</i> (Juvenile)	Depletion of antioxidant enzymes activities and the elevation of LPO in the liver	Linhua et al. 2009
TiO ₂	0.1-100 mg.L ⁻¹	Degussa	Uncoated	21 nm	48h-21 days	Freshwater	<i>Danio rerio</i>	Severe growth retardation and mortality, as well as reproductive defects	Zhu et al. 2010
TiO ₂ , C60, C60HxC70Hx	2.0 mg.L ⁻¹ (TiO ₂) and 260 µg.L ⁻¹ (C60)	Synthesized in laboratory	Tetrahydrofuran (C60)	C60: 10-20 nm, TiO ₂ : 30 nm	60 min	Freshwater	<i>Daphnia magna</i>	C60 cause modification of heart rate	Lovern et al. 2007
TiO ₂ , ZnO	10-300 mg.L ⁻¹ (TiO ₂) and 2-50 mg.L ⁻¹ (ZnO)	Nano Applied Research Center of Nanjing University of Technology	Uncoated	TiO ₂ : 20-70 nm, ZnO: 16-157 nm	96h	Freshwater	<i>Danio rerio</i>	Oxidative stress, gut tissues exhibited oxidative effects after exposure to NP	Xiong et al. 2011

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
ZnO	1-100 mg.L ⁻¹	Hangzhou Wanjing New Material Co., Ltd.	Uncoated or not specified	36.7 ± 11.6 nm	96h	Freshwater	<i>Danio rerio</i> (embryo)	Mortality for high doses, retarding the embryo hatching, reducing larvae sizes	Bai et al. 2010
ZnO, CeO ₂ , TiO ₂	50-5000 µg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated	ZnO: 68.7 ± 3.35 nm, CeO ₂ : 10.2 ± 0.78 nm, TiO ₂ : 34.2 ± 1.73 nm	24h-14 days	Freshwater	<i>Danio rerio</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Low uptake of metal oxide NP	Johnston et al. 2010
ZnO, CuO, TiO ₂	Gradient of concentrations up to 20 g.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	ZnO: 25-70, Cu: 30 nm, TiO ₂ : 50-70 nm	30 min -48h	Freshwater	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Daphnia magna</i> and <i>Thamnocephalus platyurus</i>	Metal oxide particles do not necessarily have to enter the cells to cause the toxicity	Heinlaan et al. 2008
ZnO, TiO ₂ , CuO	0.1- 100 mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	ZnO: 50-70 nm, TiO ₂ : 25-70 nm, CuO: 30 nm	24-72 h	Freshwater	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Toxicity is mainly due to the solubilization of ions	Aruoja et al. 2009
CuO and ZnO	µg.L ⁻¹ -mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated or not specified	CuO: 30 ±10, ZnO: 60 nm	24h-48h	Artificial or natural freshwater	<i>Daphnia magna</i> , <i>Thamnocephalus platyurus</i> , <i>Tetrahymena thermophila</i>	The toxicity of both nanoCuO and nanoZnO was mostly due to the solubilised ions	Blinova et al. 2010
CdS	5, 50 or 500 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated	4.2 ± 1 nm	21 days	Brackish water	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Liver pathology and compromised reproductive fitness	Sanders et al. 2008

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Ag, Cu, Al, Ni, Co, TiO ₂	Gradient of concentrations up to 10 mg.L ⁻¹	Quantum Sphere Incorporated	Metal oxyde layer	Ag: 26.6 ± 8.8 nm, Cu: 26.7 ± 7.1 nm, Al: 41.7 ± 8.1, Ni: 6.1 ± 1.4 nm, Co: 10.5 ± 2.3 nm, TiO ₂ : 20.5 ± 6.7	48h	Hard freshwater	<i>Daphnia pulex</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Susceptibility to nanometal toxicity differed among species	Griffitt et al. 2008
Au	7.08×10 ⁸ particles mL ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	65 nm × 15 nm	12 days	Mesocosm	<i>Spartina alterniflora</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Ilyanassa obsoleta</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Palaemonetes pugio</i>	Au NP can pass from the water column to the marine food web. Clams and biofilms accumulated the most NP	Ferry et al. 2009
Ag	0,6-87 nM (water), 7 to 250 nmoles g.L ⁻¹ (food)	Synthesized in laboratory	Citrate or humic acid	17 ± 5 nm or 13 ± 3 nm	24h	MOD water and food exposure	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Damage diegestion with loss of weight	Croteau et al. 2011b
NBC, C60 fullerene, TiO ₂ , SiO ₂	0.05-5 mg.L ⁻¹	Sigma–Aldrich, Degussa Evonik	Uncoated or not specified	NBC: 30 nm, C60: 0.7 nm, TiO ₂ : 22 nm and SiO ₂ : 12 nm	24h	Seawater	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Lysosomal membrane destabilisation with NCB C60 > TiO ₂ NP > SiO ₂ NP. Changes in catalase and GST.	Canesi et al. 2010b
Ag	0-50 g Ag.g ⁻¹ dry weight (dw) sediment	Sigma–Aldrich	Polyvinyl pyrrolidone	20-200 nm	10 days	Seawater	<i>Nereis diversicolor</i>	Genotoxic effect	Cong et al. 2011
Ag	0.7 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	20-25 nm	3h30	Seawater	<i>Mytilus edulis</i>	Bioaccumulation of Ag in organs depend of the Ag form, this is not true for extrapallial fluid	Zuycov et al. 2010

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Au	750 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Citrate	13 nm	24h	Seawater	<i>Mytilus edulis</i>	Induction of oxidative stress	Tedesco et al. 2008
Au	750 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Citrate	15.6 ± 5 nm	24h	Seawater	<i>Mytilus edulis</i>	Modest level of oxidative stress without lipid peroxidation	Tedesco et al. 2010a
Au	750 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	5.3 ± 1.0 nm	24h	Seawater	<i>Mytilus edulis</i>	Oxidative stress, size dependant effect	Tedesco et al. 2010b
CuO	10 µg.L ⁻¹	Intrinsiq Materials Limited	Uncoated	10–100 nm	7-16 days	Seawater	<i>Scrobicularia plana</i> , <i>Hediste diversicolor</i>	Induction of defence, specific nano effect	Buffet et al. 2011
CuO	10 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	31 ± 10 nm	3-15 days	Seawater	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Oxidative stress, lipid peroxidation, AChE inhibition	Gomes et al. 2011
CuO	10 µg.L ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	31 ± 10 nm	3-15 days	Seawater	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Oxydative stress, effect related to the nano form	Gomes et al. 2012
Fe (zero-valent)	0.1-10mg.L ⁻¹	Nanoiron Ltd.	Biodegradable organic- (Na acrylic copolymer) and inorganic stabilizer	50 nm	2h	Seawater	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Decline fertilization succes, delay in development, DNA damage.	Kadar et al. 2011
Fe ₂ O ₃	100-10000 µg.L ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	40.1 ± 1.3 nm	48h	Seawater	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Very strong interactions between acidification of water and NP effects	Kadar et al. 2010a

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
Glass wool	Beds of untreated glass wool (silicon dioxide)	ND	Uncoated or not specified	<5 nm-7µm	12h-16 days	Seawater	<i>Mytilus edulis</i>	Lysosomal damage, apoptosis of epithelial cells, oxidative stress	Koehler et al. 2008
Ag	0, 50 or 2000 µg.L ⁻¹	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	58.6 ± 18.6 nm	1-30 days	Sediments	Bacteria	Ag-NP do not result in an increase in antibiotic resistance	Mühling et al. 2009
Ag	250 ng.g ⁻¹ sediment	Synthesized in laboratory	Citrate	30 ± 5 nm	10 days	Sediments	<i>Nereis diversicolor</i>	Separate routes of cellular internalization for soluble and nanoparticulate Ag	Garcia-Alonso et al. 2011
Cu	30-240 µg.g ⁻¹	Synthesized in laboratory	Uncoated or not specified	6 ± 1 nm	8 weeks	Sediments	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	CuO NP had the greatest effects on growth, feeding rate, and reproduction	Pang et al. 2012
SiO ₂ , Sb ₂ O ₅ , Fe ₂ O ₃	5 -5000 µg.kg ⁻¹	Commercialized NP	Uncoated or not specified	SiO ₂ : 50-400, Sb ₂ O ₅ : >5000 nm, Fe ₂ O ₃ : 50-150 nm	10 days	Sediments	<i>Chironomus tentans</i>	Genotoxic stress percentage survival and growth length inhibition	Oberholster et al. 2011
TiO ₂ and Carbone nanotubes	1,5, 2, 3 g.kg ⁻¹ (TiO ₂) and 0.003, 0.03 g.kg ⁻¹ (carbone nanotube)	Sigma–Aldrich	Uncoated or not specified	1-2 nm × 0.5-2.0 µm	10 days	Sediments	<i>Arenicola marina</i>	Cellular damage and DNA damage in coelomocytes only for TiO ₂	Galloway et al. 2009

NP	Doses	Suppliers	Coating	Primary size	Time of exposure	Exposure environnements	Species	Main conclusions	References
ZnO	0.2-1mg.L ⁻¹	Nanosun, Microniser	Uncoated or not specified	35 ± 10 nm	28-100 days	Sediments	<i>Corophium volutator</i>	Growth and reproduction affected, same toxicity between soluble or nanoparticulate form	Fabrega et al. 2012
Cu	30-1030 mg.kg ⁻¹ dry soil	ND	Uncoated	66 nm	42 days	Soil	<i>Enchytraeus albidus</i>	NP specific effect, lower reproductive output and higher avoidance	Amorim et al. 2012
TiO ₂ , ZnO	0.1-5.0 g.kg ⁻¹	Aipurui Co., Ltd.	Uncoated or not specified	10-20 nm	7 days	Soil	<i>Eisenia fetida</i>	Harmful effects for level > 1 g.kg ⁻¹ , toxicity of ZnO NP was higher than TiO ₂	Hu et al. 2010
ZnO	100-6400 mg.kg ⁻¹ d.w	BASF (Z-COTE®)	Carbon	<200 nm	4 weeks	Soil	<i>Folsomia candida</i>	Zn released from NP determine the observed toxic effects	Kool et al. 2011
ZnO	250 and 750 mg.kg ⁻¹	Sigma-Aldrich	Uncoated	<100 nm	21 days	Soil and food	<i>Eisenia veneta</i>	Reproduction declined, higher toxicity of ionic form	Hopper et al. 2011
ZnO, Al ₂ O ₃ , TiO ₂	0-400mg.L ⁻¹	Hongchen Material Sci. and Technol. Co.	Uncoated or not specified	ZnO: 20 nm, Al ₂ O ₃ : 60 nm, TiO ₂ : 325 nm	24h	Ultrapure water	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Both NP and their bulk counterparts were toxic, inhibiting growth and especially the reproductive capability of the nematode	Wang et al. 2009

3.1. Bioaccumulation des nanoparticules dans les organismes

Un certain nombre de données concernant la bioaccumulation des NP sont disponibles dans la littérature scientifique puisqu'elle constitue une information de première importance, pour pouvoir comprendre les effets associés chez les organismes. Chez les invertébrés, Buffet et al. (2011) ont montré une accumulation similaire de Cu sous forme soluble et nanoparticulaire chez l'annélide *H. diversicolor* et le bivalve *Scrobicularia plana*. Cong et al. (2011) ont montré des résultats similaires chez le même annélide exposé à de l'Ag sous forme soluble et nanoparticulaire. Gomes et al (2011) ont contaminé des moules (*Mytilus galloprovincialis*) avec du cuivre sous forme soluble et sous forme de NP, montrant une accumulation plus importante de cuivre soluble par comparaison avec les CuO NP. Cependant après 15 jours d'exposition la concentration en CuO NP dans les moules est restée constante alors qu'une partie du Cu sous forme soluble est évacuée. Tedesco et al. (2010a) ont démontré que chez la moule *Mytilus edulis*, les Au NP sont accumulées et localisées majoritairement dans la glande digestive. Des résultats similaires ont été décrits chez le bivalve *C. fulminea* exposé à des Au NP et localisées principalement dans l'appareil digestif (Hull et al. 2011). Moore (2006) a démontré que des NP de polyester de sucrose étaient accumulées dans les cellules digestives de la moule *M. edulis*. Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), une accumulation identique de Cu soluble ou d'origine nanoparticulaire a été observée dans la branchie (Griffitt et al. 2007). Chez la même espèce, la concentration en Ag d'origine nanoparticulaire accumulée est plus importante que celle de l'Ag soluble. En mimant les conditions environnementales, une expérience réalisée en mésocosme visant à comprendre les transferts de Au NP dans un réseau trophique a montré que ce sont les invertébrés filtreurs suivis du biofilm qui accumulent majoritairement les NP (Ferry et al. 2009).

Le problème majeur concernant la bioaccumulation des NP est de savoir si elles sont adsorbées sur l'épiderme des organismes ou véritablement incluses dans les cellules et sous quelle forme elles pénètrent dans l'organisme (Fabrega et al. 2011). Les mesures classiques de métaux ne permettent pas de vérifier la forme des NP intégrées et ne peuvent pas donner une localisation précise des NP dans les organes. Pour obtenir plus d'informations concernant la bioaccumulation et la localisation des NP, il est nécessaire d'utiliser des techniques de microscopie. Heinlaan et al. (2011) ont mis en évidence une ingestion de CuO NP dispersées

dans la lumière du tube digestif entre les microvillosités chez *Daphnia magna*, cependant ces auteurs n'observent pas de NP internalisées dans l'épithélium. De même Galloway et al. (2010) ont localisé des agrégats de TiO₂ sur l'épiderme et dans la lumière du tube digestif de l'annélide *Arenicola marina* par Raman scattering microscopy. Garcia-Alonso et al. (2011) ont également décrit la présence d'Ag NP dans la lumière du tube digestif de *H. diversicolor* mais également des particules internalisées dans les cellules du tube digestif.

3.2. Toxicité des nanoparticules pour les micro-organismes

Les micro-organismes constituent un compartiment important dans l'environnement pour leur rôle dans la biodégradation des contaminants et parce qu'ils constituent un vecteur de transfert pour les organismes supérieurs. Kim et al. (2007) ont montré que les NP d'argent ont un pouvoir bactéricide dû à la génération d'anions super-oxyde à la surface des NP et/ou des ions qu'elles libèrent. Les NP s'adsorbent à la surface des cellules, et la génération de ROS peut endommager les membranes cellulaires perturbant également les échanges d'ions entre la cellule et son milieu. Les altérations membranaires pourraient faciliter l'entrée de NP à l'intérieur de la cellule. L'internalisation des NP peut conduire à l'apparition de malformations cellulaires (Choi et al. 2008). Bondarenko et al. (2012) ont montré que des CuO NP peuvent induire la génération de ROS, et des lésions sur l'ADN de la bactérie *Escherichia coli*. Ces auteurs suggèrent cependant que les effets proviennent en grande partie de la dissolution des CuO NP. Chung et al. (2011) ont démontré que des nanotubes de carbone pouvaient réduire l'activité et la biomasse de la communauté microbienne des sols. De même, Nogueira et al. (2012) ont pu observer une réduction de la diversité et des modifications de la structure des communautés bactériennes du sol exposées à des Au NP, TiO₂ NP et des polymères de carboxyméthyl-cellulose.

3.3. Toxicité des nanoparticules dans l'eau douce

La majorité des travaux concernant la toxicité des NP sur des organismes aquatiques d'eau douce portent sur les daphnies (*D. magna* et *D. pulex*) ou sur des poissons et en

particulier le poisson zèbre (*D. rerio*) mais aussi sur des algues *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella vulgaris*.

L'exposition de *D. magna* à des Ag NP a révélé une toxicité similaire à celle de l'Ag ionique et de la forme nanoparticulaire (Allen et al. 2010). Chez les Daphnies, la toxicité des CuO NP ne peut pas être totalement expliquée par la dissolution du Cu provenant des NP (Heinlaan et al. 2011). La dissolution des NP (Ag NP, CuO NP, Al NP, Ni NP, Co NP) peut avoir un rôle variable selon le métal étudié (faible pour les Ag NP et les Cu NP mais élevé pour le Ni NP) selon Griffitt et al. (2008). D'autre part, Heinlaan et al. (2008) ont démontré que la toxicité des ZnO NP et TiO₂ NP peut intervenir sans pénétration des NP à l'intérieur de la cellule mais en générant des ROS à l'extérieur de la cellule qui peuvent endommager leurs membranes. les TiO₂ NP et C60 peuvent générer du stress oxydant chez *D. pulex* (Klaper et al. 2009) et perturber le comportement de *D. magna*, ce qui peut avoir des conséquences sur leur alimentation, leur reproduction et donc l'avenir des populations (Lovern et al. 2007).

Chez le poisson, les NP d'Ag, CuO et TiO₂ ont des effets biologiques sur *D. rerio* qui ne sont pas expliqués uniquement par la libération d'ions métalliques solubles (Griffitt et al. 2009). Xiong et al. (2011) ont montré que l'exposition à des TiO₂ NP et ZnO NP génère du stress oxydant chez *D. rerio*. Sur la même espèce, les travaux de Wang et al. (2011) ont révélé que les TiO₂ NP provoquent une diminution de la croissance, de la reproduction et entraînent des mortalités. Une exposition à des ZnO NP peut entraîner un retardement du développement chez des embryons de *D. rerio* ainsi qu'une réduction de la taille des larves (Bai et al. 2010). Frederici et al. (2007) ont démontré que les TiO₂ NP pouvaient provoquer la génération de stress oxydant et une induction des défenses associées, un stress respiratoire et une érosion de l'épithélium intestinal chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Bilberg et al. (2010) ont observé une réduction de la tolérance à l'hypoxie résultant de l'effet des Ag NP qui peuvent altérer la morphologie externe des branchies chez la perche commune *Perca fluviatilis* exposés à des NP d'Ag NP. Frederici et al. (2007) et Chae et al. (2009) ont montré que les NP métalliques génèrent du stress oxydant chez *O. mykiss* et chez le médaka *Oryzias latipes* exposés à des TiO₂ NP et des AgNP respectivement. De même, les TiO₂ NP provoquent une peroxydation lipidique dans le foie des juvéniles de carpes *Cyprinus carpio* (Hao et al. 2009).

Les effets des NP sur des invertébrés ont aussi été investigués (revu dans Canesi et al. 2012). Le bivalve *C. fluminea* est capable d'accumuler des Au NP et contribue à leur transport dans le milieu (Hull et al. 2011). Les CdTe (quantum dot) sont susceptibles de générer du stress oxydant chez le bivalve *Elliptio complanata* (Gagné et al. 2008; Peyrot et al. 2009). Ambrosone et al. (2012) ont observé des altérations morphologiques ainsi qu'une induction de gènes impliqués dans l'apoptose (CSP) chez l'hydre (*Hydra vulgaris*) exposée à des CdTe NP.

La toxicité des NP métalliques a également été évaluée chez plusieurs espèces d'algues d'eau douce. Navarro et al. (2008) ont montré qu'une part de la toxicité des Ag NP est due à la libération d'ions chez *C. reinhardtii*. Des expériences d'exposition à des NP de ZnO, TiO₂, CuO ont révélé que leur toxicité est principalement générée par la libération d'ions chez *P. subcapitata* (Aruoja et al. 2009). Une diminution de la teneur en chlorophylle, de la viabilité des algues et un accroissement de la formation de ROS et de la peroxydation des lipides a été mise en évidence chez l'algue d'eau douce *Chlorella vulgaris* (Oukarroum et al. 2012).

Blaise et al. (2008) et Griffitt et al. (2008) ont démontré que la toxicité et l'accumulation des NP métalliques varient selon les espèces étudiées. Ces auteurs soulignent également que les NP constituent un risque potentiel pour les organismes aquatiques d'eau douce.

3.4. Toxicité des nanoparticules dans l'eau de mer

Les effets des NP sur les organismes aquatiques marins ont été étudiés principalement chez les invertébrés et notamment chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*. Des auteurs ont montré que les NP génèrent du stress oxydant chez *M. edulis* exposée à des Au NP (Tedesco et al. 2008; Tedesco et al. 2010; Tedesco et al. 2010), à des NP issues de fibre de verre (Koehler et al. 2008) mais aussi chez *M. galloprovincialis* exposée à des CuO NP (Gomes et al. 2011; Gomes et al. 2012), des Fe₂O₃ NP (Zero-valant) (Kadar et al. 2011), du noir de carbone (Canesi et al. 2008), des C₆₀, TiO₂ NP et SiO₂ NP (Canesi et al. 2010; Canesi et al. 2010). Les Fe₂O₃ NP sont également responsables de la peroxydation lipidique dans des cellules de branchies de la moule *M. edulis* (Kadar et al. 2010) et de la perturbation de son développement larvaire (Kadar et al. 2010). Le stress oxydant est également suspecté

d'être la cause de l'induction de biomarqueurs de défense chez *Hediste diversicolor* et *S. plana* exposées à des CuO NP (Buffet et al. 2011). Les C60 sont susceptibles de perturber la stabilité membranaire des lysosomes (LMS) chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Ringwood et al. 2009), et chez la moule *M. galloprovincialis* (Canesi et al. 2010). Une réduction de la teneur en chlorophylle, de la viabilité des algues et un accroissement de la formation de ROS et de la peroxydation des lipides a été mise en évidence chez l'algue marine *Dunaliella tertiolecta* (Oukarroum et al. 2012).

3.5. Toxicité des nanoparticules via l'alimentation

Les effets d'une exposition à des NP par la voie alimentaire sont relativement peu connus. Des expériences d'exposition à des TiO₂ NP chez l'invertébré terrestre *Poercellio scaber* ont révélé des effets sublétaux tels qu'une induction de la catalase (CAT) et l'augmentation de l'alimentation (Drobne et al. 2009) et une réduction non dépendante de la concentration d'exposition pour les activités CAT et de la glutathion S-transférase (GST) (Jemec et al. 2008). Chez la même espèce, l'alimentation n'a pas été affectée par les expositions à des ZnO NP (Pipan-Tkalec et al. 2010) par l'intermédiaire de feuilles contaminées. Au contraire, l'exposition du gastéropode *Lymnaea stagnalis* à des ZnO NP marqués par des isotopes du Zn ont permis de montrer des dommages dans les mécanismes de digestion (Croteau et al. 2011). De même, des truites (*O. mykiss*) exposées à des TiO₂ NP présentent des effets toxiques similaires à la forme soluble tels que des diminutions de croissance (Ramsden et al. 2009).

3.6. Toxicité des nanoparticules dans le sol et les sédiments

L'étude des effets des NP dans les matrices telles que les sols et les sédiments est complexe et notamment pour les métaux qui sont déjà présents naturellement en grande quantité dans ces compartiments. Cependant des travaux récents se sont focalisés sur ces lieux de stockage à long terme des NP dans l'environnement. Des effets toxiques ont été démontrés chez *Eisenia fetida* exposée à des TiO₂ NP et ZnO NP (Hu et al. 2010). Chez la même espèce exposée à des ZnO NP, Hopper et al. (2011) ont montré que la toxicité du Zn est plus forte

pour la forme ionique. Bigorgne et al. (2011) ont démontré que les produits issus de la dégradation des TiO_2 NP engendrent une augmentation des défenses antioxydantes (Métallothionéine : MT, superoxyde dismutase : SOD) et des processus apoptotiques issus des ROS. Les produits issus de la dégradation de ces NP peuvent provoquer des troubles des mécanismes de phagocytose chez *E. fetida*. Une augmentation de l'apoptose a été observée dans les cellules de l'épicuticule et de la paroi intestinale du ver *Lumbricus terrestris* exposé à des nanocomposés de TiO_2 (Lapied et al. 2011). Amorim and Scott-Fordsmand (2012) ont présenté des constatations similaires concernant la reproduction de *Enchytraeus albidus* exposés à des Cu NP et ajoutent que les effets sont spécifiques à la forme nanoparticulaire. Les résultats de Kool et al. (2011) concernant la toxicité des ZnO NP chez *Folsomia candida* mettent en avant le rôle important de la libération de Zn dans la toxicité des NP.

4. Les outils pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules pour la santé et l'environnement.

4.1. Echelle cellulaire

Puisque la génération de stress oxydant semble être un des effets les plus fréquemment observés, Xia et al (2009) proposent d'utiliser le paradigme du stress oxydant comme processus de screening de la toxicité des NP. Ainsi ils classent les effets selon trois échelles de génération de ROS :

- Niveau 1 : L'induction de réponses antioxydantes et de mécanismes de protection est suffisante pour protéger la cellule.
- Niveau 2 (pour un niveau intermédiaire de stress oxydant) : La réponse peut conduire à des processus d'inflammation générés par les ROS.
- Niveau 3 (pour un haut niveau de stress oxydant) : Les ROS perturbent la membrane mitochondriale, les cellules sont en nécrose et apoptose. Il faut ajouter que les ROS pénètrent dans les noyaux entraînant des effets génotoxiques importants.

En ayant ciblé les principaux effets provoqués par les NP sur les organismes, il est donc possible de travailler sur un set de biomarqueurs (Figure 13) capable de nous indiquer l'état dans lequel se trouve l'organisme étudié. Ces biomarqueurs permettent de vérifier la présence de stress oxydant par la mise en place de défenses (MT, CAT, GST, SOD) et éventuellement de tester si les défenses mises en place sont dépassées, entraînant l'apparition de dommages (Thiobarbituric reactive substances: TBARS, Caspase-3 like: CSP-3 like, Acétylcholine estérase: AChE et tests de génotoxicité). La défense ayant un coût énergétique non négligeable, la lactate deshydrogénase (LDH) apparaît comme un biomarqueur approprié pour vérifier l'état métabolique des organismes. Enfin, les tests de comportement nous donnent des informations sur l'état individuel des organismes et constituent une source d'information primordiale du point de vue de la réponse écologique des espèces contaminées par des nanomatériaux. Les altérations du comportement sont particulièrement importantes pour la survie des espèces dans leur écosystème. L'enfouissement est essentiel pour les organismes endobenthiques pour la fuite contre les prédateurs et la collecte de nourriture. L'alimentation qui contribue à l'accumulation d'énergie dans le milieu est aussi un comportement intéressant à évaluer. Ces paramètres individuels peuvent nous apporter les premières informations sur le risque pour les populations dans leur milieu.

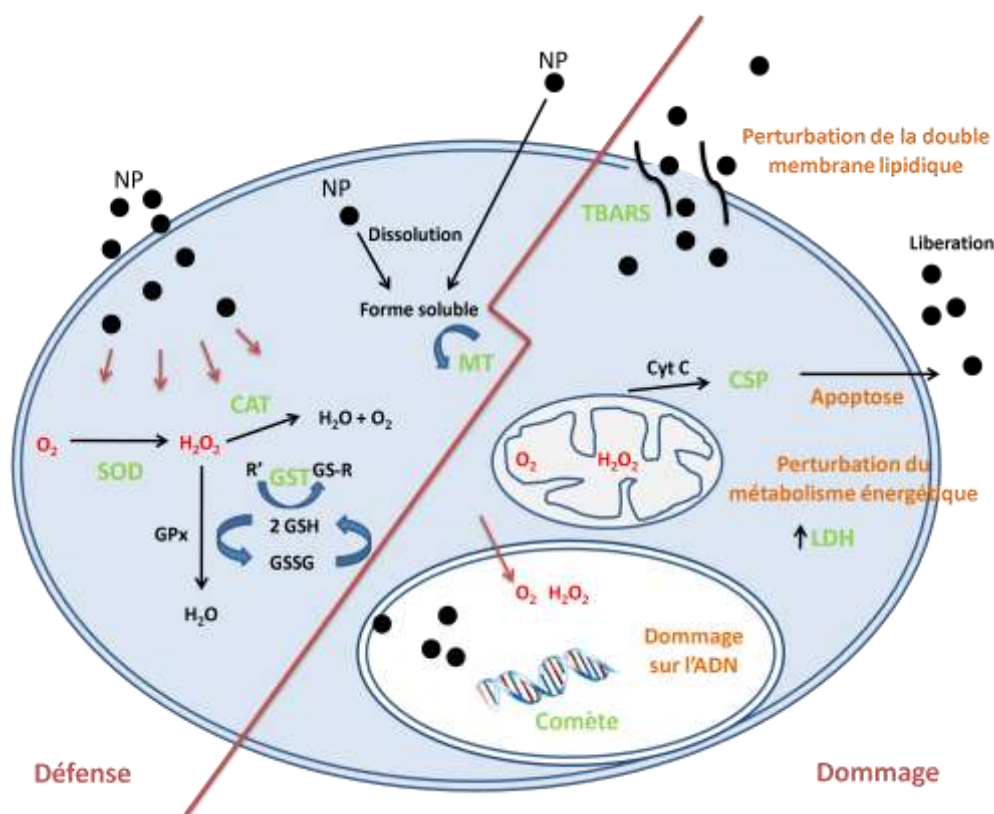


Figure 13 : Biomarqueurs de défense et de dommage impliqués dans la réponse des organismes face aux nanoparticules.

4.1.1. Métallothionéine

Les métallothionéines (MT) sont des protéines de faible masse moléculaire (6kDa pour les monomères et 12kDa pour les dimères). Elles possèdent une structure en 2 domaines repliés sur eux-mêmes leur conférant leur thermorésistance. Elles sont également caractérisées par une teneur élevée en cystéine (~30%) impliquant la présence de groupements thiol, ce qui leur confère un fort pouvoir complexant vis-à-vis de certains métaux (revue de Amiard et al. 2006), notamment les ions métalliques lourds bivalents. Ces protéines interviennent en premier lieu dans l'homéostasie des métaux essentiels Zn et Cu et ont un rôle indirect dans la détoxification (transport vers les sites de minéralisation) de certains métaux traces (Cd, Hg, Pb, Ag). Cette fonction a été décrite notamment chez les mollusques (Amiard et al. 1998), crustacés et annélides (Amiard et al. 2006). Des auteurs s'accordent aussi sur son rôle protecteur contre les radicaux libres (Viarengo et al. 1999; Buico et al. 2008; Moreau et al.

2008). La MT paraît constituer un biomarqueur d'intérêt pour les études sur les NP métalliques. Peyrot et al. (2009) montrent une induction de MT dans la glande digestive et la gonade et une réduction dans les branchies du bivalve *E. complanata* exposée à des quantum dot de CdTe et du Cd soluble. Selon ces auteurs la diminution observée dans les branchies pourrait résulter de l'oxydation de la protéine sous l'effet du stress oxydatif. Chen et al. (2011) ont montré une induction du gène codant pour la MT chez des larves de poisson zèbre (*D. rerio*) exposées à du Cu sous forme soluble et nanoparticulaire avec des valeurs significativement plus fortes pour les NP en relation avec leur bioaccumulation. Bigorne et al. (2011) ont également montré une induction du gène codant pour la MT chez *E. fetida* exposées à des résidus de TiO₂ NP. Une augmentation des concentrations en MT a également été observée chez le bivalve *S. plana* exposé à des CuO NP (Buffet et al. 2011) et des Au NP (Pan et al. 2012) ainsi que chez *M. galloprovincialis* exposée à des CuO NP (Gomes et al. 2011; Gomes et al. 2012). Une induction significative des gènes de MT a été décrite dans le foie de Medaka (*O. latipes*) exposés à des Ag NP (Chae et al. 2009).

4.1.2. Catalase

La catalase (CAT) est un catalyseur de la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Cette enzyme a un rôle dans la prévention de la peroxydation des molécules biologiques et elle est sensible à certains contaminants inducteurs du stress oxydant au niveau des membranes cellulaires comme les contaminants organiques mais aussi les métaux et NP métalliques. Ce biomarqueur s'est révélé particulièrement sensible dans de récents travaux d'écotoxicologie sur les NP. Buffet et al. (2011) ont observé une induction de CAT chez le bivalve *S. plana* et l'annélide *H. diversicolor* exposé à des CuO NP. La catalase a également été induite chez *S. plana* exposés à des Au NP (Pan et al. 2012). Ce biomarqueur est aussi décrit comme particulièrement sensible chez *M. galloprovincialis* exposée à des SiO₂ NP, TiO₂ NP, du noir de carbone et des C60 (Canesi et al. 2010). Kim et al. (2010) ont également observé une induction de CAT chez *D. magna* exposées à des TiO₂ NP. La production de ROS générés par des CuO NP a induit une augmentation de CAT jusqu'à

atteindre les limites de ses capacités antioxydantes conduisant ensuite à son inactivation (Gomes et al. 2011).

4.1.3. Glutathion S-transférase

Ces enzymes multifonctionnelles présentent de nombreuses isoformes. Elles sont impliquées dans la biotransformation des polluants conjuguant le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles pour faciliter leur élimination. Ces protéines agissent en phase II de biotransformation durant la réaction de conjugaison. A titre d'exemple, une induction de GST a été observée chez *S. plana* et *H. diversicolor* exposées à des CuO NP (Buffet et al. 2011) et *S. plana* exposées à des Au NP (Pan et al. 2012). Ce biomarqueur a été stimulé également chez *M. galloprovincialis* exposée à des SiO₂ NP (Canesi et al. 2010) et chez *D. magna* exposés à des TiO₂ NP (Kim et al. 2010). Chen et al. (2011) ont observé une diminution de l'expression du gène codant pour la GST chez des larves de poissons zèbre (*D. rerio*). Une induction significative des gènes codant pour la GST a été décrite dans le foie de Medaka (*O. latipes*) exposés des Ag NP (Chae et al. 2009).

4.1.4. Superoxyde dismutase

Cette enzyme catalyse la transformation de l'ion superoxyde en oxygène divalent et en peroxyde d'hydrogène (McCord et Fridovich 1969). Elle constitue donc une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Buffet et al. (2011) et Pan et al. (2012) ont montré une induction de SOD chez *S. plana* exposée à des CuO NP et des Au NP respectivement. Une augmentation de l'activité de la SOD a également été observée chez *M. galloprovincialis* exposée à des CuO NP (Gomes et al. 2011). Chen et al. (2011) ont observé une augmentation de l'expression du gène codant pour la SOD chez des larves de poisson zèbre (*D. rerio*). Bigorne et al. (2011) ont également montré une induction du gène codant pour la SOD chez *E. fetida* exposée à des résidus de TiO₂ NP.

4.1.5. Lactate déshydrogénase

C'est une protéine enzymatique présente dans le cytoplasme et utilisée comme marqueur de dommage tissulaire en condition anaérobie (Ellumalai et al. 2002). Wu and Lam (1997) ont montré la corrélation négative entre l'activité de la LDH et l'oxygène dissous dans différents sites chez la moule verte asiatique *Perna viridis*. Cette enzyme permet le maintien de la glycolyse en condition anoxique, en catalysant la conversion réversible du pyruvate et NADH en lactate et NAD. La quantification de son activité permet de connaître l'état métabolique de l'organisme. En effet, son induction peut être reliée à une détérioration de la voie métabolique aérobie par des composés exogènes (Frasco et Guilhermino 2002). La défense contre le stress causé par les contaminants est consommatrice d'énergie et l'activité LDH est particulièrement importante quand une quantité considérable d'énergie est rapidement nécessaire (Diamantino et al. 2001; Moreira et al. 2005). A titre d'exemple, l'activité de la LDH est un biomarqueur sensible pour étudier une exposition aux hydrocarbures chez la moule (Long et al. 2003).

4.1.6. Acetylcholinestérase

Cette protéine a un rôle dans la transmission de l'influx nerveux car elle hydrolyse le neuromédiateur acétylcholine. Son inhibition constitue un biomarqueur de neurotoxicité. La diminution de son activité est souvent associée à la présence de contaminants organiques ou métalliques dans le milieu. Wang et al. (2009) ont montré que différents types de NP (Cu NP, et des nanotubes de carbone mono et multicouches) pouvaient présenter des propriétés neurotoxiques et proposent d'utiliser l'AChE comme biomarqueur pour les NP. Des effets neurotoxiques attestés par l'inhibition de l'AChE ont été démontrés uniquement après 15 jours d'exposition chez *M. galloprovincialis* exposées à des CuO NP (Gomes et al. 2011). Zhao et al. (2011) ont montré une inhibition de l'activité de la cholinestérase lors de l'exposition de juvéniles de carpes *Cyprinus carpio* à des CuO NP, et suggèrent également leur pouvoir neurotoxique potentiel.

4.1.7. Thiobarbituric réactive substances

Lorsque les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques évoqués ci-dessus ne parviennent pas à neutraliser l'ensemble des espèces réactives de l'oxygène, ces dernières provoquent une dégradation oxydative des lipides membranaires. Les produits issus de cette dégradation peuvent réagir avec l'acide thiobarbiturique et sont qualifiés de TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) (Amiard et Amiard-Triquet 2008). Le dosage des niveaux de TBARS dont le plus important est le malondialdéhyde (MDA) représente donc une excellente approche de l'exploration du stress oxydant chez les vertébrés et invertébrés marins (Durou 2006; Bergayou et al. 2009). Les niveaux de TBARS ont été diminués dans des truites arc-en-ciel (*O. Mykiss*) exposées à des TiO₂ NP, ceci résultant probablement de l'action des protections antioxydantes mises en place chez les animaux pour contrer les effets des ROS (Ramsden et al. 2009). Une augmentation de la production de TBARS a été observée dans les branchies, l'intestin et le cerveau du bivalve *E. complanata* exposé à des CdTe NP (Gagné et al. 2008).

4.1.8. Caspase-3

La cytotoxicité est souvent liée à l'activation des mécanismes de l'apoptose au niveau des mitochondries et déclenchée par la formation de ROS (Cho et al. 2007). La détection d'une induction de caspase-3 dans les cellules et les tissus est une étape clé dans le processus d'exécution de la voie apoptotique (Abu-Qare et Abou-Donia 2001; Risso-de Faverney C et al. 2001; Ahamed et al. 2010). Dans des expériences *in vitro*, des auteurs ont observé une activation de CSP résultant de la production de ROS dans des cellules humaines exposées à de TiO₂ NP (Park et al. 2008), des NP de polystyrène (Fröhlich et al. 2009), CuO NP (Ahamed et al. 2010), NiFe₂O₄ NP (Ahamed et al. 2011) et SiO₂ (Ahmad et al. 2012). Ce marqueur est aussi utilisé dans des expériences sur les organismes marins. A titre d'exemple, Ambrosone et al. (2012) ont observé une induction de caspase-3 chez l'hydre *Hydra vulgaris* exposée à des CdTe NP.

4.1.9. Test des comètes

L'utilisation du test des comètes a été récemment revue par Karlsson (2010). Cet auteur souligne la sensibilité de ce test dans les expériences sur les NP du fait de leur grande réactivité. Ce test est très répandu dans les expériences de toxicité *in vitro*, et de plus en plus utilisé dans des expériences *in vivo*. A titre d'exemple, Karlsson (2010) a recensé 46 études *in vitro* utilisant un test comète. Dans la majorité des cas, les NP de tous types provoquent des effets génotoxiques. Des dégâts sur l'ADN ont pu être observés dans des cellules exposées à des TiO₂ NP (12 articles), des NP de carbone (11 articles), ZnO NP (5 articles), Fe₂O₃ NP (3 articles), Ag NP (2 articles), SiO₂ NP (2 articles), CuO NP (2 articles) et dans un cas de cellules exposées à des Au NP. Deux études d'écotoxicologie ont montré des dommages sur l'ADN *in vivo*. Lee et al. (2009) ont observé une augmentation des dégâts sur l'ADN chez *D. magna* et *C. riparius* exposés à des CeO₂, SiO₂ et TiO₂. Hu et al. (2010) ont observé des lésions de l'ADN dans les cœlomocytes du ver de terre *E. fetida* exposé à des TiO₂ et ZnO NP. De récents travaux ont permis de mettre en évidence des lésions de l'ADN chez les invertébrés marins. Cong et al. (2011) ont observé des dégâts de l'ADN dans les cœlomocytes de *H. diversicolor* exposées à des Ag NP et de l'Ag soluble. Les dégâts observés augmentaient avec la concentration utilisée pour l'exposition (1-50 µg.g⁻¹).

4.2. De l'échelle individuelle vers la population

Les tests comportementaux sont des outils très sensibles pour les études écotoxicologiques (Amiard-Triquet 2009). Les mitochondries représentent la principale source de production de ROS dans les cellules (Gagné et al. 2010) et représentent l'organite le plus important dans les cellules pour la production d'énergie. De nombreux travaux ont démontré que les polluants pouvaient être à l'origine de perturbations du métabolisme énergétique via le coût de tolérance mis en place pour les défenses des organismes (Calow 1991; Bonnard et al. 2009; Amiard-Triquet et al. 2011). Les perturbations du métabolisme énergétique peuvent également être associées à une modification de l'allocation de l'énergie vers la croissance individuelle et la reproduction. Ces perturbations pourraient être à l'origine des dysfonctionnements à l'échelle individuelle et des effets sur la conservation des organismes. La locomotion qui permet aux

espèces d'être moins vulnérables face aux prédateurs et l'alimentation qui est une étape importante pour l'acquisition d'énergie sont deux mécanismes clés dans la survie des espèces. Certains auteurs ont observé une altération du comportement pour des organismes exposés à des NP. Lovern et al. (2007) ont pu observer plusieurs paramètres du comportement chez les daphnies (*D. magna*) exposées à des nanotubes de carbone à l'aide d'une caméra à haute vitesse. Les NP ont significativement réduit la fréquence cardiaque des animaux et perturbé les mouvements des appendices de locomotion et d'alimentation. Ces résultats peuvent présager un risque accru de prédation et le déclin de la reproduction, indiquant également que ces NP peuvent avoir des impacts sur la population et la dynamique du réseau alimentaire dans les systèmes aquatiques. Pang et al. (2012) ont mesuré une réduction de l'alimentation du gastéropode marin *Potamopyrgus antipodarum* exposé à des CuO NP. Les CuO NP ont été également à l'origine d'altération de l'alimentation chez le bivalve *S. plana* (Buffet et al. 2011). Ces auteurs ont également observé une réduction de la vitesse d'enfouissement chez le bivalve *S. plana* et l'annélide *H. diversicolor*. Une réduction de la vitesse d'enfouissement a également été observée chez *S. plana* exposées à des Au NP (Pan et al. 2012). Des troubles de la locomotion ont également été décrits chez le vers *C. elegans* exposé à des Al₂O₃ NP (Li et al. 2012). Musee et al. (2010) ont observé une altération de l'évitement de sédiments contaminés chez le gastéropode d'eau douce *Physa acuta* exposé à des TiO₂ NP. Des travaux ont mis en avant les effets des Ag NP sur les capacités olfactives de la carpe (*Carassius carassius*). Les conséquences de cette altération peuvent modifier les capacités d'évitement face aux prédateurs, de recherche de nourriture et la reproduction (Bilberg et al. 2010).

5. Adapter les techniques et les protocoles aux études écotoxicologiques sur les nanoparticules

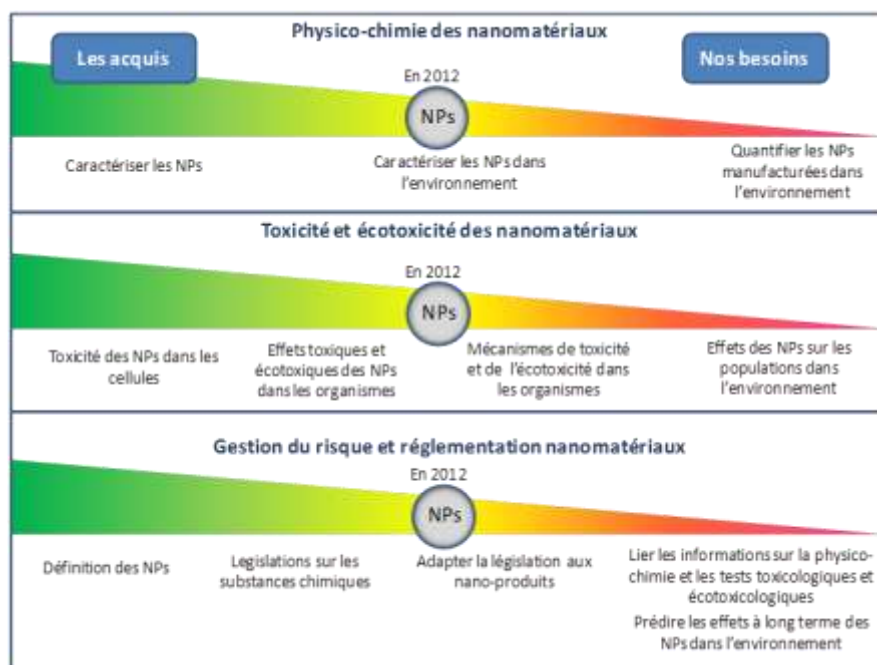
Depuis plus de 10 ans les scientifiques travaillant sur les nanomatériaux essaient de développer des techniques d'étude adaptées afin de mieux appréhender le comportement et les effets des nanomatériaux dans l'environnement. Une multitude d'approches et de techniques rendent parfois les comparaisons difficiles. Afin de progresser plus vite, il est indispensable de

développer un certain nombre de standards dans le domaine des nanomatériaux. Plusieurs réseaux scientifiques incluant l'OCDE, l'ISO (International Organisation for Standardization) the Society of Environmental Toxicology and Chemistry Nano Advisory Group et le réseau européen Nano Impact Net (<http://www.nanoimpact.net.eu/>) travaillent actuellement sur ces problématiques. La problématique des études de nanotoxicologie ou nanoécotoxicologie implique d'adapter les techniques utilisées dans les tests de toxicologie et d'écotoxicologie sur des substances classiques. En effet, les NP ont des propriétés spécifiques qui nécessitent certaines précautions. Handy et al. (2012) font l'inventaire des conditions à respecter pour ces tests. Ces auteurs proposent:

- Pour les études sur les NP métalliques l'utilisation de contrôle sous forme de sels métalliques permet de comparer les expériences récentes avec la littérature sur les métaux.
- Les substances dispersantes (coating) doivent être évitées si possible. Dans le cas contraire elles doivent être testées seules et prises en compte dans l'interprétation des résultats.
- La contamination des milieux d'exposition peut être réalisée dans une mixture de sédiment sec/ NP ou par l'intermédiaire d'une suspension dans un liquide. Dans ce dernier cas la suspension doit être réalisée juste avant la contamination afin d'éviter la dégradation des NP. Les NP sédimentent généralement rapidement et il est donc intéressant d'utiliser un système de mélange ou un régime semi-statique avec renouvellement de la contamination afin de maintenir le niveau de contamination et surtout la dispersion des NP dans le milieu.
- Une caractérisation des NP dans les milieux d'exposition est indispensable.
- Des recherches en conditions proches de l'environnement, avec des espèces écologiquement pertinentes (différentes de celles des tests OECD) sont nécessaires.
- Des tests similaires aux expériences de bioaccumulation classiques sont nécessaires ainsi que la vérification de l'exposition et de la prise de particules pendant l'expérience.

Synthèse du chapitre 1

- Les NP ont des propriétés physico-chimiques les rendant extrêmement intéressantes pour l'industrie mais potentiellement dangereuses pour la santé et l'environnement.
- La production et le commerce de nanomatériaux est en forte croissance. Les enjeux financiers sont importants et le marché des nanomatériaux pourrait atteindre 2,5 trillions de dollars en 2015.
- La réglementation concernant les nanomatériaux est à préciser. Elle nécessite des études toxicologiques et écotoxicologiques approfondies.
- Le développement d'outils de caractérisation et de quantification de nanomatériaux dans l'environnement est nécessaire afin de mieux appréhender leurs comportements.
- L'effet le plus souvent rencontré dans les expériences *in vitro* et *in vivo* est la génération de stress oxydant et des effets en cascade qui peuvent en découler tels que la génotoxicité, l'apoptose, les perturbations du comportement et de la reproduction.
- La majorité des travaux actuels concernent les effets des NP dans l'eau douce. Les données concernant la toxicité des NP pour les organismes dans l'eau de mer par la voie alimentaire mais surtout via le sédiment sont encore parcellaires et nécessitent d'autres investigations.



Chapitre 2 : Démarche scientifique

1. Les espèces sentinelles pour l'étude des effets écotoxicologiques des nanoparticules

1.1. Les espèces sentinelles

Le suivi de la qualité des milieux est une priorité puisque les activités anthropiques génèrent une multitude de substances dont certaines sont potentiellement toxiques. Le suivi de ces substances et l'évaluation de leur toxicité et écotoxicité est un défi de taille. Les mixtures complexes et les concentrations parfois très faibles de polluants sont extrêmement difficiles à étudier par des approches chimiques traditionnelles. En effet, l'étude de tous les polluants présents dans l'eau est très coûteuse et néglige les effets antagonistes ou de synergie des polluants. Les approches écotoxicologiques reposant sur l'utilisation de biomarqueurs dans des organismes modèles proposent des alternatives intéressantes pour le suivi de la qualité des milieux. Ces concepts reposent en premier lieu sur le choix d'espèces adaptées qui nous indiquent l'état écologique d'un site et les effets éventuels lors de contaminations chroniques ou accidentelles. Ainsi, les espèces sentinelles constituent des indicateurs précoces et sensibles des perturbations de l'environnement reflétant la dégradation des conditions initiales du milieu naturel. Elles permettent de caractériser l'état d'un écosystème soumis à un stress environnemental et d'évaluer les perturbations pouvant survenir à l'intérieur de cet écosystème. Dans le cas idéal, une espèce sentinelle (Amiard et Amiard-Triquet 2008) doit être sédentaire, facile à collecter, suffisamment robuste pour résister aux pollutions, vivre assez longtemps pour accumuler et conserver les polluants afin de permettre aux chercheurs de réaliser un suivi adéquat sur le long terme et posséder une large répartition géographique pour pouvoir comparer l'état écologique de différents sites.

Les scientifiques ont montré l'intérêt de la macrofaune benthique dans des programmes de biosurveillance du milieu aquatique. Les bivalves (moules et huîtres) ont été utilisés pendant de nombreuses années en France dans le cadre du Réseau National de la Contamination Chimique (ROCCH) anciennement appelé Réseau National d'Observation (RNO) d'après le modèle Mussel Watch utilisé pour la biosurveillance des milieux aquatiques dans le monde (Goldberg 1986). Les annélides polychètes peuvent constituer jusqu'à 30% des espèces de la macrofaune benthique et jusqu'à 80% de l'abondance totale des espèces sur un site. Les

polychètes présentent des valeurs de richesse, de diversités spécifiques, de biomasse et de densité importantes (Guerra-García et al. 2006; Licciano et al. 2007).

Certaines caractéristiques de ces deux taxons (bivalves et polychètes) justifient leur utilisation en tant que sentinelles de l'environnement :

- D'un point de vue technique, leur récolte sur le terrain est généralement aisée du fait des densités importantes que l'on trouve dans l'environnement. Leur collecte ne met pas en péril le devenir de l'espèce sur le site d'étude. Certaines espèces sont faciles à identifier et à maintenir en élevage au laboratoire.
- Ces espèces présentent des tailles suffisantes fournissant assez de matériel biologique (tissus, fluides etc.) pour la réalisation de multiples analyses.
- Ce sont des organismes sédentaires, ubiquistes et abondants dans les écosystèmes aquatiques. Du fait de leur faible mobilité, ils témoignent donc directement de l'état du site sur lequel ils sont établis.
- Leur activité de bioturbation est un processus important dans le cycle géochimique des nutriments et des contaminants.
- Elles sont généralement tolérantes aux changements de conditions environnementales (salinité, température, oxygène dissous, eutrophisation etc.). La plupart des bivalves et des annélides ont une durée de vie suffisamment longue pour étudier l'effet des polluants sur une échelle de temps allant des effets précoces jusqu'aux effets à moyen et long termes.
- Certaines espèces d'invertébrés présentent des aires de répartition géographique très étendues permettant la comparaison entre différents sites en Europe.
- La macrofaune benthique constitue une ressource importante pour les consommateurs secondaires contribuant au transfert des contaminants vers les niveaux trophiques supérieurs tels que les oiseaux limicoles, les poissons mais aussi l'homme.

1.2. Des espèces cibles des nanoparticules

Le risque potentiel des nanoparticules pour le milieu aquatique dans la colonne d'eau et les sédiments a été souligné à de nombreuses reprises dans la littérature scientifique (Moore 2006; Wiesner et al. 2006; Klaine et al. 2008; Gao et al. 2009; Stone et al. 2010). Parmi les organismes susceptibles d'être en contact avec les NP, les mollusques bivalves et les annélides polychètes sont particulièrement concernés. Les avantages de l'utilisation des bivalves pour les études de la toxicité des NP ont été récemment revus par Canesi et al. (2012). Ces organismes filtrent de grandes quantités de particules dans la colonne d'eau avec la nourriture mais aussi dans les sédiments. Les annélides ingèrent d'importants volumes de sédiments pour extraire la matière détritique et les micro-organismes (Galloway et al. 2010). Ces deux embranchements peuvent accumuler potentiellement les NP présentes dans le milieu. Le mollusque bivalve *Scrobicularia plana* et l'annélide polychète *Hediste (Nereis) diversicolor* semblent donc constituer des espèces sentinelles particulièrement intéressantes pour les études sur l'écotoxicité des nanomatériaux.

2. *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778).

Tableau 6 : Classification de *Scrobicularia plana*.

Règne: <i>Animalia</i>	
Embranchement: <i>Mollusca</i>	
Classe: <i>Bivalvia</i>	
Sous-classe: <i>Heterodonta</i>	
Ordre: <i>Veneroida</i>	
Superfamille: <i>Tellinoidea</i>	
Famille: <i>Semelidae</i>	
Genre: <i>Scrobicularia</i>	

2.1. Répartition géographique

Scrobicularia plana est un bivalve (Tableau 6) vivant principalement dans les eaux peu profondes de l'étage médiolittoral dans les sédiments meubles argileux, vaseux ou sablo-vaseux et riches en matières organiques détritiques (Casagrande et Boudouresque 2005). Cette espèce peuple la façade Atlantique Nord-Est, depuis les côtes de Norvège, de la mer Baltique jusqu'à celles du Sénégal (Fischer et al. 1987), et dans la mer Méditerranée (Trebble 1976). Sa distribution verticale se situe dans les 20 premiers centimètres de sédiment et varie selon la taille des spécimens. La scrobiculaire est une espèce euryhaline tolérante aux variations de salinité de 11 à 34,5 PSU (Freeman et Rigler 1957; Green 1957) et eurytherme (tolérante aux variations de température) ce qui lui permet de s'implanter dans les zones estuariennes et côtières. Les densités de population varient de dizaines d'individus, à plusieurs milliers d'individus au mètre carré (Sola 1997). Elle fait partie des espèces ubiquistes sur les zones en aval de l'estuaire de la Loire (GIP Loire estuaire 2003). Sa durée de vie est variable autour d'une moyenne d'âge de 5 ans (Sola 1997; Verdelhos et al. 2005).

2.2. Régime alimentaire

S. plana. est une espèce au régime alimentaire mixte. Elle peut en effet alterner entre un régime suspensivore et dépositivore de surface selon les conditions du milieu. A marée haute, elle filtre principalement les particules présentes en suspension dans la colonne d'eau (Figure 14 A) et à marée basse, elle consomme le biofilm (la matière organique particulaire, les bactéries, les diatomées benthiques et le microphytobenthos marin) déposés à la surface du sédiment (Figure 14 B) selon Hughes (1969).

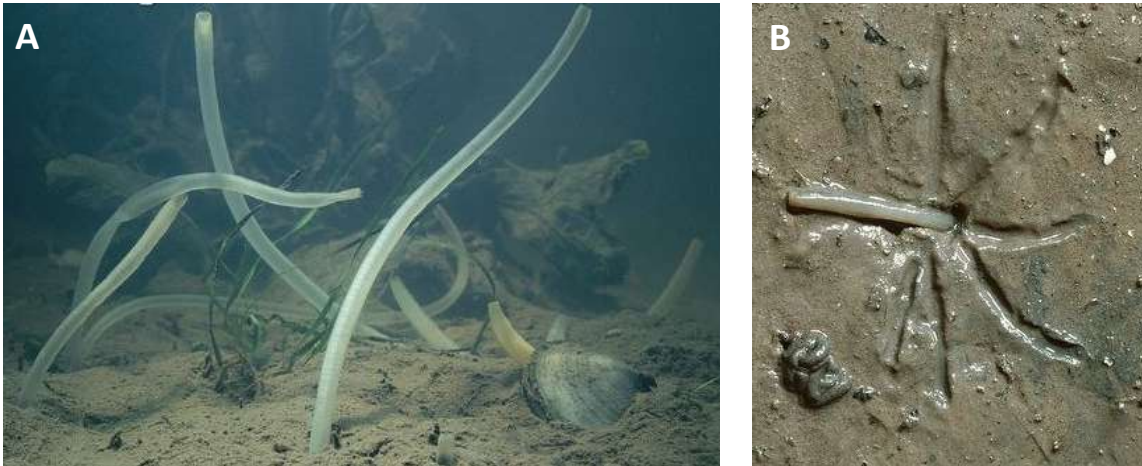


Figure 14 : Régime alimentaire mixte de *S. plana* suspensivore à marée haute (A) et dépositivore à marée basse (B) (photographie : Rodger Jackman).

2.3. Biologie de la reproduction

Scrobicularia plana est une espèce gonochorique (à sexes séparés) avec une fécondation externe après émission des gamètes dans l'eau. Son cycle de gamétogenèse varie selon la latitude (Hughes 1971; Santos et al. 2011). Le déclenchement de la maturation des gamètes, ainsi que celui de la ponte sont liés aux facteurs environnementaux tels que la température, l'ensoleillement et la disponibilité alimentaire (Worall et Widdows 1983; Raleigh et Keegan 2006; Santos et al. 2011). Dans les pays nordiques (Angleterre, Ecosse, Norvège), *S. plana* présente un cycle de reproduction court (3 à 6 mois) avec généralement une seule période de ponte au milieu de l'été (Hughes 1971; Worall et Widdows 1983) ou plus rarement deux périodes de ponte (Frenkiel et Mouëza 1979). En France (Pays de Loire), la période de ponte peut avoir lieu de la fin du printemps jusqu'au milieu de l'été (Mouneyrac et al. 2008). Dans les pays du sud de l'Europe (Portugal, Espagne, Sud de la France), le cycle de gamétogénèse est plus long (7 à 11 mois) avec deux périodes de ponte distinctes (Sola 1997; Santos et al. 2011) le plus souvent en hiver et en été. Les pontes peuvent cependant avoir lieu tout au long de la période de maturité sexuelle (Guerreiro 1998), comme dans l'estuaire du Guadalquivir, en Espagne, où elle commence en février et se termine en octobre (Rúa et al. 2003). Des cas d'hermaphrodisme (Raleigh et Keegan 2006) ou d'intersexe (présence de gamètes mâles et femelles) ont été décrits chez cette espèce en Angleterre et au Portugal (Chesman et Langston 2006; Langston et al. 2007; Gomes et al. 2009; Fossi Tankoua et al. 2012).

L'éclosion a lieu de 72 à 96 h après la fécondation. La formation du velum, un organe permettant de nager et de se nourrir permet une phase de vie planctonique des larves véligères pendant environ 3 semaines. Elles alternent ensuite entre phase nageuse et mouvements sur le fond lors de la formation du pied (larves pédivéligères). Lorsque le substrat est favorable, elles se sédentarisent et continuent leur développement (Frenkiel et Mouëza 1979; Santos et al. 2011). Les scrobiculaires atteignent leur maturité sexuelle à partir de 2 à 3 ans selon les conditions du milieu avec une longueur de coquille d'au moins 20 mm (Sola 1997; Raleigh et Keegan 2006).

3. *Hediste diversicolor* (O. F. Muller, 1776)

Tableau 7 : Classification de *Hediste diversicolor*.

Règne: <i>Animalia</i>	
Embranchement: <i>Annelida</i>	
Classe: <i>Polychaeta</i>	
Sous-classe: <i>Palpata</i>	
Ordre: <i>Aciculata</i>	
Superfamille: <i>Phyllodicta</i>	
Famille: <i>Nereididae</i>	
Genre: <i>Hediste</i>	

3.1. Répartition géographique

H. diversicolor est un annélide polychète (Tableau 7) vivant dans les sédiments sablo-vaseux riches en matières organiques dans les zones intertidales estuariennes, dans les eaux saumâtres et côtières. Cet annélide eurytherme et euryhalin peut également résister à des conditions d'hypoxie sévères et persister dans les milieux très eutrophisés. *H. diversicolor* est présente sur les côtes Nord-Européennes jusqu'à la Mer Baltique, sur la partie Atlantique de la côte Nord-Américaine ainsi qu'en Mer Noire et en Mer Caspienne où elle a été introduite (Smith, 1977 in Scaps 2002). Sa répartition et sa densité varient de quelques individus à plusieurs milliers dans les eaux peu profondes et bien oxygénées (Scaps 2002; Obolewski et al.

2009). Cette espèce vit dans des terriers pouvant mesurer plusieurs dizaines de centimètres de profondeur (Durou 2006). L'irrigation du terrier permet son oxygénation, ce qui a pour conséquence l'augmentation des échanges de solutés, incluant à la fois les nutriments et les contaminants, à l'interface eau-sédiment et la stimulation de processus de minéralisation et de dégradation de la matière organique par les bactéries aérobies (Gilbert et al. 1997; Hansen et Kristensen 1998; Banta et al. 1999; Scaps 2002; Cardoso et al. 2009).

3.2. Régime alimentaire

H. diversicolor est principalement omnivore (Fauchald et Jumars 1979) et présente différents modes d'alimentation qui varient selon les cycles de marée. A marée basse, son régime alimentaire est principalement dépositivore avec ingestion de nourriture captée à la surface du sédiment (Esselink et Zwarts 1989; Barnes et Gibson 1990). A marée haute, *H. diversicolor* peut recourir à un régime alimentaire proche de celui des filtreurs en secrétant un épais filet de mucus dans son terrier ou à l'extérieur du terrier. Elle effectue ensuite des mouvements ondulatoires qui génèrent un courant d'irrigation (Figure 15), entraînant les particules vers le mucus auquel les particules peuvent adhérer (Barnes et Gibson 1990; Riisgard 1991).

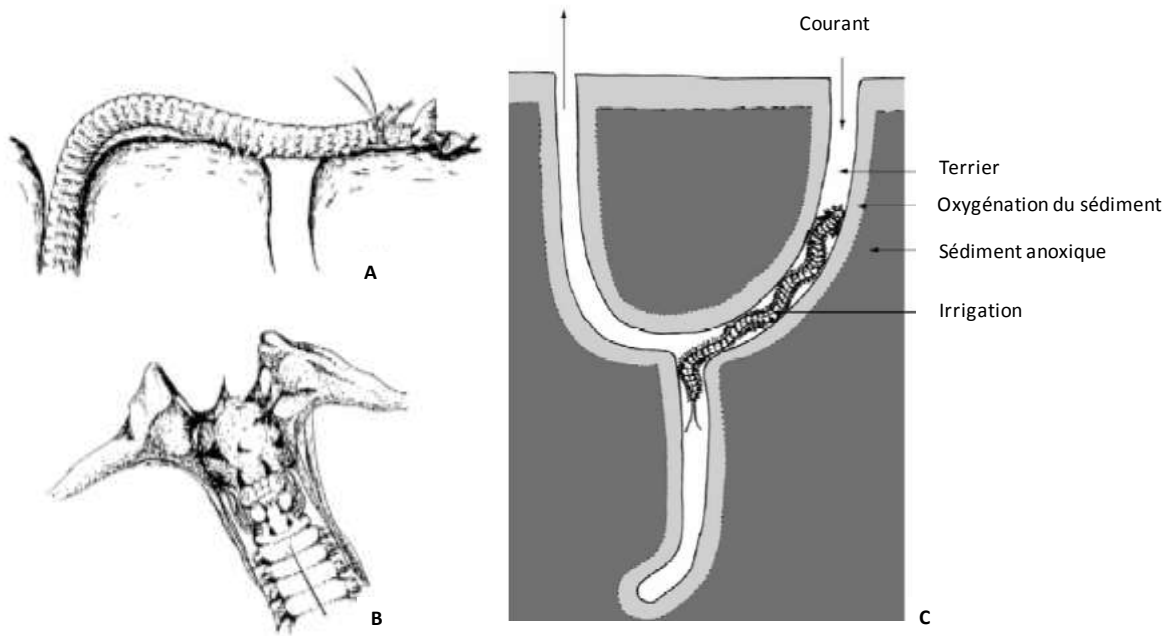


Figure 15 : Régime alimentaire de *H. diversicolor* captation en surface (A), captation en surface par l'intermédiaire de filet de mucus (B), captation de la nourriture dans le terrier (C) (Illustrations: Scaps 2002).

3.3. Biologie de la reproduction

H. diversicolor est gonochorique, le sex-ratio, largement en faveur des femelles et varie de 70 à 90% (Dales 1950; Marty 1997). L'énergie allouée à l'effort de reproduction est extrêmement important chez cette espèce (70%) (Adiyodi et Adiyodi 1983; Grémare et Olive 1986). Une fois la maturité sexuelle atteinte (entre 1 et 3 ans), chaque individu se reproduit une seule fois et meurt (Grémare et Olive 1986). Guidé par des phéromones émis par la femelle, le mâle libère ses produits sexuels par déchirure des téguments à l'entrée du terrier et meurt peu de temps après (Marty 1997). Chez la femelle, la mort peut survenir plusieurs semaines après la ponte, le temps pour elle d'incuber ses œufs dans la galerie et de les ventiler pour assurer leur bon développement (Marty 1997). La reproduction est fortement influencée par les variations saisonnières (température, ensoleillement) et la quantité de nourriture disponible (Dales 1950; Marty 1997; Scaps 2002). La période de reproduction varie de 1 mois à toute l'année selon la localisation, avec une ou plusieurs périodes de ponte (Dales 1950; Olive et Garwood 1981; Marty 1997; Durou 2006; Amiard-Triquet et Rainbow 2009).

Contrairement à la plupart des Néréides, *H. diversicolor* se reproduit à l'état atoke, c'est-à-dire ne subissant pas de changements morphologiques durant cette période (Dales 1950; Marty 1997). Les animaux en période de reproduction peuvent cependant prendre des couleurs qui passent de l'orangé au vert. Chez les adultes matures, ces changements de coloration sont dus à la présence de biliverdine (issue de la dégradation de l'hémoglobine dans le sang) dans la paroi digestive, l'épiderme et les cellules cœlomiques. Les mâles peuvent prendre une couleur vert bouteille issue de la formation de sperme dans le cœlome tandis que chez les femelles la teinte se rapproche du vert-olive (Dales 1950; Dales et Kennedy 1954). Chez les femelles matures, les ovocytes contenus dans la cavité cœlomique mesurent en moyenne 200µm (Dales 1950).

Les larves éclosent au stade trochophore et continuent leur croissance dans le terrier maternel le quittant après la formation de quatre sétigères, 11 à 13 jours après la fécondation. Les larves libres se déplacent par nage-reptation et sont capables de s'enfouir dès le stade de six sétigères, avec l'acquisition des cirres tentaculaires postérieurs. Elles peuvent alors construire des galeries semblables à celles des adultes dont la taille peut dépasser 10 cm, se sédentariser et adopter le mode de nutrition des adultes (Marty 1997).

4. Choix du site de prélèvement



Figure 16 : Localisation du site de collecte, la Baie de Bourgneuf sur la façade atlantique.

La baie de Bourgneuf est cernée par la pointe de St Gildas au nord et l'île de Noirmoutier au sud (Figure 16). Elle se situe au sud de l'estuaire de la Loire, en limite côtière du Marais Breton qui est intégré dans le réseau Natura 2000. Cette baie ouverte vers l'Atlantique Nord présente un climat d'influence océanique. La turbidité y est élevée. La baie de Bourgneuf est peu industrialisée, les activités humaines qui y sont pratiquées sont principalement la pêche, l'agriculture extensive, la pisciculture, la conchyliculture, la saliculture et le tourisme. La baie constitue un site de repos riche en nourriture pour de nombreux oiseaux (Figure 17).



Figure 17 : Photographie du site de collecte (photographie : P-E. BUFFET, Janvier 2010).

Les eaux de la baie de Bourgneuf sont de qualité très acceptable selon le Schéma d'Aménagement et de Gestion de l'Eau (SAGE). Les données concernant la pollution du littoral acquises dans le cadre du Réseau National de la Contamination Chimique (ROCCH) montrent des niveaux de pollution relativement faibles. Les niveaux de pollution de l'environnement marin de l'Atlantique du Nord-Est sont surveillés par de nombreux pays européens afin d'assurer un maintien de la qualité du milieu. La convention OSPAR indique à cet effet des seuils conseillés pour les substances potentiellement dangereuses incluant les métaux. Les mesures de métaux dans les sédiments de notre site d'étude ont été réalisées dans des études précédentes par notre équipe et présentent des valeurs proches des seuils indiqués dans la stratégie OSPAR (Tableau 8).

Tableau 8 : Concentration en métaux (Cd, Hg, Ni, Pb, V, Zn, Cu mesurée $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poid sec) dans les sédiments de la Baie de Bourgneuf (Amiard et al. 2007) et valeurs préconisées par la convention OSPAR.

	Cd	Hg	Ni	Pb	V	Zn	Cu
Concentrations en métaux dans les sédiments de la baie de Bourgneuf ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,16		< 25		< 60	134	11,8
Concentration en métaux dans les sédiments préconisées par OSPAR ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,20	0.05	45	25	84	90	20

Compte tenu de ces éléments et du fait qu'à l'heure actuelle il est impossible de disposer d'un site totalement indemne de pollution, notre choix s'est porté sur le site de la baie de Bourgneuf qui constitue un site aussi propre que possible.

5. Réflexion sur le choix des nanoparticules étudiées

Le premier objectif de notre équipe de recherche a été de choisir les NP métalliques les plus pertinentes concernant d'éventuels risques environnementaux. Nos travaux se sont focalisés sur l'étude de NP manufacturées dans des laboratoires partenaires (IML, NHM, JRC) du projet de recherche NanoReTox (Cf introduction) afin de connaître les techniques de production et les caractéristiques des NP utilisées. Ces informations sont importantes puisque de nombreux nano-produits sont mis sur le marché avec des descriptifs concernant les particules parfois imprécis. De plus, les processus de fabrication peuvent être soumis à un brevet interdisant la divulgation des processus de fabrication ou des substances utilisées pour stabiliser les NP. Certains travaux ont mis en avant que les techniques de synthèse ainsi que les dispersants/surfactants peuvent conditionner le comportement et la toxicité des NP (Klaper et al. 2009; Suresh et al. 2010). Il est donc souhaitable de travailler directement avec l'organisme producteur de NP afin de vérifier la validité des informations concernant la caractérisation et le mode de synthèse des NP. Sur un échantillon de 101 articles sur la toxicité et l'écotoxicité des NP qui ont été étudiés dans le chapitre 1, 70% des travaux ont été réalisés avec des NP manufacturées et seulement 30% ont été réalisés avec des NP synthétisées par le laboratoire ou un laboratoire partenaire des auteurs de ces travaux.

Les nanomatériaux explicitement référencés dans les produits commercialisés sont relativement peu nombreux. Cependant certains d'entre eux sont inventoriés dans le Nanotech Project (<http://www.nanotechproject.org>) mené par le Woodrow Wilson Institute. Ainsi en Mars 2011, 313 produits à base d'Ag NP, 59 produits à base de TiO₂ NP, 31 produits à base de Zn NP et 28 produits à base d'Au NP ont été recensés. Les Ag NP et les TiO₂ NP sont de loin les NP qui occupent le plus l'attention des scientifiques et suscitent des interrogations du fait du nombre de produits croissants et des quantités produites par l'industrie. Les NP à base de titane ont fait l'objet d'une attention médiatique particulière car elles sont largement utilisées dans les crèmes solaires et les produits cosmétiques. Les Ag NP sont de plus en plus utilisées dans le textile et les produits médicaux pour leurs propriétés antibactériennes. Sur un échantillon de 101 articles scientifiques sur la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules, 27,7 % des travaux portent principalement sur les TiO₂ NP, 21% sur les Ag NP et 21% sur les Cu/CuO NP (Figure 18). De nombreux travaux ont souligné les effets toxiques des Ag NP pour différentes espèces (revue de Fabrega et al. 2011) et des effets particulièrement marqués chez des organismes exposés à des CuO NP (Griffitt et al. 2007; Griffitt et al. 2009). Nous avons donc souhaité étudier l'écotoxicité de ces particules sur nos deux modèles biologiques *S. plana* et *H. diversicolor*. Nos efforts ont été focalisés également sur l'étude des autres NP métalliques manufacturées (Sigma-Aldrich, NanoAmor...) mais dont l'écotoxicité est relativement moins bien connue : les Au NP, les ZnO NP, et les Cd NP.

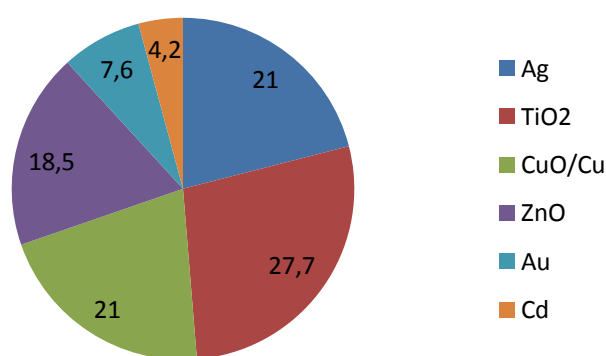


Figure 18 : Pourcentage des différentes NP métalliques étudiées dans un échantillon de 101 articles scientifiques sur la toxicité et l'écotoxicité des NP.

6. Réflexion sur le design expérimental

6.1. Choix des milieux d'exposition

Les mécanismes complexes qui conditionnent le comportement des NP dans l'environnement ont été détaillés dans le chapitre 1 et soulignent les nombreuses difficultés que les scientifiques doivent surmonter pour évaluer leurs effets écotoxicologiques. Dans un premier temps, notre équipe a décidé d'exposer les modèles biologiques sélectionnés *Scrobicularia plana* et *Hediste diversicolor* aux NP directement dans l'eau. Les modèles utilisés dans cette étude sont adaptés pour évaluer une contamination par la phase aqueuse. *H. diversicolor* est un annélide polychète hémissile dont les galeries sont aérées par des flux d'eau générées par les mouvements du corps. L'environnement des organismes dans le terrier peut être relativement indépendant des sédiments puisque ses parois sont recouvertes par une couche de mucus sécrétée par l'animal. *S. plana*, filtre d'importantes quantités d'eau et produit un flux d'eau de mer pour son oxygénation dans le sédiment. Les tissus mous des bivalves sont baignés par le fluide palléal qui est constitué principalement d'eau de mer. Les voies d'entrée des NP par le compartiment aqueux ne doivent donc pas être négligées.

L'agrégation ou l'agglomération et la sédimentation des NP sont des mécanismes qui ont été décrits plus en détails dans le chapitre 1. Les nanoparticules peuvent donc se déposer à la surface des sédiments et s'associer avec le biofilm ou s'accumuler fortement dans le biofilm comme le suggèrent Ferry et al. (2009) dans leurs travaux sur les transferts d'Au NP dans les réseaux trophiques. Des interrogations se posent donc concernant le rôle de la contamination par la voie alimentaire pour approfondir les connaissances sur les effets écotoxicologiques potentiels que peuvent induire les NP. Enfin à long terme, les sédiments constituent un compartiment de stockage majeur de nombreux contaminants incluant les NP.

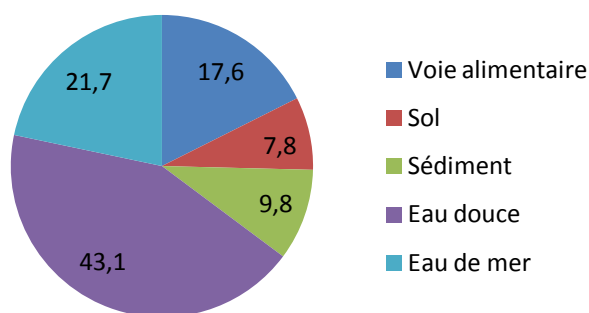


Figure 19 : Pourcentage des milieux d'exposition choisis dans un échantillon de 51 articles scientifiques sur l'écotoxicité des NP.

Ces différentes voies d'expositions nécessitent donc des études spécifiques afin de déterminer leur rôle dans les mécanismes de toxicité des NP dans les milieux aquatiques. Sur l'ensemble des publications sur l'écotoxicité des NP étudiées dans le chapitre 1 (Figure 19), il apparaît clairement que les études sont majoritairement réalisées en eau douce (43,1%) et en eau de mer (21,7%). Peu d'informations sont actuellement disponibles concernant des expositions par la voie alimentaire (17,6%) et lorsque les NP sont associées aux sédiments (9,8%). Dans nos travaux, nous avons souhaité obtenir des informations supplémentaires concernant ces voies d'expositions qui sont les moins étudiées mais qui contribuent à l'accessibilité et donc à la toxicité des NP dans l'environnement.

6.2. Approcher les conditions environnementales

6.2.1. Utilisation de dose réaliste

Du fait des limites techniques de détection des NP dans l'environnement, les données concernant les concentrations en NP dans les écosystèmes côtiers et estuariens sont rares voire inexistantes. Deux approches sont possibles concernant le choix des doses d'exposition. Sur un échantillon de 101 publications sur la toxicité et l'écotoxicité des NP, 36% des articles utilisent des doses supérieures au mg.L^{-1} ou au mg.kg^{-1} . Ces concentrations très élevées

peuvent correspondre à une pollution de type accidentelle révélant des effets aigus provoqués par les NP. Cependant, dans le but de la prévention du risque sanitaire et environnemental concernant les NP, il est nécessaire de s'intéresser également à de plus faibles doses qui pourraient éventuellement être rencontrées dans des sites pollués de manière chronique par des nanomatériaux. Des études de modélisation nous fournissent quelques indications concernant les concentrations en NP qui pourraient entrer dans l'environnement. Ces concentrations ne devraient généralement pas excéder quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans l'eau et $\mu\text{g.kg}^{-1}$ jusqu'au mg.kg^{-1} pour des sols très contaminés (Tiede et al. 2009). Dans le cas de l'absence de mesures environnementales, l'une des stratégies consiste à travailler avec des doses proches de celles rencontrées dans les milieux contaminés par des métaux sous forme soluble. Ces concentrations sont représentatives des contaminations exercées par l'industrie et le relargage des eaux usées dans les bassins versants.

6.2.2. Reproduire les conditions de l'environnement

Durant toutes les expériences de cette thèse, nous avons souhaité travailler en suivant une démarche nous rapprochant au mieux des conditions environnementales. Nous avons donc utilisé de l'eau de mer naturelle qui nous a été fournie à titre gracieux par l'entreprise de conchyliculture Vendée Naissain. Une filtration à $0,45\ \mu\text{m}$ a permis d'enlever les particules grossières éventuellement en suspension dans l'eau. Les sédiments utilisés ont été collectés dans la baie de Bourgneuf et défaunés manuellement afin de conserver la structure du sédiment d'origine. Les expériences ont également été conçues pour simuler les conditions que l'on pourrait rencontrer en cas de pollutions chroniques par des NP dans les milieux aquatiques marins.

Afin de reproduire l'exposition dans l'eau de mer:

- Puisque les NP métalliques sédimentent naturellement dans l'eau, un régime d'exposition semi-statique a été choisi afin de conserver des particules dans la colonne d'eau et mimer un relargage continu de NP dans l'environnement. L'eau ainsi que la contamination ont été renouvelées tous les deux jours.

- Aucun système d'oxygénation n'a été introduit dans les aquariums pour ne pas modifier le comportement des NP dans l'eau ainsi que celui des animaux. Cependant l'eau de mer stockée pour le renouvellement de l'exposition a été oxygénée continuellement.
- Puisque les organismes sélectionnés (*S. plana* et *H. diversicolor*) sont des espèces endobenthiques, les expériences menées dans l'eau ont été réalisées dans l'obscurité afin d'éviter les perturbations par la lumière en absence de sédiment.
- Les bivalves ont été exposés par groupes dans les aquariums. Les annélides ont été exposés individuellement afin d'éviter l'autotomie et le cannibalisme qui peut se produire lorsque d'importantes quantités de mucus sont sécrétées dans le milieu.

Afin de reproduire l'exposition par la voie alimentaire:

- Les bivalves ont été exposés à des algues contaminées. Nous avons choisi d'exposer *S. plana* à *Nitzschia* sp. qui forme un film dans le milieu d'exposition, mimant ainsi la formation du biofilm à la surface de la vasière (Figure 20 A).
- Les annélides omnivores ont été contaminés avec des pièces d'annélides (Figure 20 B) qui ont été précédemment exposés aux métaux (NP ou métal soluble) puis congelés comme décrit précédemment par Rainbow et al. (2004).

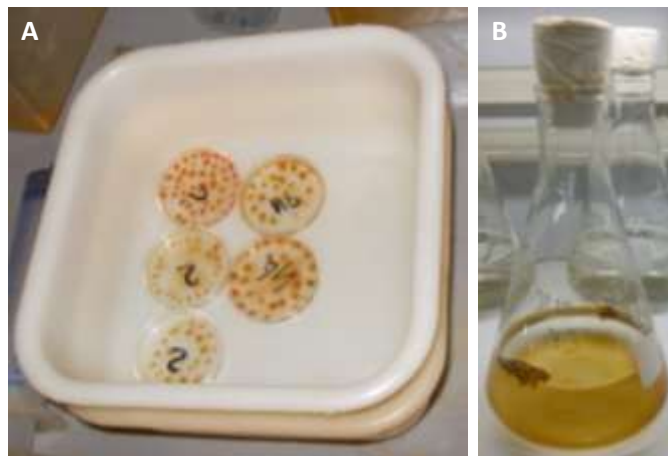


Figure 20 : Préparation de l'exposition par voie alimentaire: Pièces de *H. diversicolor* contaminées A et culture des algues *Nitzschia* sp. B.

Afin de reproduire l'exposition par le sédiment:

- L'introduction des contaminants a été réalisée dans l'eau superficielle afin de simuler le relargage et le dépôt des NP à la surface des sédiments.
- Un système de bullage dans des tubes en PVC perforés a été installé dans le sédiment afin d'éviter leur anoxie. (Ce système n'a pas d'effet sur la spéciation des oxydes métalliques, Larner et al. 2012).



Figure 21 : Système d'oxygénation des sédiments avant l'ajout d'eau de mer.

Reproduire les conditions de l'environnement avec des mésocosmes :

Après avoir travaillé sur différentes voies d'exposition, il semblait pertinent de réaliser des expériences couplant ces voies d'exposition dans des mésocosmes. Un mésocosme fait référence à un système expérimental qui simule des conditions aussi proches que possible de l'environnement tout en contrôlant un certain nombre de facteurs environnementaux (FAO 2009). Ces systèmes permettent d'approcher et de comprendre le devenir et les effets de l'entrée de contaminants dans l'environnement. Ainsi dans nos mésocosmes (Figure 22) nous avons pu intégrer et combiner de multiples paramètres environnementaux :

- Utilisation de doses réalistes pour la contamination en NP.
- Utilisation d'eau de mer et de sédiment naturel.
- Développement de biofilm naturel (bactéries, champignons, algues protozoaires) à la surface du sédiment.

- Reproduction d'un cycle tidal qui est important également pour les migrations du biofilm et la remise en suspension des NP dans le milieu, mais aussi l'alimentation des animaux à marée haute et marée basse.
- Fluctuations naturelles de la lumière et du climat.

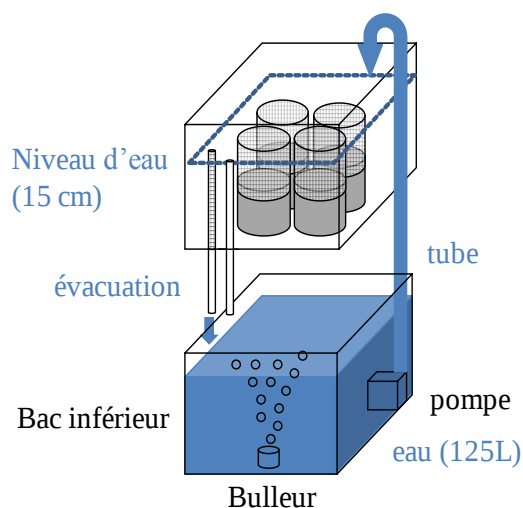


Figure 22 : Dispositif expérimental installé dans un mésocosme pour reproduire le cycle tidal et alimenter l'eau en oxygène.

7. Techniques envisagées pour comprendre le comportement et les effets des nanoparticules dans l'environnement

A la base de toutes les études écotoxicologiques, une méthodologie (Figure 23) bien spécifique doit être appliquée afin d'appréhender tous les aspects de la contamination par les polluants. La triade classique: exposition aux contaminants, bioaccumulation et effets est une nécessité. Dans les travaux d'écotoxicologie moderne, les approches couplant les informations à différents niveaux d'organisation biologique permettent d'évaluer les effets des polluants allant de l'organisme vers la population et les écosystèmes. Durant cette thèse, de nombreuses expériences se sont succédées amenant ainsi de nouvelles questions concernant le comportement et les effets des NP sur nos deux modèles d'étude *S. plana* et *N. diversicolor*. Ces différentes interrogations ont nécessité l'utilisation de techniques multiples et faisant appel à des champs de compétences très différents de la physico-chimie jusqu'à la biologie et

l'écologie pour préciser et affiner notre compréhension des mécanismes à l'origine de l'écotoxicité des NP métalliques. En effet, les études écotoxicologiques sur les NP demandent une adaptation des outils et même parfois la conception de nouvelles techniques d'étude pour travailler sur ces polluants émergents.

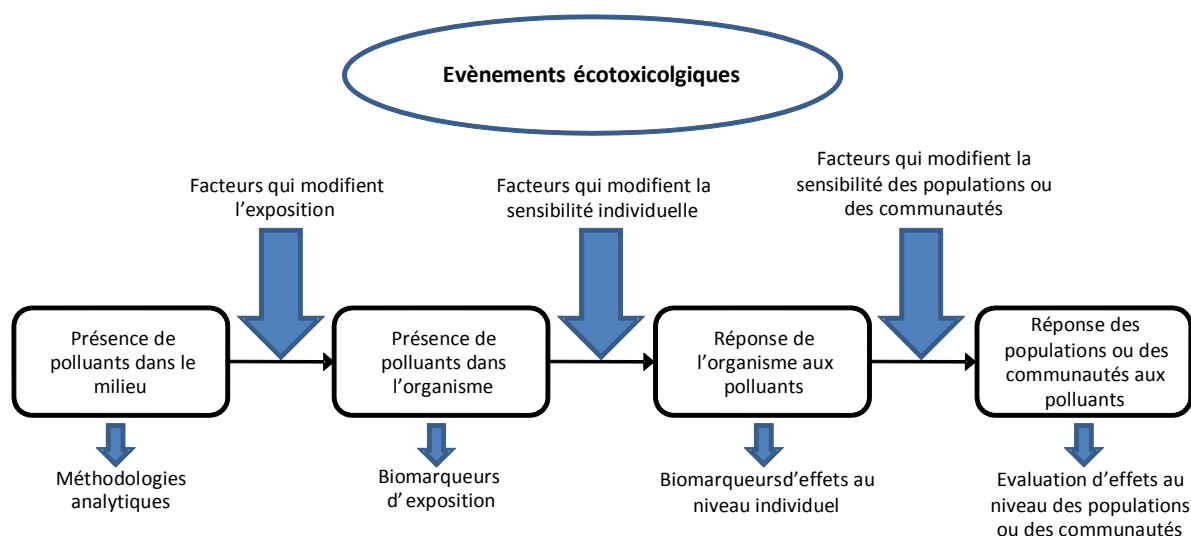


Figure 23 : Méthodologie d'évaluation des effets écotoxicologiques d'après Lagadic et al. (1997).

7.1. Evaluation de l'exposition aux nanoparticules

7.1.1. Caractérisation des nanoparticules dans le milieu d'exposition

La caractérisation des NP est une étape indispensable à la compréhension des mécanismes qui régissent leur comportement dans différents milieux est un pré-requis avant d'étudier leurs effets sur les organismes. Les techniques utilisant la dispersion de la lumière (Dynamic Light Scattering: DLS) sont utilisées en routine pour évaluer la taille des nanoparticules dans les milieux aqueux. Les particules en suspension dans un fluide subissent le mouvement brownien. Si ces particules sont illuminées avec un laser (Figure 24), l'intensité de la lumière diffusée fluctue selon la taille des particules. L'analyse de ces fluctuations d'intensité informe sur la vitesse du mouvement brownien et donc la taille des particules. Le diamètre qui est mesuré par la DLS est appelé diamètre hydrodynamique et se réfère à la

façon dont les particules se diffusent dans le fluide. Le coefficient de diffusion ne dépendra pas uniquement de la taille de la particule primaire mais aussi de la structure de surface, de la charge, ainsi que de la concentration et du type d'ions dans le milieu. Cette technique donne donc accès à la taille des agglomérats ou agrégats (le type de liaison entre les particules n'est pas accessible) associés aux éléments se fixant à leur surface.

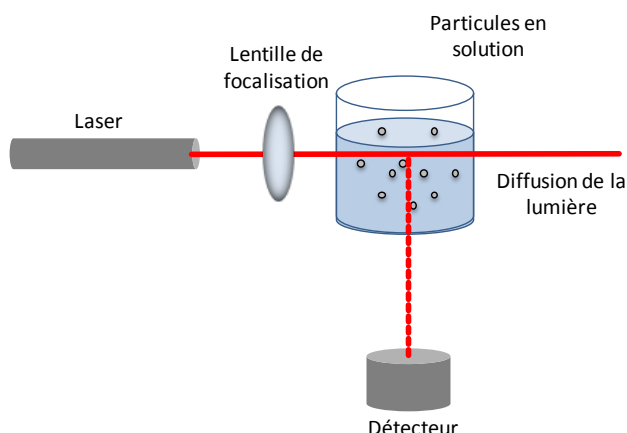


Figure 24 : Schéma de fonctionnement de la DLS (Diffusive Light Scattering).

Afin d'étudier la distribution de la taille des nanoparticules qui sont introduites dans le milieu d'exposition, il est possible de déposer des NP sur des grilles adaptées et de déterminer la taille des NP par microscopie électronique à transmission (TEM). Ces analyses sont particulièrement intéressantes pour vérifier les tailles primaires des particules. Cependant, l'interprétation des résultats provient d'échantillons déshydratés provoquant la formation d'agglomérats à la surface de la grille ce qui peut rendre l'observation des tailles difficile (Figure 25).

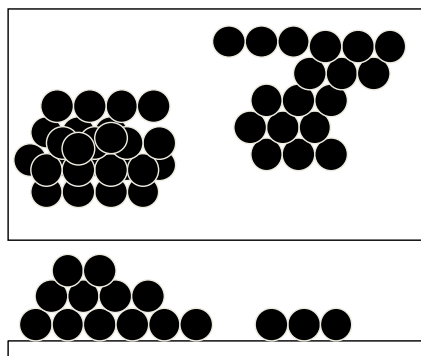


Figure 25 : Nanoparticules agglomérées après déshydrations sur une grille TEM.

Ces analyses nous donnent des informations particulièrement importantes pour connaître sous quelle forme les NP sont présentes dans le milieu d'exposition. Ainsi, il est possible de mieux comprendre sous quelle forme les NP ou les agglomérats pénètrent dans les organismes. Le TEM peut également être couplé avec la microanalyse physique donnant accès à la nature des particules directement au sein des tissus.

7.1.2. Les capteurs passifs (*Diffusive Gradients in Thin film: DGT*)

Dans l'environnement les métaux sont susceptibles de se dissoudre, de précipiter, de former des complexes organiques ou inorganiques. Il était donc naturel de s'interroger sur la forme et la stabilité des NP dans les milieux aqueux pour réaliser nos expériences. La première question a consisté à savoir si la toxicité potentielle des NP venait du métal labile libéré dans le milieu ou si la toxicité provenait spécifiquement de la forme nanoparticulaire ou de la combinaison des deux. Les capteurs passifs (Figure 26 A) ou Diffusive Gradients in Thin film (DGT) sont des dispositifs de prélèvements passifs placés directement dans le milieu d'exposition (Figure 26 C) qui captent la fraction de métal labile libérée dans l'eau libre, ou l'eau interstitielle des sédiments. Ils sont constitués d'un gel chélatant qui complexe les ions métalliques qui l'atteignent et un gel diffusif, qui permet le transport naturel d'espèces métalliques depuis le milieu aquatique vers le premier gel (Figure 26 B). Le gel de diffusion en contact avec le milieu contrôle la vitesse d'accès des métaux au gel chélatant, où les ions s'accumulent. Ces outils permettent une mesure plus sensible que les analyses de métaux totaux directement dans le milieu car ils suppriment les effets de matrices rencontrés dans l'environnement et constituent une mesure intégrative dans le temps reflétant la libération de métal labile durant l'ensemble des expériences. Dans le cas des NP, nous avons pu évaluer si la toxicité venait du métal libéré ou si une part des effets observés chez nos modèles biologiques était attribuable à la forme nanoparticulaire ou encore à une combinaison des deux.

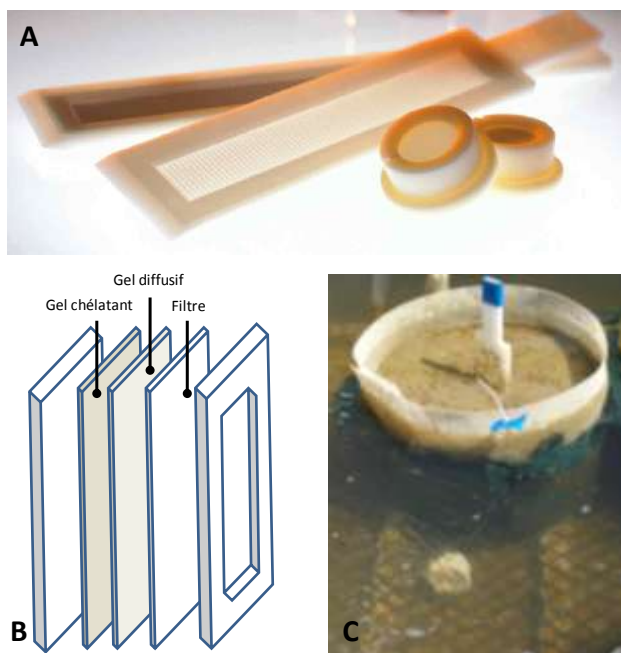


Figure 26 : Capteurs passifs pour la mesure des métaux labiles dans l'eau et les sédiments (A). Structure d'un capteur passif (B). Capteurs passifs en place dans l'eau et les sédiments lors d'une exposition (C).

7.1.3. Dosages des nanoparticules dans les sédiments marquage avec des isotopes

Puisque les NP sont susceptibles d'être stockées à long terme dans les sédiments, il est nécessaire d'investiguer ce compartiment. Les études sur le comportement et les effets des NP dans les sédiments se heurtent à un problème majeur. Les sédiments sont naturellement riches en métaux, ce qui rend difficile la distinction entre la concentration présente à l'origine et la concentration de métaux ajoutée dans le cadre d'une exposition à des NP. Pour surmonter cet obstacle, nous avons utilisé des NP marquées par un isotope du Zn et réalisé des carottes afin de mesurer leur répartition verticale au sein des sédiments. Ces études sont importantes pour évaluer quels sont les organismes les plus exposés aux nanoparticules, si les échanges ont lieu principalement à la surface des sédiments, ou si des échanges ont lieu avec la profondeur mais également les effets de la faune tels que la bioturbation qui influence la répartition des NP dans les sédiments.

7.2. Evaluation de la bioaccumulation dans les tissus mous des invertébrés

A l'heure actuelle, puisque une multitude de NP sont produites avec des caractéristiques toutes aussi variées (structures, tailles, modifications de propriétés de surface...), il est difficile de prédire leur stabilité et leur transformation dans l'environnement. De ce fait, il est également très complexe de savoir si ces particules vont être bioaccumulées dans les organismes et par la suite dans les réseaux trophiques. Les études classiques en écotoxicologie nécessitent l'évaluation de la bioaccumulation des métaux dans les organismes et les études sur les nanomatériaux ne font pas exception à cette règle. Cette étape permet de faire le lien entre les quantités de polluants accumulés dans les tissus et les effets observés dans les organismes. Nous avons donc mesuré les concentrations de métaux accumulés dans les tissus mous des deux espèces sentinelles choisies pour ce travail (*S. plana* et *H. diversicolor*) par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS).

7.3. Localisation des nanoparticules dans les tissus des invertébrés

L'utilisation des capteurs passifs nous donne une information sur la libération de métal labile provenant des NP dans l'environnement, mais on peut se demander si les particules restent intactes dans l'organisme ou si elles sont dissoutes après avoir pénétré dans les tissus. Les mesures de métaux dans différents organes peuvent nous renseigner sur la répartition des métaux dans l'organisme, mais elles ne nous donnent pas accès à leurs formes physicochimiques. En effet, l'intégration des NP dans les organismes peut conduire à des modifications potentielles de forme physico-chimique du fait des variations de pH (par exemple au niveau du tractus digestif) mais aussi de la présence de nombreux ligands organiques potentiels et donc influencer la stabilité des NP. Dans le cas des études sur les polluants sous forme particulaire, les effets observés sont susceptibles de provenir également de l'adsorption à la surface des téguments des organismes ou de leur internalisation par les voies respiratoires ou digestives. Les techniques de microscopie électronique couplées aux microsondes analytiques sont sans doute les plus adaptées pour pouvoir répondre aux questions concernant la forme et la localisation des NP intégrées par les organismes.

7.4. Les biomarqueurs biochimiques

Les résultats des études écotoxicologiques présents dans la littérature scientifique ont permis de choisir une batterie de biomarqueurs adaptés à l'observation des effets potentiels à différents niveaux d'organisation biologique: sub-individuel et individuel. Le rôle des biomarqueurs utilisés dans les différentes expériences décrites dans cette thèse ont été détaillés dans le chapitre 1. Les réponses biochimiques ont été suivies par spectrophotométrie (Figure 27) ou fluorimétrie.

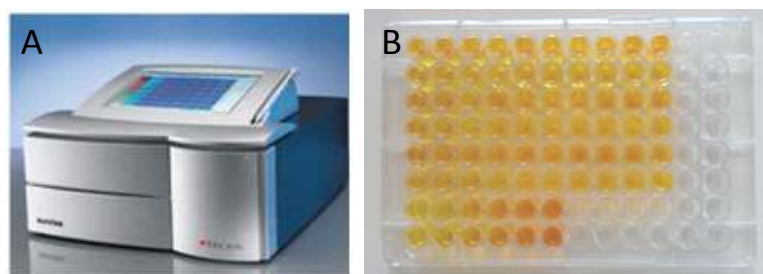
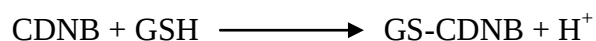


Figure 27 : Lecteur de microplaque Tecan® Sunrise® (A) et microplaque (B) pour le suivi des activités enzymatiques.

L'activité de la catalase (CAT) a été déterminée d'après Clairborne (1985), par le suivi de la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

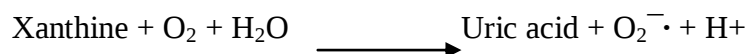


L'activité de la glutathion S-transférase (GST) a été mesurée d'après Habig (1974), en suivant la formation du 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène résultant de la conjugaison entre le substrat (1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion réduit (GSH).

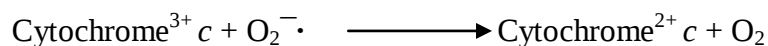


L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été évaluée d'après McCord et Fridovich (1969), par le degré d'inhibition de la réduction du cytochrome c couplée à la génération de superoxyde par la xanthine oxydase.

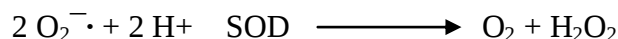
Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est produit par une réaction catalysée par la xanthine oxydase:



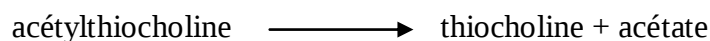
Le cytochrome *c* est réduit par le radical superoxyde:



La superoxyde dismutase inhibe la réduction du cytochrome *c*:

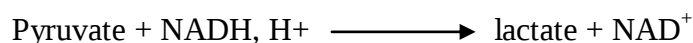


L'activité de l'acétylcholine estérase (AChE) a été déterminée d'après Galgani et Bocquené (1991), par le suivi de la formation de thiocholine et par une réaction avec le dithiobisnitrobenzoate.



L'AChE n'a pas été caractérisée à notre connaissance chez *S. plana*. Il n'est pas clair de définir si le substrat est hydrolysé seulement par l'AChE ou également par les pseudocholinestérases. Dans l'ensemble du document, nous utiliserons donc l'abréviation AChE la plus courante pour parler des cholinestérases.

L'activité de la lactate deshydrogénase est évaluée d'après Diamantino et al. (2001), par le suivi de la transformation du pyruvate en lactate concomitante avec l'oxydation de NADH, H^+ en NAD^+ :



L'activité de la caspase-3 (CSP-3) a été déterminée par la mesure de la dégradation du substrat N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4 trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) en amino trifluoromethyl coumarin (AFC) d'après les informations du fournisseur de kit

Promega. La fluorescence de l'AFC libre est mesurée par fluorimétrie et est proportionnelle à la quantité de CSP-3 activée.

La peroxydation lipidique a été évaluée d'après Halliwell et Gutteridge (1985), par la formation des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) par rapport au standard malonedialdéhyde (MDA). Le MDA forme un adduit (Figure 28) avec l'acide thiobarbiturique (TBA) et peut être mesuré par colorimétrie. Comme le TBA peut réagir avec d'autres composés que le MDA, les résultats sont généralement exprimés en concentrations de TBARS (Roméo et Giamberini dans Amiard-Triquet et Rainbow 2009).

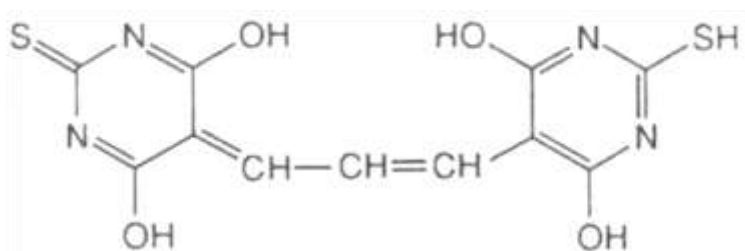


Figure 28 : Figure 26: Adduit MDA-TBA.

La concentration en MT a été évaluée d'après Mouneyrac et al. (2002), chez *S. plana* par polarographie à impulsion différentielle. Des études antérieures (Poirier et al. 2006) ont révélé que la détermination de MT n'était pas un biomarqueur pertinent concernant l'exposition aux métaux chez *H. diversicolor*, ce biomarqueur n'a donc pas été déterminé chez l'annélide. La technique de polarographie permet la détection d'une variation d'intensité du courant lors de la réduction de l'hydrogène des groupements thiols présents en grande quantité dans les protéines type MT. Ceci permet de quantifier les groupements thiols (-SH) dans les protéines en question.

7.5. Les biomarqueurs du comportement

La présence de contaminants dans l'environnement peut engendrer des réponses sensibles et précoces sur le comportement (comportement d'évitement, de nourrissage) incluant des

réponses pour des concentrations très faibles sublétales. Lorsque les niveaux de contamination augmentent, les organismes mettent en place des défenses qui se traduisent par les réponses biochimiques. Le coût énergétique de ces mécanismes peut avoir des conséquences sur l'allocation énergétique ce qui peut accroître les perturbations comportementales. La baisse de l'activité locomotrice rend les organismes plus vulnérables face à leurs prédateurs et les perturbations de l'alimentation modifient l'acquisition d'énergie nécessaire à croissance et la reproduction. Ces biomarqueurs du comportement sont donc des réponses au niveau individuel permettant de faire le lien avec des effets populationnels potentiels. Les effets en cascade depuis les altérations infra-individuelles jusqu'aux effets populationnels ou même au niveau de la communauté ont donné lieu à plusieurs synthèses (Amiard-Triquet et al. 2011; Weis et al. 2011). Dans nos travaux, nous avons focalisé nos efforts sur l'observation de l'enfouissement et de l'alimentation chez *S. plana* et *H. diversicolor*.

Puisque nos deux espèces modèles sont des organismes endobenthiques, leur comportement n'est pas limité à des déplacements à la surface du sédiment. Les modes de vie de *S. plana* et *H. diversicolor* ont été décrits plus en détails dans les sections précédentes. Les mouvements associés à la recherche de nourriture, la ventilation et la locomotion dans leur terrier ne sont pas faciles à étudier par des approches classiques. Afin d'en apprendre plus sur les perturbations de ces organismes, nous avons utilisé le Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB). Le MFB est un outil qui permet d'analyser en détail le comportement des organismes par l'enregistrement des variations de fréquences électriques (Figure 29 B) créés par les mouvements des invertébrés dans le sédiment (Gerhardt et Schmidt 2002). Ces enregistrements sont réalisés à l'intérieur d'une chambre (Figure 29 C et D) reliée à un ordinateur (Figure 29 A) qui est muni d'un logiciel d'acquisition.

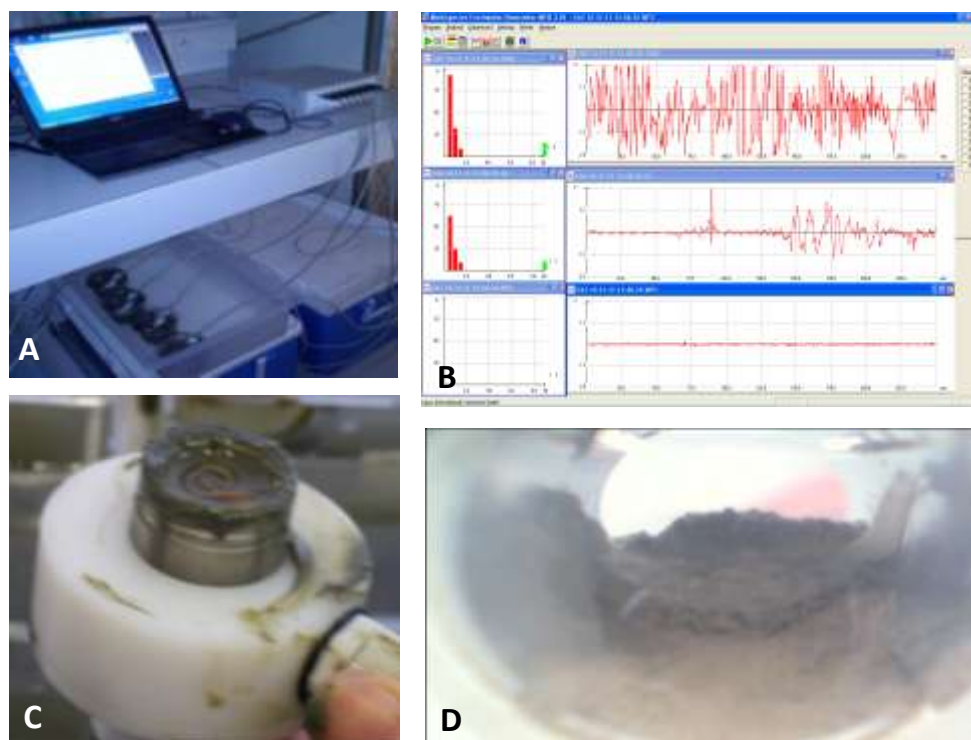


Figure 29 : Multispecies Freshwater Biomonitor: matériel d'acquisition (A), interface du logiciel de mesure des fréquences (B), chambre pour la mesure du comportement de *H. diversicolor* (C) et *S. plana* (D).

7.6. La génotoxicité

Les NP sont susceptibles d'induire directement ou indirectement des effets génotoxiques dont les mécanismes ont été décrits plus en détails dans le chapitre 1. Nous avons donc réalisé des tests comète pour évaluer ces effets chez *S. plana* et *H. diversicolor*. Dans ce travail, les cellules isolées contenues dans les fluides de nos animaux (les hémocytes chez les bivalves et les coelomocytes chez les annélides) ont été extraites pour évaluer les dommages éventuels à l'ADN.

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées (Figure 30 A). L'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose entre lame et lamelle. Ces lames sont plongées dans un tampon de lyse aboutissant à la perméabilisation des membranes par des détergents, et à l'extraction des protéines nucléaires sous l'action de sels en forte

concentration. L'ADN sous forme d'un nucléoïde est mis au contact d'une solution permettant son déroulement. L'ADN ainsi préparé est ensuite placé dans un champ électrophorétique permettant la migration différentielle des fragments. Les molécules chargées négativement, migrent donc vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne. L'ADN intact migre sous l'effet du champ électrique en décrivant une sphère compacte. L'ADN fragmenté migre plus rapidement et forme un halo en direction de l'anode. La migration de l'ADN endommagé forme un panache semblable à celui d'une comète. Ainsi la mesure de la longueur de la queue de la comète permet d'évaluer les cassures de l'ADN avec une caméra et un logiciel d'acquisition (Figure 30 B).

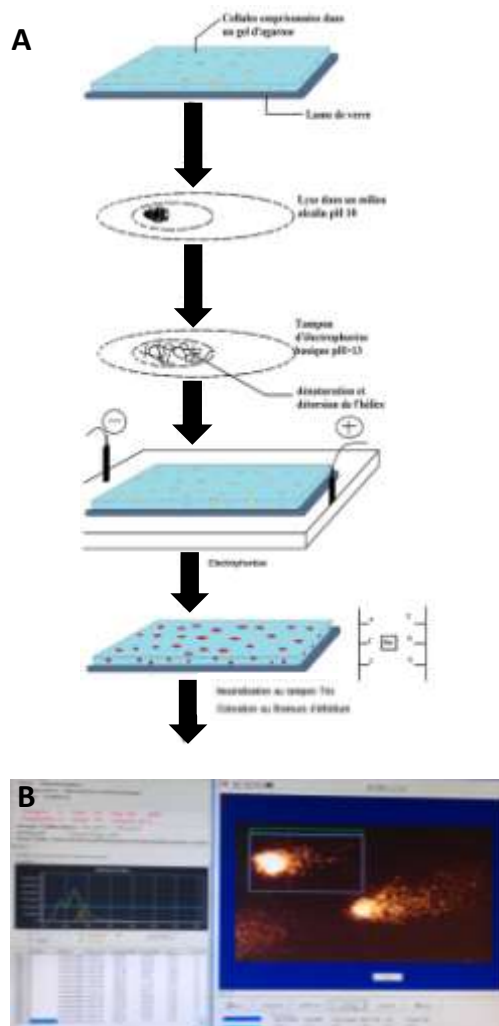
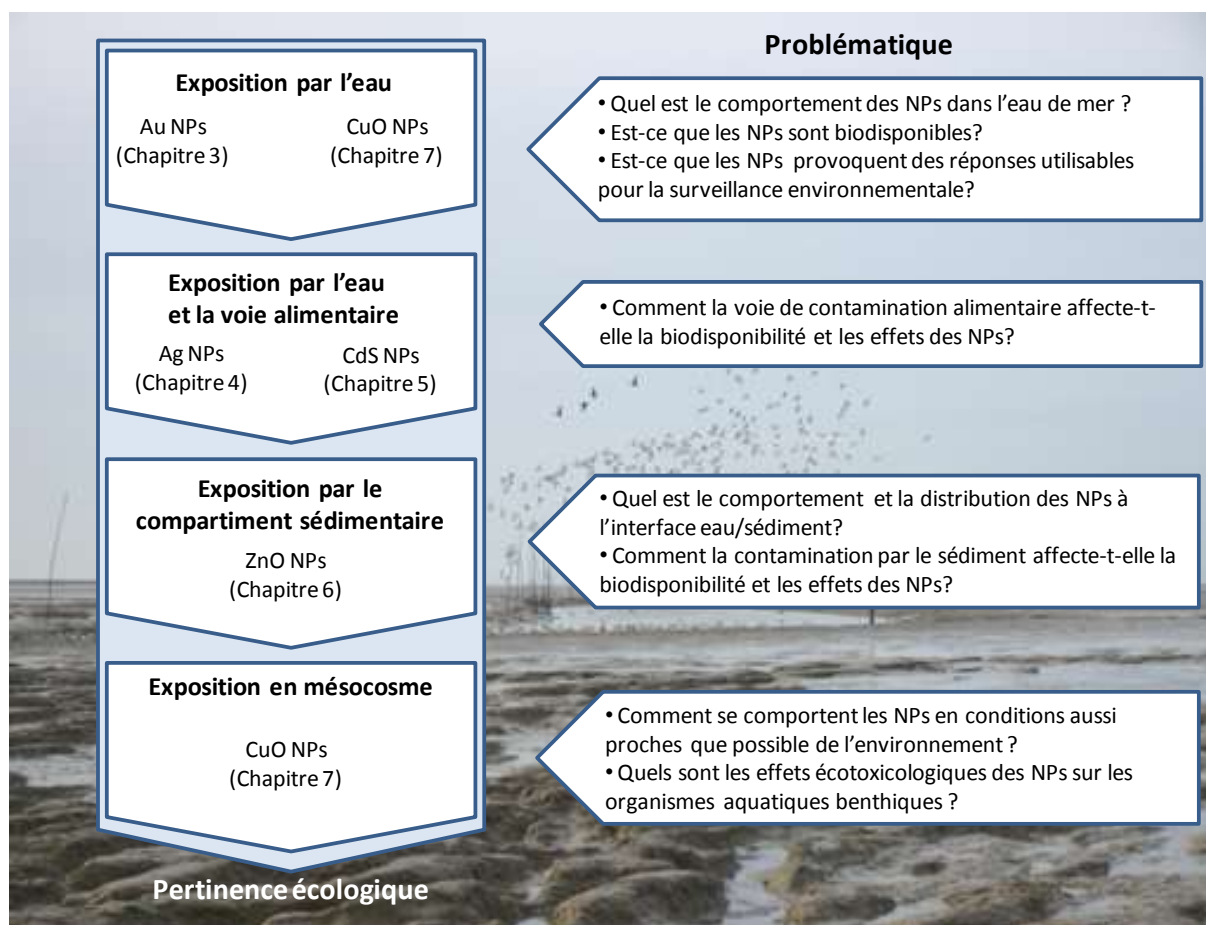


Figure 30 : Principe de l'évaluation des dommages à l'ADN par test comète (A) et interface de lecture sur le logiciel Komet 6, Kinetic Imaging Ltd (B).

Synthèse du chapitre 2



Caractérisation des NPs dans le milieu	Bioaccumulation des NPs	Effets des NPs
• Distribution des tailles (DLS) • Taille de particule primaire (TEM) • Distribution dans le sédiment (Isotopes) • Métal labile libéré dans l'eau ou les sédiments DGT	• Mesure des métaux (AAS) • Localisation des NPs dans les tissus (TEM)	• Défense contre le stress oxydant (CAT, GST, SOD, MT) • Métabolisme énergétique (LDH) • Neurotoxicité (AChE) • Peroxydation des lipides (TBARS) • Apoptose (CSP) • Comportement (enfouissement, alimentation, MFB) • Génotoxicité (essai comète)

Dans ce travail, les résultats sont présentés sous forme de publications scientifiques publiées ou en cours de publication. Cette approche nous a permis de confronter nos études aux regards extérieurs afin d'en améliorer la substance et de répondre aux questions et avis de spécialistes du domaine. Afin de permettre aux lecteurs de comprendre le but de chaque expérience réalisée dans cette thèse, les publications sont associées dans un ordre logique permettant d'intégrer la réflexion scientifique qui a été menée durant ces trois années. Chaque chapitre sera donc replacé dans son contexte en intégrant des éléments concernant les outils utilisés pour surmonter les difficultés rencontrées durant ce travail et d'éventuels résultats additionnels. En conclusion de ce travail au sein du programme NanoReTox et des discussions entre les différents groupes de travail, il sera possible de dégager les premières informations concernant l'évaluation et la gestion du risque des NP métalliques.

Chapitre 3 : Effet de la taille des nanoparticules d'or sur la localisation, la bioaccumulation et les réponses biochimiques et comportementales chez *Scrobicularia plana*.

1. Contexte de l'étude

Ce chapitre comporte deux publications dans lesquelles nous avons étudié le comportement et les effets des nanoparticules d'or (Au NP) via une contamination par l'eau ; ce dernier constituant le premier compartiment qui réceptionne les NP dans l'environnement (Cf Chapitre 1). Par leur mode de vie, *S. plana* et *H. diversicolor* sont susceptibles d'être exposées par voie aqueuse. Lorsque nous avons commencé nos travaux, les protocoles et les informations concernant les expositions aux NP dans le sédiment étaient presque inexistantes. De fortes contraintes apparaissent pour les études dans le sédiment puisqu'il est difficile de répartir uniformément les NP dans ce compartiment et de les caractériser. De plus, certains métaux présentent des concentrations naturelles très fortes, ce qui peut rendre difficile la caractérisation et le suivi des NP métalliques ajoutées au milieu. Les études dans le sédiment demandent donc l'utilisation d'outils bien spécifiques qui seront détaillés dans les prochains chapitres.

L'utilisation du compartiment aqueux comme milieu d'exposition peut s'avérer pertinent. En effet, d'un point de vue mécanistique, l'eau constitue le vecteur d'entrée des NP dans l'environnement (Klaine et al. 2008). Les NP manufacturées sont libérées dans l'eau douce et l'eau de mer où elles subissent des transformations qui dépendent de la nature physico-chimique des particules mais aussi des substances stabilisantes utilisées lors de leur fabrication. Afin de comprendre, sous quelle forme parviennent les NP dans l'environnement, il est nécessaire de mettre en place des techniques pour investiguer ce compartiment. Du point de vue biologique, les modèles utilisés dans cette étude sont adaptés pour évaluer une contamination par la phase aqueuse. *S. plana*, filtre d'importantes quantités d'eau de mer et génère des mouvements d'eau pour son oxygénation dans son terrier. Les tissus mous des bivalves baignent dans le liquide palléal qui est constitué principalement d'eau de mer. Les voies d'entrée des NP par le compartiment aqueux ne doivent donc pas être négligées.

Parmi les NP métalliques, les Au NP sont qualifiées de très bons modèles pour observer l'effet spécifique particulière dans les milieux (Judy et al. 2011). En effet, on trouve de faibles quantités d'or dans l'environnement. De plus, l'or constitue un matériau relativement difficile à altérer, résistant à l'oxydation et la dissolution (Merchant 1998). Il est donc peu susceptible

d'être libéré sous forme soluble dans les milieux aquatiques classiques (Ferry et al. 2009). Les propriétés spécifiques de la matière à l'état de NP peuvent cependant modifier la réactivité des matériaux et doivent faire l'objet d'une attention particulière. Partant du postulat que les Au NP ne seraient pas ou peu dissoutes dans le milieu, il semblait donc très intéressant de les utiliser pour étudier les mécanismes spécifiques aux NP simplifiant une partie des questionnements concernant l'altération et les transformations des NP métalliques dans les milieux aquatiques. Ainsi en réalisant une étude sur ce modèle et en écartant dans un premier temps certaines problématiques des expériences simulant l'environnement, nous avons pu nous focaliser sur des questions de première importance dans la problématique des NP.

Puisque les Au NP sont probablement intactes dans les milieux, il semble important d'observer les mécanismes de bioaccumulation spécifiques à la matière particulaire. En effet, si l'accumulation de substance dissoute dans les organismes marins est relativement bien connue (revu dans Luoma et Rainbow 2008), peu d'études se sont focalisées sur le devenir des particules mises en contact avec les organismes avant l'avènement des nanotechnologies. Les particules peuvent former des agrégats, des agglomérats, s'adsorber sur les surfaces des aquariums, se lier avec d'autres constituants de la colonne d'eau (Cf Chapitre 1). Contrairement aux substances dissoutes, les particules peuvent s'adsorber sur les téguments des organismes comme cela a été démontré chez *Arenicola marina* exposée à des NP de TiO₂ (Galloway et al. 2010), ou être présentes dans le tractus digestif comme cela a été observé chez des daphnies (*Daphna magna*) exposées à des NP d'oxyde de cuivre (CuO) (Heinlaan et al. 2011). La toxicité peut ainsi être liée à l'accumulation de substances toxiques dans les organes ou par des réactions à la surface des membranes biologiques telle que l'oxydation. Nous avons donc décidé de coupler les mesures d'or total dans les tissus avec des analyses de microscopie électronique à transmission afin de préciser le(s) mode(s) d'accumulation des Au NP chez *S. plana*.

Le deuxième aspect que nous avons également souhaité explorer est l'influence de la taille des Au NP puisque cette caractéristique influence directement les effets de surface qui sont primordiaux pour la compréhension du comportement et des effets des NP dans l'environnement (Cf Chapitre 1). A titre d'exemple, Ma et al. (2011) ont montré que la dissolution des NP d'argent (Ag) est directement proportionnelle à leur taille. Dans notre cas,

si les Au NP ne sont pas ou peu altérées dans le milieu, cela signifie également qu'elles conservent leur taille initiale dans le milieu mais aussi dans les organismes. L'effet de la taille suscite l'intérêt des scientifiques dans les études toxicologiques et écotoxicologiques sur les NP. Limback et al. (2005) ont montré que dans un milieu aqueux l'effet taille des NP d'oxyde de cérium (CeO_2) peut être nuancé par les phénomènes d'agglomération des particules. Ainsi, la formation rapide d'agglomérats dans un liquide est fortement favorisée pour de petites particules en raison de leur densité élevée par rapport à des particules de plus grande taille qui pour les mêmes concentrations restent essentiellement non agglomérées. Hull et al. (2011) ont montré que le taux de filtration chez *Corbicula fulminea* peut être influencé par la taille des Au NP présentes dans le milieu. Ils proposent ainsi que les bivalves possèdent des capacités de rétention qui diffèrent selon la taille des particules à l'échelle du nm et que le mécanisme est similaire à celui bien connu concernant l'efficacité de rétention spécifique aux différentes espèces pour les particules de plus grande taille.

Pour cette expérience nous avons choisi d'exposer *S. plana* à une concentration de $100 \mu\text{g Au.L}^{-1}$. La dose testée est supérieure aux concentrations attendues dans l'environnement mais permet par contre d'étudier la bioaccumulation des Au NP et surtout de les localiser dans les tissus des bivalves. La localisation des NP par microscopie électronique à transmission peut s'avérer très complexe dans des organismes exposés à des concentrations réalistes sur le plan environnemental (beaucoup plus faibles que la concentration choisie dans cette expérience) et donc difficiles à observer dans les tissus. Cette concentration est principalement utilisée par rapport à ce problème méthodologique. C'est dans les chapitres suivants que nous aborderons plus en détails les questions de réalisme environnemental. Ainsi cette première expérience a pour but de nous donner les premières clés nécessaires à la compréhension des mécanismes d'écotoxicité des NP pour les organismes aquatiques.

Les problématiques abordées dans ce chapitre sont les suivantes :

- Quel est le comportement des Au NP de trois tailles différentes (5, 15, 40 nm) dans l'eau de mer prenant en compte l'effet des ligands potentiels libérés par les organismes ?
- Est-ce que les Au NP sont bioaccumulés par le bivalve *S. plana* ? Est-ce que la taille influence la bioaccumulation ?
- Où sont localisées les Au NP dans les organismes? Est-ce que les Au NP sont internalisées dans les tissus ?
- Quels sont les effets cellulaires potentiels ainsi que les réponses biochimiques et comportementales engendrées chez *S. plana* ?

**Publication 1: Size dependent bioaccumulation
and ecotoxicity of gold nanoparticles in an
endobenthic invertebrate: The Tellinid clam
Scrobicularia plana.**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpolSize dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*

Jin-Fen Pan^{a,b}, Pierre-Emmanuel Buffet^b, Laurence Poirier^b, Claude Amiard-Triquet^{b,*}, Douglas Gilliland^c, Yolaine Joubert^b, Paul Pilet^d, Marielle Guibolini^d, Christine Risso de Faverney^d, Michèle Roméo^d, Eugenia Valsami-Jones^e, Catherine Mouneyrac^{b,g}

^a College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China^b Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques, MMS-EA2160, Nantes, France^c Institute For Health and Consumer Protection, European Commission, I-21027 Igna, Italy^d Université de Nice-Sophia Antipolis, EA 4238 ECOMERS, Faculté des Sciences, 06108 Nice, France^e Department of Mineralogy, Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK^f Faculté de chirurgie dentaire, INSERM U791, Nantes, France^g Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CEREA, Université Catholique de l'Ouest, 44, Rue Rubelais, 49008 Angers Cedex 01, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2011

Received in revised form

20 March 2012

Accepted 22 March 2012

Keywords:

Gold nanoparticles

Scrobicularia plana

Bioavailability

Biomarkers

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) have important technological applications resulting in an increased potential for release to the environment, and a greater possibility of toxicological effects. The marine bivalve *Scrobicularia plana* was exposed to AuNPs of size 5, 15 and 40 nm during a 16 d laboratory exposure at 100 µg Au L⁻¹. After exposure to AuNPs forming aggregates (>700 nm), the clams accumulated Au in their soft tissues. Biochemical (biomarkers) and behavioral (burrowing and feeding) responses were investigated. Au NPs were responsible of metallothionein induction (5, 40 nm), increased activities of catalase (15, 40 nm) and superoxide dismutase (40 nm) and of glutathione S-transferase by the three sizes of AuNPs indicating defense against oxidative stress. Exposure to AuNPs impaired burrowing behavior. However, it must be underlined that these effects were observed at a dose much higher than expected in the environment.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology is a rapidly emerging discipline with a variety of applications. In nanomaterials, the exponential increase in the ratio of surface-to-bulk atoms with decreasing particle size results in greater activity per unit mass compared to identical bulk materials (Oberdörster et al., 2005). AuNPs are of special interest because of their functions in medicine and therapeutics (reviewed in Kunzmann et al., 2011), in electronics, catalysis, cosmetic, and food industries (Daniel and Astruc, 2003). Widespread use of NPs will likely lead to their increased release into the environment (Klaine et al., 2008), especially in coastal environments that are close to human populations, and potentially impact organisms through the release of their component (e.g. ions for metal-containing NPs) or through one of the most common effect of oxidative stress caused by their inherent mechanical, catalytic, optical properties, and electrical conductivity (Klaine et al., 2008; Johnston et al., 2011; Moore, 2006;

Nel et al., 2006). AuNPs have been shown to induce reactive oxygen species (ROS) production with (Pan et al., 2007, 2009; Tedesco et al., 2010b) or without (Farkas et al., 2010) consequent toxicity. The large surface area and high surface reactivity of NPs is likely to induce oxidative stress (Tedesco et al., 2010b), thus even particles made of low toxicity material like polystyrene can be deleterious in nano scales (Brown et al., 2001), and this toxicity may be size-dependent (Johnston et al., 2011; Pan et al., 2007).

Catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) have been proposed as markers involved in anti-oxidant systems of defense in various aquatic species such as bivalves (Van der Oost et al., 2005). Metallothioneins are a useful tool to reveal the presence of bioavailable metals (reviewed in Amiard et al., 2006), and may be involved in both metal detoxification and antioxidant defense (Viarengo et al., 1999). Defense against the stress caused by contaminants is energy consuming, and lactate dehydrogenase (LDH) activity is particularly important when a considerable amount of energy is rapidly required (Diamantino et al., 2001) under adverse conditions. When the defense mechanisms in organisms are not sufficient to cope with

* Corresponding author.

E-mail address: amiard-triquet-c@univ-nantes.fr (C. Amiard-Triquet).

oxidative stress, changes in the concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are able to reflect the state of lipid peroxidation of the membranes (Knight et al., 1988). In addition, behavioral biomarkers (burrowing, feeding rate) are sensitive tools to assess the impact of contaminants at concentrations far below lethal levels (Amiard-Triquet, 2009), as well-documented in the bivalve mollusk *Scrobicularia plana* (Bonnard et al., 2009; Solé et al., 2009). To date the exact mechanisms concerning the *in vivo* toxicity of NPs (including AuNPs), and the link between biomarkers at different levels of biological organization (e.g. molecular vs. individual) remain poorly understood.

Sediments are the final sink for most contaminants, including NPs. Ferry et al. (2009) showed recently that Au nanorods passed from the water column to sediment (concentration factor was 33.1 at 12 d) and the marine food web (e.g. in clam concentration factor was 2.28×10^4 at 12 d) using laboratory-constructed estuarine mesocosms. The aquatic benthic bivalve *S. plana* is a key species in the structure and functioning of estuarine ecosystems and a major link in estuarine food webs, playing an important role in biogeochemical cycles of both nutrients and contaminants as a consequence of its bioturbation activity. It has been shown to be a relevant model organism for the determination of biomarkers (Bonnard et al., 2009; Solé et al., 2009) and was successfully adopted in our recent nanotoxicity studies on CuO NPs (Buffet et al., 2011). In the present study, we carried out *in vivo* evaluation of biological responses of *S. plana* to AuNPs of three sizes (5, 15, and 40 nm). The fate of AuNPs of the three sizes tested was characterized in stock solution and experimental media (seawater with or without the presence of bivalves). In this aim, complementary methods were used to assess size distribution, zeta potential and purity. Animal metabolic condition (LDH activities) and the bioaccumulation of Au from NPs, together with tiered biomarker sets of defense (MT, CAT, GST, and SOD) and damage (TBARS and AChE activity) as well as behavioral biomarkers (post-exposure feeding and burrowing) were adopted.

2. Materials and methods

2.1. Gold nanoparticle characterization

AuNPs of three different sizes (5, 15 and 40 nm) were prepared at JRC (Joint Research Centre, Ispra, Italy) as a suspension of 98.5 mg L^{-1} in citrate buffer, stored at 20°C for experiments for one week at the maximum. The particle size distribution was initially examined by dynamic light scattering at high concentration of Au NPs (nearing 100 mg L^{-1}). See supplementary material (Fig. S1). At present, Disc Centrifuge Photosedimentation (CPS) was used allowing to test lower concentration (model DC2400UHR by CPS Instruments). The liquid samples for the experiments were prepared by diluting suitable quantities of Au NP solutions (0.5 mM) in natural seawater (collected in experimental tanks after 2 d in the presence of bivalves *S. plana* or not) and then periodically sampling the mixture to determine the resulting particle size distributions. The dilutions resulted in solutions with gold concentrations of 30 and 1 mg L^{-1} . The detection limit of the instrument did not permit the use of the lower value of 0.1 mg L^{-1} used in the actual exposure tests. Following addition of the gold to the seawater the samples were mixed and then kept gently agitated for time periods up to 24 h. Samples for CPS analysis were taken after 5 min, 30–60 min and 16–20 h. To provide a comparison with the particle size distribution in salt free solutions, sample containing 30 and 1 mg L^{-1} AuNP solutions were made using filtered analytical grade water.

Au NP solutions were also characterized by transmission electron microscopy (TEM), analysis X by EDS and UV-Vis spectroscopy. Particle size and morphology were characterized using a Jeol JEM 1010 (80 kV) equipped with a camera system. For sample preparation, carbon-coated copper TEM grids were placed onto a drop of 50 μL of citrate-AuNP for 1 min, and dried at room temperature. Electron micrographs were digitized and analyzed using a system to calculate average primary particle diameter. Elemental analysis was performed on the grids using an electron microscope coupled with an Electron-dispersive X-ray microanalysis system (EDS) to identify the chemical composition of the nanoparticles.

2.2. Animal collection and acclimation

S. plana with shell lengths around 2.5 cm were collected from the top 20 cm depth intertidal mudflat in March 2010, from the Bay of Bourgneuf located on the

French Atlantic coast ($47^\circ 59' 04.80'' \text{ N}$, $47^\circ 01' 50.35'' \text{ E}$), an area comparatively clean according to the results of the French national biomonitoring network (RNO, 2006). Then clams were transported to the laboratory in cool boxes covered with seaweeds from the collection site. They were immediately transferred to aerated seawater (33 psu) and allowed to acclimate to the laboratory conditions for 48 h at the same temperature as in the field (10°C).

2.3. Nanoparticle exposure

The nanoparticle semi-static exposures were carried out in triplicate design using pre-filtered natural seawater ($0.45 \mu\text{m}$), with a control treatment and three AuNP treatments each containing one size of AuNPs (5, 15 or 40 nm, respectively). For each of the three size AuNPs, precise volume of the stock AuNP solution (98.5 mg L^{-1} , sonicated for 1 min) was spiked into the pre-filtered natural seawater, to make a final exposure concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ AuNP in the medium. This concentration is environmentally unrealistic but because gold is a very inert metal it was chosen in order to induce some biological responses.

For each condition, clams ($n = 36$) were placed into three polypropylene tanks each containing 2.0 l exposure medium (12 individuals per tank). Exposure tests were carried out for 16 d at 10°C in a dark air conditioned cabin, with the renewal of seawater and AuNPs every other day.

2.4. Postexposure burrowing test

This experiment explored the influence of AuNP exposures on the burrowing behavior responses in invertebrates. Clams ($n = 20$, 6 or 7 individuals randomly taken from the three replicated tanks) were submitted to burrowing tests according to the methodology described in Bonnard et al. (2009) after 7 d of exposure. Briefly, clams were individually transferred on top of the hand-homogenized fresh sediment from the original sampling site (4 cm depth, covered by c.a. 0.5 cm seawater) in plastic containers. Then the burrowed individuals were counted at every 5 min intervals during the 1st hour, 10 min intervals during the 2nd hour, 20 min intervals during the 3rd–6th hours. At the end of the burrowing tests, unburrowed specimens were counted.

2.5. Postexposure feeding test

This experiment explored the influence of AuNPs exposure on the physiological pumping rate of *S. plana*. After 14 d exposure to AuNPs clams ($n = 12$) from the three tanks of each exposure treatment were placed into 2.0 l $0.45 \mu\text{m}$ filtered seawater within a polypropylene container. After the clams opened valves and pumped normally (usually within 10 min), green algae *Irishellina sinensis* were added to each container at a concentration of $30^4 \text{ cells mL}^{-1}$ and stirred to obtain a uniform concentration. Because *I. sinensis* are motile cells, they remain suspended in the water column. Immediately after adding the algae, a 10 mL aliquot water sample was taken and further water samples were hourly taken. The cell density was counted in triplicates by using a hemocytometer (nagotte chamber) under the microscope as commonly used (see for instance Ohs et al., 2010). The clearance rate was calculated using the following equation (Worrall et al., 1983):

$$CR = \text{Vol} \times [\ln(C_1) - \ln(C_2)] / t \quad (1)$$

where CR is the clearance rate of the clams (mL h^{-1}), C_1 is the cell density (cell mL^{-1}) at time 1, C_2 is the cell density (cell mL^{-1}) at time 2, t is the time interval of measurement ($t_2 - t_1$, in h) and Vol is the volume of water (mL). The individual clearance rate for each treatment (clams pre-exposed to 5, 15 or 40 nm AuNPs or the control) was finally calculated from the mean of two consecutive measurements for each replicate ($n = 3$).

2.6. Sample preparation for biochemical measurements

Following exposure, the soft tissues of clams were quickly separated from the shells, and individually weighed. All subsequent operations were performed at 4°C to prevent enzyme or tissue degradation. All individual samples were then stored at -80°C until biochemical analysis.

For MT and LDH, measurements were carried out individually ($n = 30$ for each biomarker). For GST, CAT, SOD, TBARS and ChE, determinations were carried out on 6 pools of 3 individuals per treatment. The different biomarkers were determined in the whole soft tissues after homogenization and centrifugation adapted to each of them (Buffet et al., 2011). In addition for MT the supernatant was heat-treated and centrifuged again to separate the thermostable MT from most of the other proteins which are thermodegradable (Buffet et al., 2011).

2.7. Biochemical analysis

Total proteins were determined according to Bradford (1976). Catalase activities were assayed as described in Claborn (1985), the variations in absorbance at 240 nm caused by the dismutation of hydrogen peroxide were measured. GST activities were measured spectrophotometrically at 340 nm by quantifying the

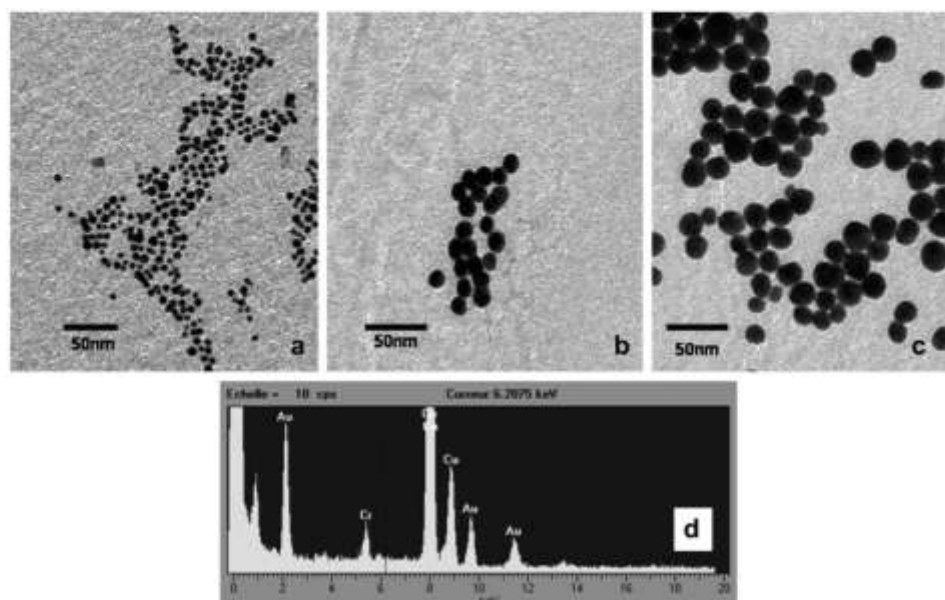


Fig. 1. (a–c) TEM images of 5, 15, 40 nm AuNP on carbon-coated grids. In each panel, scale bars denote 50 nm. (d) Elemental composition of nanoparticles collected through an analysis X by EDS.

nmols of glutathione conjugate produced per minute per mg protein following the conjugation of the acceptor substrate 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione (Habig et al., 1974). SOD activity was determined at 550 nm as the degree of inhibition of cytochrome C reduction by superoxide anion radicals generated by xanthine oxydase/xanthine reaction at 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). Lipid peroxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Buege and Aust, 1978), quantified by reference to MDA absorbance at 530 nm (Halliwell and Gutteridge, 2007). LDH activity was measured with a microplate reader as described in Diamantino et al. (2001). Acetylcholinesterase (AChE) activity (nmoles of thiocholine produced per min per mg protein) was determined according to Ellman and Courtney (1961) adapted to a microplate reader by Galgani and Bocquené (1991). In *S. plana* it is not clear if only AChE or also pseudocholinesterases are able to hydrolyze the substrate used. Thus in the all paper, we will use the abbreviation ChE for cholinesterases.

2.8. Metal quantification in clams

All laboratory ware was soaked in 10% HCl, rinsed three times with deionized water and dried in a desiccator. Following the exposure, Au accumulation in *S. plana* (as the sum of content in supernatants and pellets obtained after the first centrifugation, see above section 2.6) from each treatment was investigated. The soft tissues were digested in aqua regia (HCl and HNO₃, 0.75/0.25 v/v, using 1 mL for 0.3 g ww) at 75 °C up to dryness. These digests were diluted with 0.4% HCl to make the Au concentration in an appropriate range for analysis by atomic absorption spectrophotometry (VARIAN SpectraAA800) using standard addition calibration and background correction with Zeeman effect. Detection and quantification limits were respectively established to 0.03 and 0.3 µg g⁻¹ wet weight of organisms. The whole procedure provided a satisfactorily accurate result with a recovery efficiency of 84 ± 5% determined using spiked tissues at a concentration of 10 µg g⁻¹ wet wt.

2.9. Statistical analyses

Biomarker levels were statistically analyzed by one-way ANOVA, using software SPSS (version 18). The homogeneity of variance was confirmed by Levene's test (data of Au concentrations and GST activities were first logarithm transformed to normalize the distribution); when differences were significant, a LSD (Least Significant Difference) post hoc test was performed to find the individual differences between groups. Percentages of unburrowed individuals within the first 240 min of experiment were first ln-transformed for linearization, then the regression coefficients of the least-square regression lines were compared using analysis of covariance (ANCOVA). Less active specimens (unburrowed at the end of the experiment or

burrowed after more than 240 min) were not taken into account to assess kinetic parameters. Statistical significant difference was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. AuNPs aggregation and distribution in exposure medium

The nanosize distribution determined by TEM is depicted in Fig 1(a–c). Particle sizes are in agreement with nominal sizes (5, 15, 40 nm AuNP) as indicated by the scale bar of 50 nm. Fig. 1(d) shows the presence of Au as indicated by the three peaks corresponding to the gold M shell (2.2 keV, L shell (9.7 keV) and X shell (10.8 keV).

The results obtained by CPS at the two concentrations tested (1 and 10 mg L⁻¹), both in the presence and absence of bivalves, were qualitatively similar and for clarity the results presented will refer to the solutions only at 10 mg L⁻¹ (Fig. 2). In all cases, the addition of seawater to the particles produces rapid aggregation/agglomeration resulting in the loss of the characteristic red/pink colour of the Au NP solution within the 20–30 s. Samples removed after 5 min showed that the population of monodispersed primary particles was no longer detectable having been largely replaced by aggregates with sizes 50–80 nm with these growing in nanometers in size in the period 30–60 min. Under the analysis condition used the upper size detectable would be 500–700 nm and after slow agitation overnight, it was observed that the solutions no longer showed any significant detectable presence of nanosized materials in the size range up to 700 nm. It is presumed that continued aggregation of the small particles has resulted in the formation of a much small number of large particles which are no longer detectable due to their low number or having a size outside the detectable range of the instrument. Even carried out at a highest concentration (100 mg L⁻¹), previous studies using DLS were in agreement with the presence of large aggregates in seawater (Fig. S1). The concentrations used in the testing are too low

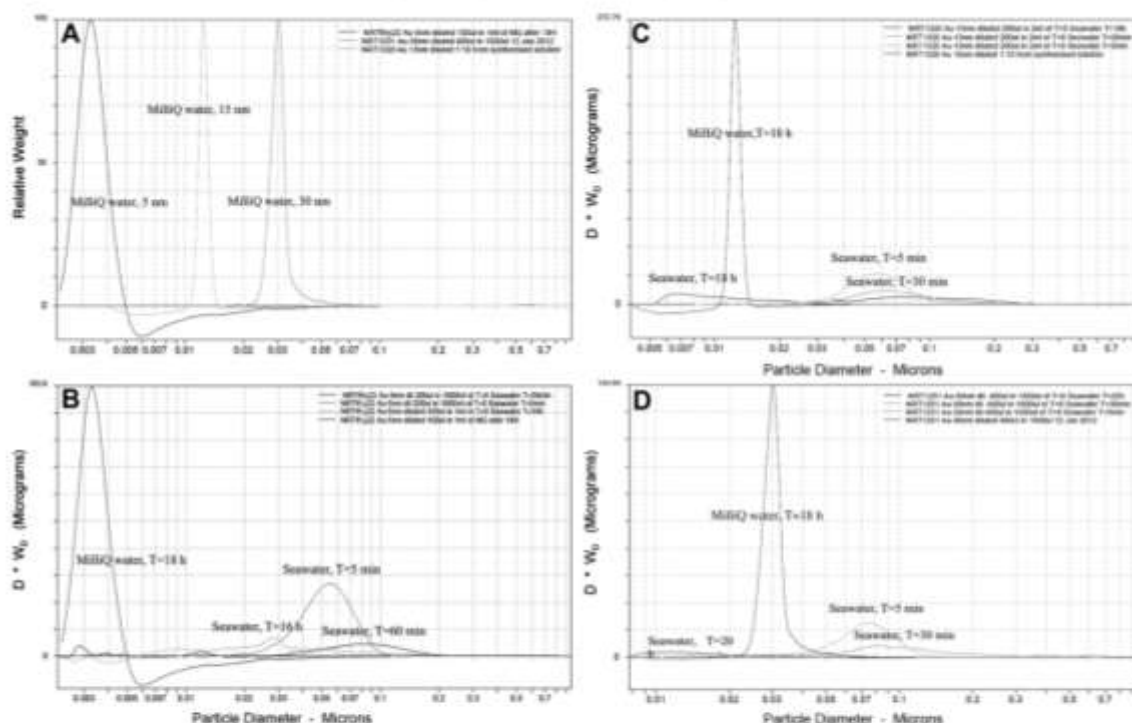


Fig. 2. Particle size distribution using Disc Centrifuge Photosedimentation (CPS): 5 nm, 15 nm and 30 nm Au NPs in MilliQ water after $T = 18$ h, 5 nm AuNPs (B), 15 AuNPs (C), 40 AuNPs (D) in MilliQ water and seawater after $T = 5$ min, 30–60 min and 16–20 h.

(10 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ or 0.1 mg L⁻¹) to reliably provide any useful data with the UV spectrometry equipment available in the laboratory. At 100 mg L⁻¹, the loss of NP structure in seawater was also confirmed by the disappearance of the characteristic plasmon resonance absorption band in the UV–Visible spectra around 520 nm (data not shown). For zeta-potential, the rapidly changing particle size, sedimentation and very high salt concentration make measurements in seawater very difficult to achieve reliably.

3.2. Body concentration of gold

No detectable Au was observed in control clams ($<0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ wet wt, Fig. 3). Following 16 d AuNP exposure, clams had bioaccumulated Au in their soft tissues, the mean concentrations reaching 10.5, 12.0, 17.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ (SD = 2.3, 3.9, 7.7) respectively for clams exposed to 5, 15 and 40 nm treatments, the difference being significant only between 5 and 40 nm treatments (Fig. 3).

3.3. Biomarkers

Results are shown in Fig. 3. MT concentration in *S. plana* increased significantly by 7–46% following 5 and 40 nm AuNP exposure (not significant for 15 nm). In clams exposed to 15 and 40 nm AuNPs, CAT activities increased compared to controls, the difference being significant only in the case of the biggest NPs. The clams exposed to each of the three size AuNPs registered a significant increase of GST activities by 60%, 82% and 86% respectively, compared to controls. When we compare the effect of three sizes on GST activities, no significant differences can be observed. Exposure

to 40 nm AuNPs increased the SOD activities in clams by 41% compared to controls nevertheless no effect of 5 and 15 nm AuNPs on SOD activities were observed. No significant difference of TBARS concentration and LDH activity (data not shown) was observed after exposure to the three size AuNPs compared to controls. AChE activities in clams increased significantly by 33% and 67% following exposure to 15 nm and 40 nm AuNPs, respectively, compared to controls (Fig. 3).

3.4. Postexposure burrowing and feeding

Clams exhibited significantly decreased burrowing kinetics after 7 d of pre-exposure to AuNPs compared to controls (Fig. 4 and Table 1). With increasing in size of AuNPs, stronger inhibition of burrowing kinetics was observed. In addition, only 3 specimens (among $n = 20$) remained unburrowed at the end of the test when they originated from control tanks or tanks with 5 nm AuNPs. On the other hand, 6 specimens (among $n = 20$) remained unburrowed at the end of the test when they originated from tanks with 15 and 40 nm AuNPs (Table 1). Following 14 d exposure to AuNPs, clams showed no significant alteration in feeding behavior compared to controls (Fig. 4).

4. Discussion

4.1. Aggregation and bioaccumulation of AuNPs

The nominal size of AuNPs and their purity were verified by using concomitantly TEM, EDS as well CPS in pure water. For

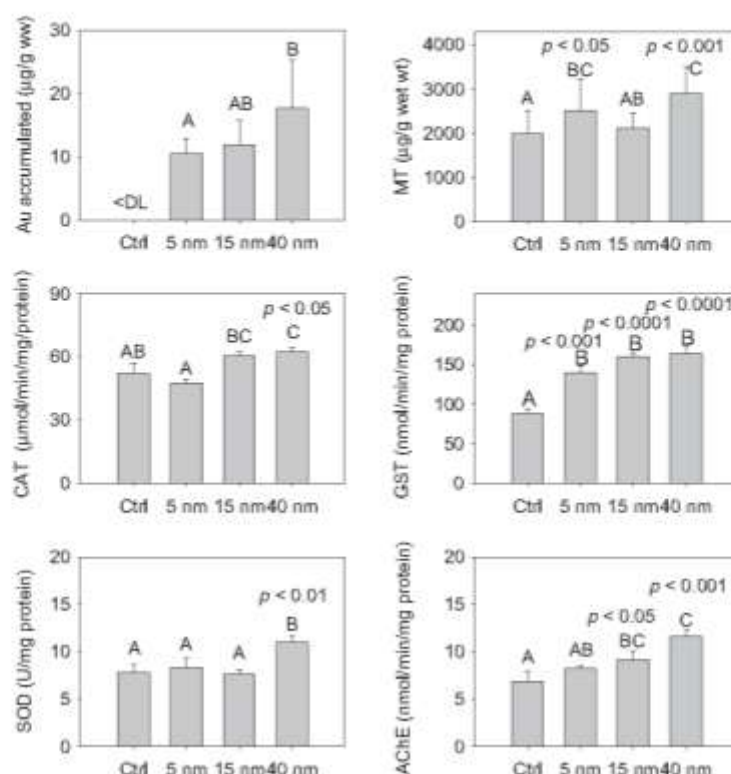


Fig. 3. Au and metalloprotein (MT) concentrations ($n = 10$), catalase (CAT, $n = 6$), glutathione-S-transferase (GST, $n = 6$), superoxide dismutase (SOD, $n = 6$) and acetylcholinesterase (AChE, $n = 6$) activities in *Scrobicularia plana* after 16 d of exposure to Au nanoparticles (NPs) of 3 sizes (5, 15 and 40 nm, $100 \mu\text{g L}^{-1}$) and background levels in controls. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$), significant p values (compared to control) are shown above corresponding column. <DL: below detectable level. Data are mean $\pm$ SD.

a better understanding of the toxicity effect of NPs, it is important to know the particle behavior in exposure medium (Card and Magnuson, 2010). In seawater NPs lose their electrostatic stabilization due to the charge screening by the large amount of NaCl (Chinnapongse et al., 2011). In agreement with these findings, our results indicate that in seawater AuNPs (5, 15, 40 nm) gave rise to the formation of AuNP aggregates with size >700 nm (which is in the size range of natural colloids according to Nowack and Bucheli, 2007) with only a small fraction remaining in the nanosize as soon as after 5 min.

Bivalves (*Perna viridis*, *Corbicula fluminea*) are able to ingest colloidal NPs of different sizes (Pan and Wang, 2004; Hull et al., 2011). Aggregates that can be deposited on the bottom of experimental containers then undergo uptake by sediment-dwelling animals such as *S. plana* which is mainly a deposit-feeder (Hughes, 1969). After uptake, the NP aggregates are supposed to be broken down both physically (e.g. with the action of cilia on the gills and labial palps) and chemically for instance at low pH in the digestive fluid. The pH in digestive tract of *S. plana* is about 5 (Payne and Thorpe, 1993). Au bioaccumulation in bivalves has been studied with some details in mussels exposed to 5 and 13 nm AuNPs (Tedesco et al., 2008, 2010b) and the endobenthic clam *Corbicula fluminea* exposed to 7.8, 15, 46 nm AuNPs (Hull et al., 2011). In both species, it was shown that Au NPs did not only pass through the digestive tract but were internalized, mainly in the digestive gland. Comparing bioaccumulation of different sizes

(nearing those tested in the present study), Hull et al. (2011) have shown that Au internalized from 7.8 nm was dramatically reduced relative to that of the 15 and 46 nm particles. Our results are partly in agreement with these findings since, following 16 d AuNP exposure, a slight increased uptake was observed at the highest size range in clams *S. plana*. Bioaccumulation of Au from NPs is an interesting finding in a species which plays a major role in the coastal and estuarine food chain since Judy et al. (2011) have brought evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain.

4.2. Biochemical marker responses to AuNPs exposure

MT concentration that can be synthesized by the clam *S. plana* as response to metal contamination (Amiard et al., 2006) was significantly increased by exposure to AuNPs (5 and 40 nm). Despite MT levels were not strictly dependent on bioaccumulated Au levels, the highest MT concentrations were observed in specimens with the highest bioaccumulated Au.

GST is one of the most sensitive markers in our study since increases have been observed after exposure to all the three size AuNPs. Catalase and SOD are other enzymes involved in the primary defense against oxidative stress (Regoli et al., 2011). In the present study, CAT and SOD activities were significantly increased only in clams exposed to the 40 nm AuNPs. Induction of SOD, CAT and GST activities may be related to the defense mechanisms; GST

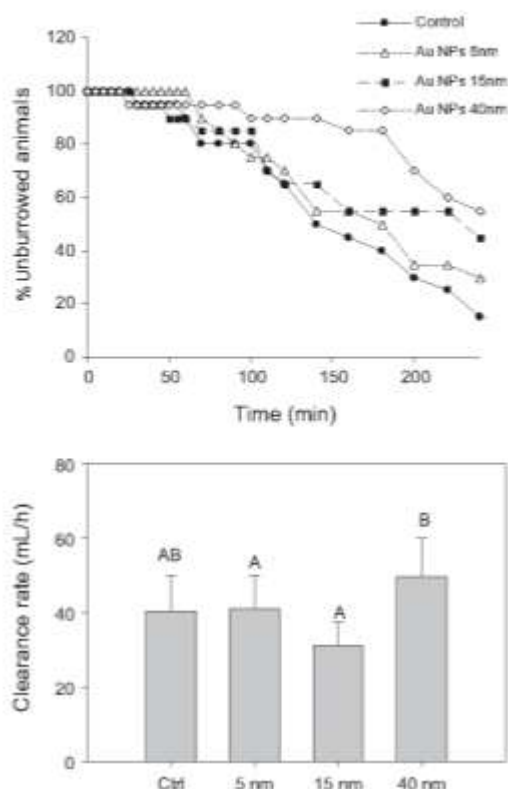


Fig. 4. *Scrobicularia plana* burrowing behavior ($n = 20$, upper panel) after 7-d laboratory exposure, and feeding rate ($n = 12$, data are mean $\pm$ SD, bottom panel) after 14-d laboratory exposure to Au nanoparticles (NPs) of 3 sizes (5, 15 and 40 nm; $100 \mu\text{g L}^{-1}$) compared to control. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) and significant p values (compared to control) are shown above corresponding column.

being the most reactive. In our experimental conditions, it is possible that the defense is sufficiently effective and thus the NPs did not induced any oxidative damage in clams, which otherwise would be revealed by an enhanced TBARS levels. Similarly, Tedesco et al. (2010b) reported in mussels exposed for 24 h to 13 nm AuNP a moderate level of oxidative stress, sufficient to oxidize thiols in glutathione and proteins but without causing lipid peroxidation or induction of thioredoxin reductase activity. In addition, it seems that coping with the potential oxidative stress (known as

Table 1

Linear regression parameters of the logarithm transformed percentages of unburrowed *Scrobicularia plana* in postexposure burrowing test after 7 d laboratory exposure to Au nanoparticles (NPs) of 5, 15 and 40 nm Au ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), compared to control (identically processed but without NPs).

Treatments	Unburrowed	Slope	R^2	p -value
Control	3	-0.0067 ^a	0.9109	–
5 nm Au/NPs	3	-0.0051 ^{ab}	0.9325	<0.049
15 nm Au/NPs	6	-0.0034 ^{ac}	0.9532	<0.037
40 nm Au/NPs	6	-0.0009 ^{cd}	0.8901	<0.0001

^{a, b, c, d} Different letters indicate significant differences between clams pre-exposed to different treatments (control, 5, 15 and 40 nm Au/NPs), asterisks indicate significant differences compared to control (ANCOVA, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). Slope: the regression coefficient of least-square regression lines for logarithm transformed percentages of unburrowed individuals of *Scrobicularia plana*.

a prominent effect of NPs) has not led to a need of additional energy provided by anaerobic metabolism, since no changes in LDH activity were observed. Similarly, exposure of *S. plana* to CuO NPs did not induce changes in LDH activity or TBARS concentrations whereas significant responses of defense mechanisms (Buffet et al., 2011).

4.3. Behavioral responses

AChE is an enzyme essential for the degradation of the neurotransmitter acetylcholine in cholinergic synapses and thus responsible for the correct transmission of nerve impulses in both vertebrates and invertebrates. It is believed that AChE activity is inhibited after organisms are exposed to contaminants, and subsequently can interfere with behavior. Unexpectedly, in the present study we have observed that ChE activity in clams was significantly increased by AuNPs exposure. However, similar discrepancies were reported in specimens of *Spurax auratus* exposed to sublethal copper concentrations (Romani et al., 2003), after exposure of the marine gastropod *Nucella lapillus* to Cd^{2+} (Cunha et al., 2007) or after dietary exposure of the crustacean *Litopenaeus vannamei* to methyl parathion (Comoglio et al., 2005). The induction of AChE activity after AuNP exposure could be due to a phenomenon of overcompensation as proposed by Badiou et al. (2008).

However, behavior does not depend only on the normal functioning of the nervous system but also on the energy available for activity (Amiard-Triquet, 2009). It is therefore not surprising that feeding behavior which is less energy consuming than burrowing is not disturbed whereas burrowing speed was consistently lower in AuNP contaminated clams (particularly for those exposed to 40 nm AuNPs).

5. Conclusion

In summary, our findings may give a better insight into the process of nanometal bioaccumulation and toxic effects in the invertebrates from estuarine environments. There are urgent needs to better understand the nanotoxicity considering the extremely expanding use of nanoscale materials. Au NPs are generally considered non toxic like bulk gold, which is inert and biocompatible. However, gold that is physiologically inert at microscale has been shown to have biological activity at the nanoscale (Knight et al., 2007, cited by Clough, 2009). In the present study, the reported effects on biomarkers can be attributed to the bioaccumulation of gold at a dose ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) which is much higher than those expected in the environment. Other *in vitro* (Pan et al., 2009) and *in vivo* studies with mussels (Tedesco et al., 2008, 2010a,b) have revealed AuNP toxicity. Even if 40 nm AuNPs, frequently induced a slightly higher responses (CAT, SOD, AChE and burrowing kinetics) in clams, there is not a clear pattern of size effect. Clams exhibit diverse mechanisms for coping with stress caused by nanomaterials, suggesting the suitability of its use as biomonitoring models to aquatic environment. We propose a strategy integrating the multi tiered biomarker sets to reveal the effects of biological responses from the intra-individual through the individual levels, in order that we can take necessary environmental management actions.

Acknowledgements

This work was supported by grants no. [214478] from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013), and by a post-doctoral scholarship from the Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications (FFCSA), China

Scholarship Council (CSC) and the Région Pays de la Loire, France, while the first author visiting the University of Nantes.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.envpol.2012.03.051.

References

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barik, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 87–110.
- Badiou, A., Meled, M., Belzunces, L.P., 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 246–253.
- 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*. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 31–26.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175, 191–199.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302–310.
- Buffet, P.-E., Tankou, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Rizzo, C., Guibolini, 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.
- Card, J.W., Magnuson, B.A., 2010. A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology* 29, 402–410.
- Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I., Hackley, V., 2011. A. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Science of Total Environment* 409, 2443–2450.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Clough, S.R., 2009. The potential ecological hazard of nanomaterials. In: Sellers, et al. (Eds.), *Nanotechnology and the Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 169–192.
- Comoglio, L., Amin, O., Roque, A., Betancourt-Lozano, M., Anguas, D., Haro, B.M., 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 66–74.
- Cunha, I., Mangas-Ramirez, E., Guilhermino, L., 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology* 145, 648–657.
- Daniel, M.-C., Astruc, D., 2003. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* 104, 293–346.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* strains. *Chemosphere* 45, 553–560.
- Ellman, G., Courtney, K., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88–90.
- Farkas, J., Christian, P., Urrea, J.A.G., Roos, N., Hasselövd, M., Tollefsen, K.E., Thomas, K.V., 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 96, 44–52.
- Ferry, J.L., Craig, P., Hewel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P.L., Fulton, M.H., Scott, I.G., Decho, A.W., Kashiwada, S., Murphy, C.J., Shaw, T.J., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology* 4, 441–444.
- Galgani, F., Bocquené, G., 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* 25, 147–150.
- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hallinwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, London.
- Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 805–823.
- Hull, M., Chaurand, P., Rose, J., Aulian, M., Bottaro, J.-Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P., 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloidal stable gold nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 45, 6592–6599.
- Johanson, H.J., Hutchison, G., Christensen, E.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2011. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 40, 328–346.
- Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science and Technology* 45, 776–781.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825–1851.
- Knight, J., Pieper, R., McClellan, L., 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry* 34, 2433–2438.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., Fadeel, B., 2011. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodegradation and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810, 361–373.
- McCord, J., Fridovich, I., 1969. An enzymatic function for erythrocyte peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32, 967–976.
- Nel, A., Xia, T., Mädlar, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanoscale. *Science* 311, 622–627.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150, 5–22.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113, 823–839.
- Oh, C.L., Chang, K.L., Grabe, S.W., DiMaggio, M.A., Stenn, E., 2010. Evaluation of dietary microalgae for culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pulex*. *Aquaculture* 307, 225–232.
- Pan, J.-F., Wang, W.-X., 2004. Differential uptake of dissolved and particulate organic carbon by the marine mussel *Ferussakia viridis*. *Limnology and Oceanography* 49, 1980–1991.
- Pan, Y., Leifert, A., Riias, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., Jahnke-Dechent, W., 2009. Gold nanoparticles of diameter 14 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5, 2067–2076.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischer, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnke-Dechent, W., 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3, 1941–1949.
- Payne, D.W., Thorpe, N.A., 1993. Carbohydrate digestion in the bivalve *Scrobicularia plana* (da costa). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry* 104, 499–503.
- Regoli, F., Benedetti, M., Giuliani, M.E., 2011. Antioxidant defenses and acquisition of tolerance to chemical stress. In: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- RNO, 2006. Surveillance de la qualité du milieu marin. Ministère de l'environnement et institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), Paris & Nantes.
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., De Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G., 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Spisus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemo-Biological Interactions* 145, 321–329.
- Solá, 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. *Environment International* 35, 523–531.
- Tedesco, S., Doyle, H., Redmond, G., Sheehan, D., 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 66, 131–133.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., Sheehan, D., 2010a. Exposure of the blue mussel *Mytilus edulis* to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology* 151, 167–174.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., Sheehan, D., 2010b. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 100, 178–186.
- Van der Oost, R., Porte-Visa, C., Van den Brink, N.W., 2005. Biomarkers in environmental assessment. In: Besten, P.J.D., Munawar, F. (Eds.), *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends, and Strategies*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 87–152.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277, R1612–R1619.
- Worrall, C., Widdows, J., Lowe, D., 1983. Physiological ecology of three populations of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Marine Ecology Progress Series* 12, 267–279.

**Publication 2: Gold nanoparticles localization
and cellular damage in the estuarine bivalve
Scrobicularia plana.**

Gold nanoparticles localization and cellular damage in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*

YOLAINE JOUBERT¹, JIN-FEN PAN^{1,2}, PIERRE-EMMANUEL BUFFET^{1,3}, PAUL PILET⁴, CATHERINE MOUNEYRAC^{1,3}, AND CLAUDE AMIARD-TRIQUET¹

¹LUNAM Université, MMS, EA2160, Faculté de pharmacie, 9, rue Bias BP53508, 44035 Nantes Cedex 1, France; ²College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, ³LUNAM Université, MMS, EA2160, Université Catholique de l'Ouest, 3, Place André Leroy, 49000 Angers Cedex 01, France, ⁴INSERM U791, School of dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1

Abstract

The potential toxicity of gold nanoparticles (Au NPs) is addressed by utilizing a bivalve model *Scrobicularia plana*. Using Au NPs in a range of sizes (5, 15 and 40 nm), we examined their subcellular localization in gills and digestive gland. Clams were exposed to Au NPs initially stabilized with citrate buffer at 100 µg L⁻¹. After 16 days waterborne exposure, using transmission electron microscopy (TEM), few particles were observed in gills, distributed as free in the cytoplasm. In the digestive gland, the most striking feature was the presence of individual or small aggregates 40 nm-sized within the nuclei, in association with DNA. Depending on the size, individual or small aggregates (40 nm Au NPs) or more aggregated NPs (5 and 15nm) were observed, with at least one of the dimensions (40-50nm) allowing the passage through nuclear pores. Disorganization of chromatin was marked with an increase in filamentous structures. In some parts no more chromatin was visible, suggesting an increased DNA damage. Moreover the perinuclear space from nuclei was enlarged in contaminated clams when compared to controls.

Keywords

Gold nanoparticles, Transmission electron microscope , DNA damage, Scrobicularia plana

Introduction

Nanotechnology is an emerging field exploiting different materials at the nanometer scale. A wide range of nanomaterials such as iron, silver, carbon, titan, diamond, gold have been engineered. Among these nanomaterials, nanoparticles (NPs) have been broadly defined as having one size range of 1-100nm diameter. Due to their physico-chemical and biological

properties, they have provoked an enormous interest for both industrial and biomedical applications. Gold nanoparticles (Au NPs) show a great potential for cell imaging, targeted drug delivery, cancer diagnostics and therapeutics. Recently, several groups have demonstrated that Au NPs possess an enormous potential to improve the efficiency of clinical diagnosis (Baptista et al. 2008) and of cancer treatment (El-Sayed et al. 2009; Panyala et al. 2009; Kang et al. 2010; Patra et al. 2010). As this field continues to develop, the impact of Au NPs on human and environmental health remains still unclear. Understanding and controlling the interactions between NPs and living cells will be important for assessing their designated functions since NPs may cause undesirable interactions with biological systems. Moreover, the engineering of large quantities of NPs may lead to unintended contamination of terrestrial and aquatic ecosystems (Klaine et al. 2008). Only a few studies deal with their behavior or impact on the environment (Renault et al. 2008; Farkas et al. 2009; Ferry et al. 2009; Ward & Kack 2009; Tedesco et al. 2010a; Tedesco et al. 2010b; Schultz & Vikesland 2011).

At the nanometric scale, NPs acquire novel physico-chemical properties that may influence biocompatibility. Size, shape, surface chemistry, stability, concentration, and time of exposure are reported to induce different effects (see reviews Lewinsky et al. 2008; Lévy et al. 2010). Despite showing little or no cytotoxicity via several standard assays, Au NPs may be internalized in the cells and cause cellular damage (see reviews Lewinsky et al. 2008; Murphy et al. 2008; Alkilany & Murphy 2010). Most investigators studied specific nanoparticle interactions with single cellular system in which parameters can be controlled, even though this type of model is artificial. Conflicting yet not necessarily contradictory data exist with regard to the subcellular location of Au NPs reviewed in Khlebtsov and Dykman 2010: freely dispersed in cytoplasm (Nativo et al. 2008; Li et al. 2008; Stelzer & Hutz 2009) clustered in vesicles (Chitrani et al. 2006; Pernodet et al. 2006; Nativo et al. 2008; Renault et al. 2008; Tedesco et al. 2010a; Tedesco et al. 2010b). Some studies showed a high fraction of radioactive Au NPs linked to DNA (Tsolis et al. 2005), an aggregation of small Au NPs (2 nm) within the nuclei which were damaged (Panessa-Warren et al. 2008), a nuclear fragmentation (Pan et al. 2007; Patra et al. 2007).

The main molecular mechanism of nanotoxicity is the induction of oxidative stress by free radical formation (Lanone & Boczkowski 2006). Recent literature contains conflicting data regarding oxidative stress (Lewinsky et al. 2008; Renault et al. 2008; Tedesco et al. 2008) and cytotoxicity of Au NPs (Murphy et al. 2008; Panessa-Warren et al. 2008; Cho et al. 2009). Tissues have potential defence mechanisms, including intracellular antioxidants and antioxidant enzymes (Young & Woodside 2001) such as glutathion S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and metallothionein proteins (MTs). Our previous investigations (Pan et al. 2012) showed that activities /concentrations of these biomarkers increased following exposure to Au NPs of different sizes. The present work was undertaken to study Au NP uptake in the marine bivalve *Scrobicularia plana* (*S. plana*) which is an intertidal deposit-feeder organism widely used in ecotoxicological studies (Bonnard et al.

2009; Solé et al. 2009). Clams were exposed for 16 days to Au NPs of size 5, 15 and 40 nm initially stabilized in citrate buffer as described by Turkevich et al. (1951), then diluted in seawater at a concentration of $100 \mu\text{g Au L}^{-1}$. The goal of this study was to determine the Au NP cytotoxicity in term of subcellular localization and impact by using transmission electron microscopy (TEM). Au NPs are electronically dense due to their elevated extinction coefficient that allows their detection by TEM. Targeted organs were gills since in bivalves they are the first organs in contact with particles, and digestive gland as a key organ for metal metabolism.

Material and Methods

Animal collection and acclimation

S. plana with shell length of 2.5 cm were collected from the top 20 cm depth intertidal mudflat in March 2010 from the bay of Bourgneuf, located on the French Atlantic coast ($1^{\circ} 59' 04.80''$ W, $47^{\circ} 01' 50.35''$ N). This area is comparatively low in contaminant bioavailabilities according to the results of the French national biomonitoring network (RNO 2006). Then clams were transported to the laboratory in cool boxes covered with seaweeds. They were immediately transferred to aerated seawater and allowed to acclimate to the laboratory conditions for 48h at the same temperature as in the field (10°C).

Nanoparticle preparation and characterization

Particle size and morphology were characterized using a Jeol JEM 1010 (80 kV) equipped with a camera system (Orius 200w Gatan Inc. USA). For sample preparation carbon-coated copper 200 mesh TEM grid (Agar Scientific, UK) were placed onto a drop of $50 \mu\text{L}$ of citrate-Au NP for 1 min, and dried at room temperature. Electron micrographs were digitized and analyzed using Digital Micrograph (Gatan Inc.) to calculate average primary particle diameter. Elemental analysis was performed on the grids using an X ray energy dispersive system (ISIS, Oxford Instruments, England) coupled to the TEM.

Gold nanoparticle suspensions were characterized by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS). More details on the characterization methods are described in Pan et al. (2012).

Nanoparticle exposure

The nanoparticle semi-static exposures were carried out using pre-filtered natural seawater ($0.45 \mu\text{m}$), with one control and three Au NP treatments each containing one size of Au NPs (5, 15, 40 nm respectively) as described earlier Pan et al. (2012). For each of the three sizes, the exposure concentration was $100 \mu\text{g Au L}^{-1}$. For each condition, clams were distributed into three polypropylene tanks, each containing 2.0 L exposure medium. Exposure

tests were carried out for 16 d at 10°C in a dark conditioned cabin, with the renewal of seawater and nanoparticles every other day.

Sample preparation for TEM

Following exposure, for each condition (control and NPs of each different size), three clams were collected from three replicated experimental tanks. The isolated tissues (gills and digestive gland) were cut into small parts to obtain fine pieces. They were rinsed in cold phosphate buffer and placed in a fixing solution of glutaraldehyde (2.5%) and cacodylate buffer (0.1M) for 2 hours at 4°C and post-fixed in 1% osmium tetroxide and cacodylate buffer for 1 hour at 4°C. After fixation, samples were rinsed with cacodylate buffer and dried with increasing concentrations of ethanol and propylene oxide. Samples were embedded in EMBed-812 resin (Agar Scientific, UK) and polymerized. Ultrathin sections were performed with an ultramicrotome (Ultracut E, Leica Microsystems, Germany) for TEM were prepared with a diamond knife (Diatome, Switzerland), collected on copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed using a transmission electron microscope (Jeol JEM 1010, Japan).

Results

Elemental analysis

The nanosize distribution determined by TEM is reported in figure 1 (a-c). Particle sizes are homogeneous with respect to size as indicated by the scale bar of 50 nm. Figure 1d shows the presence of Au as indicated by the three peaks corresponding to the gold M shell (2.2 keV, L shell (9.7 and 11.5 keV). The observations of thin sections in biological tissues described below reveals the presence of NPs showing the same sizes and shape as described in suspensions used for experimental contaminations of bivalves.

Gills

Au NPs were detected close to the basal side of microvilli, therefore demonstrating the ability of Au NPs to penetrate this epithelium (Figure 2a). Inside the tissue, few particles were found free in the cytoplasm (Figure 2a, b). Vesicles were more numerous in exposed specimens than observed in controls and their size was highly variable (Figure 2a). The border wall of microvilli showed no Au NPs retained outside the cell membrane (Figure 2c). One 40 nm Au NP was visible just near the cell membrane (Figure 2c). TEM examinations did not reveal any structural disturbance of the plasmalemmal membrane. Since no endocytosis was observed in contaminated gills, TEM examinations cannot give any information about the nature of these vesicles. Although many ultrathin sections from several experimental samples were analyzed, the contamination and the subsequent bioaccumulation in the gills remained still very weak.

Digestive gland

Electron micrograph of a section through the microvillous border and the apical cytoplasm of the absorptive tissue showed the footlet of a microvillus surrounded by filaments (Figure 3). These cytoplasmic microtubules shaped a filamentous area out of several microtubules orientated in a different way. Not a single Au NP could be observed in contact with the microvilli border outside the plasmalemmal membrane. No endocytosis figures were found in the apical plasma membrane. Au NPs were detected close to the basal side near microvilli inside epithelial digestive gland. Unlike Au NPs observed in gills, those found in digestive gland were never located inside vesicles.

Exposure to 40 nm Au NPs

When comparing the morphological features between controls and contaminated samples, nuclei contrasted markedly. In controls, chromatin condensed as heterochromatin was mostly distributed at the nucleus periphery, while this chromatin was more dispersed in the central part (Figure 4a). TEM examination revealed the localization of 40 nm Au NPs within the nuclei in the digestive gland tissue of exposed clams. Single particles or small clusters of 3-5 Au NPs were distributed all around the nucleus (Figure 4b). In clams exposed to Au NPs, the amount of heterochromatin was generally less abundant and few electron-dense material was present in the central part (Figure 4b). Everytime, Au NPs were localized in the vicinity of heterochromatin. No Au NPs were present in the central part in which the chromatin appeared sparser. However, Au NP uptake within cell nuclei was not homogeneous in the whole tissue. TEM examinations revealed patches of clustered nuclei close to each other which were invaded by Au NPs (Figure 4c). These clustered nuclei were always visualized within the apical cytoplasm adjacent to the plasmalemma. No endocytosis process was visible at the apical surface. Cytoplasmic membrane, mitochondria and cytoplasmic reticulum seemed morphologically intact (not shown).

Exposure to 15nm Au NPs

As for 40 nm Au NPs, 15 nm Au NPs were mainly located within digestive gland cell nuclei (Figure 5a) but particles often aggregated up to a number of about 15-20 (Figure 5b). At a high magnification, width of aggregates was measured (Figure 5b). When referred to the scale bar, the width was about 40-50 nm. Au NPs accumulated only in the vicinity of heterochromatin, the ultrastructure of which was strongly altered compared to controls and 40 nm Au NP exposed tissues. There was less condensed chromatin which seemed to be more dispersed. At some places, no more electron-dense material could be seen (Figure 5a). In particular, fibrillar material was observed instead of condensed chromatin.

Moreover, a number of nuclei seemed to be swollen. As in 40 nm Au NPs exposed tissues, clustered nuclei were visualized within the apical cytoplasm (Figure 6). In the case of 15 nm Au NP exposed tissues the number of nuclei among the clusters was higher than

observed with 40 nm Au NPs (Figure 6). Aggregated NPs were attached to the microtubules described above (Figure 3). No endocytosis vacuoles were seen near this terminal web. Although we noticed an increase in intracellular vesicles, there was not Au NP invasion within these organelles.

Exposure to 5nm Au NPs

TEM examinations of ultra-thin sections of 5 nm Au NP exposed epithelial cells of the digestive gland did not reveal any structural disturbance of plasmalemmal membrane, mitochondria and endoplasmic reticulum (not shown). However, as mentioned previously for 15 and 40 nm Au NP experiments, our results showed the ability of Au NPs to penetrate digestive gland epithelium. Aggregates of Au NPs detected in this tissue remained localized in nuclei (Figure 7). Chromatin appeared to be more disorganized than in digestive glands exposed to 15 and 40 nm Au NPs. Electron-dense material amount was strongly decreased and DNA damage extended to the peripheral area (Figure 7a). We noticed an increase in filamentous structure formation. Therefore, some parts seemed to be devoid of electron-dense material. Au NPs were condensed into large aggregates which decorated the chromatin. The width of these aggregates was about 40-50 nm (Figure 7b). The nuclear membrane appeared ruffling (Figure 7a) and the perinuclear space seemed to be enlarged (Figure 7a) compared to control (Figure 7c).

Discussion

As a whole organism is much more complex than a single cell, *in vivo* toxicological studies are required to assess the safety of nanoparticles. Uptake of Au NPs was shown in the whole soft tissues of the bivalve *Srobicularia plana* exposed *in vivo* to Au NPs of different sizes (Pan et al., 2012).

In controls, Au concentration was below the analytical quantification limit ($0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight) whereas in clams exposed for 16 d, body bioaccumulated Au concentrations increased with the size of particles. Results indicated concentrations of $11 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight (5 nm), 12 ± 4 (15 nm) and 18 ± 8 (40 nm) respectively. The concentration was significantly higher after exposure to 40 nm Au NPs than after exposure to 5 or 15 nm Au NPs (Pan et al., 2012).

Because clams *S. plana* behave alternatively as filter-feeders at high tide and deposit-feeders at low tide (Hughes, 1969; Riera et al., 1999), they can accumulate Au NPs either from suspension in the water column or deposit onto the bottom of experimental tanks. Deposits are ingested through the inhalant siphon of the clams, subsequently transported to the mouth, then to the digestive tract and the digestive gland for intracellular digestion (Hughes, 1969). The Au NPs examined in the present study have been characterized by Pan et al. (2012). It has been shown that aggregation occurred in seawater for all the three different

sizes of Au NPs, increasing from nanosize (5-40 nm) to size >700 nm. This aggregation has probably favoured uptake since *S. plana* has a filtration efficiency nearing 100% for particles of 4 – 40 μm and much of the filtered material is ingested (Hughes 1969).

The present study reveals that all of these bioaccumulated Au NPs were localized almost exclusively in the digestive gland confirming the results obtained in two other bivalves *Mytilus edulis* (Tedesco et al. 2010a) and *Corbicula fluminea* (Renault et al. 2008; Hull et al. 2011). Such a location of Au NPs in digestive gland is not surprising as intracellular digestion occurs in this organ (Hughes et al. 1969) which is also known to be a key site of metal detoxification (Viarengo et al. 1999).

Au NPs were detected inside digestive epithelium but also inside gill epithelium, demonstrating their ability to cross these barriers. Au NPs had various cellular localization when comparing gills and digestive gland. Au NPs which had penetrated gill cells seemed to be free in the cytoplasm. Au NPs were never observed outside this border and no damage or invagination of the plasmic membrane suggesting endocytosis were visible. So, the mechanism allowing Au NPs to enter the cells could not be established from by our observations. However, from several *in vitro* (Li et al. 2008; Alkilany & Murphy 2010; Peckys & De Jonge 2011) and *in vivo* studies (Renault et al. 2008; Tedesco et al. 2010a) it was reported that particles entering cells were trapped in vesicles.

In the digestive gland, once particles have crossed the microvillous border; our TEM observations indicated the presence of Au NPs associated with filaments supporting the apical web near the outer surface, suggesting that Au NPs could be passively transported all along these contractile structures toward the nuclear membrane.

The 40 nm Au NPs entered the digestive gland cells and were exclusively localized within cell nuclei. In these nuclei, single or 2-3 aggregates were distributed along the heterochromatin and seemed to be specially linked to the electron dense chromatin. The loss of condensed chromatin is evident, indicating that the condensed DNA of the nucleus had been damaged. No more dense chromatin was observed in the central part of the nucleus. Despite this ultrastructural abnormality, mitochondria or plasmic membranes seemed to be still intact. The 15 and 5 nm Au NPs were also localized within nuclei. However, some striking differences have been noticed. There are only a few single particles linked to chromatin, most of them were aggregated into patches of different sizes. The loss of chromatin previously mentionned was more pronounced and DNA appeared as fibrillar. Au NPs could be counted and sized within these aggregates. Whatever the number of Au NPs in aggregates, the shape seemed to be defined. When measuring the size of these aggregates, we noticed that the width was always between 40-50 nm. As the Au NPs of the three sizes (5, 15, 40 nm) are able to cross the nuclear membrane, it appears that Au NPs may have pass through the nuclear pores which have a central channel of a patent diameter of 40 nm (Jovanovic-Talisman et al. 2009). Based on this assumption, single 40 nm and aggregates of 5 and 15 nm

Au NPs have to be flexible for crossing the nuclear pores. Chitrani et al. (2006) showed that the maximum cellular uptake occurred at a nanoparticle size of 50 nm. However, these authors claimed that particles were trapped in vesicles and did not enter the nucleus.

Our previous data (Pan et al. 2012) showed that in sea water an aggregation occurred for Au NPs of the three studied sizes. The diameter size of these aggregates was identical and peaked at of 600 nm for the three types of NPs. That implies that following uptake, aggregates will be likely broken down by the action of the cilia present all along the gills and on the microvillous border of the digestive gland. Moreover, aggregates could be dissociated chemically in the digestive tract under acid pH 4.5 (Payne and Thorpe 1993).

In bivalves, bioaccumulation and cytotoxicity of Au NPs was reported by Renault et al. (2008) and Tedesco et al. (2010a and b) without a clear demonstration of nuclear localization. Au NPs have been found inhibiting cell proliferation by down-regulating cell cycle genes (Li et al. 2008). Panessa-Warren et al. (2008) claimed that only small clusters of 2 nm NPs were seen at the nuclear membrane and within the nucleus of lung epithelial cells, whereas, the 10 nm Au NPs were not seen within nuclei. They suggested that the larger core size may not allow their crossing through the nuclear channel measuring 9 nm. But it seems to result from a misinterpretation of the report by Franke et al. (1981) indicating a size exclusion limit of approximatively 18 nm, whereas a more recent paper (Jovanovic-Talisman et al. 2009) indicates a nuclear pore size of 40 nm.

Although NP-induced cytotoxicity has been reported by several groups, many biomedical applications have been reported. Gold NPs conjugated to antibodies can be selectively targeted to cancer cells without significant binding to healthy cells (El-Sayed et al. 2006; Huang et al. 2006). Gold nanospheres anticancer therapy by using their two-photon absorption of 800 nm laser light was reported by the same group (Jain et al. 2008). Recently, Patra et al. (2010) have developed a NP-based targeted drug delivery system (DDS) using an anti-epidermal growth factor receptor as a targeting agent, gemcitabine as the anti-cancer drug and gold as the delivery vehicle in pancreatic cancer. They demonstrated that targeted DDS was much more effective to inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells than its non-targeted counterpart. Kang et al. (2010) proposed that Au NPs can be used alone as an anticancer therapeutic material if conjugated to the proper nuclear-targeting ligand such as the nuclear localization signal peptide sequence (NLS). NLS is known to associate with importin-protein in the cytoplasm after which translocation to the nucleus occurs. In this case, Au NPs induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis (Kang et al. 2010). Our results strongly demonstrate that Au NP localization was observed in cell nuclei without any nanogold targeting signal.

Taken together, our results suggested that the three sizes of Au NPs have a capability of binding to DNA, to induce DNA damage and subsequent events which can specially affect cellular functions leading to cell death. What kind of cell death Au NPs could cause necrosis

or apoptosis? No fragmentation of nuclei and/or cytoplasmic organelles indicating apoptosis process was visible. Our results corroborate those of Pan et al. (2009) who concluded to a size-dependent cytotoxicity, in that 1.4 nm particles trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. Our TEM examinations demonstrated a swollen shape of nuclei which could lead to necrosis. That point requires attention because following necrosis, Au NPs could be externalized in the whole tissue and targeted toward other nuclei. In this way, necrosis could spread everywhere. The products released by necrosis process are highly inflammatory and could cause inflammation in the whole animal. Au NPs could be redistributed via the hemolymph as demonstrated by intravenous administration of Au NPs in mice (De Jong et al. 2008; Sonavane et al. 2008).

Nanoparticle exposure induces responses of biomarkers of defense such as MTs, involved in metal detoxification, GST produced in presence of xenobiotics, SOD and CAT enzymes expressed in oxidative stress (Van Der Oost et al. 2005; Marquis et al. 2009). Our parallel study (Pan et al. 2012) demonstrated that following exposure of *S. plana* to 5, 15, 40 nm Au NPs, these biomarkers were responsive. As Au NPs are xenobiotics, GST activities highly increased. MT levels were higher in exposed than in control animals. It has been shown that MTs play an important role in metal detoxification in bivalves since they are responsible for the sequestration of metal ions (Amiard et al. 2006). MTs are also involved in the defence against oxidative stress (Viarengo et al. 1999; Moreau et al. 2008). The activities of CAT and SOD involved in the primary defences were increased demonstrating the induction of an oxidative stress by Au NPs. It has been demonstrated that amine-coated Au NPs trigger MT overproduction and an oxidative stress in gills and visceral mass of the bivalve *C. fluminea* during a trophic contamination experiment (Renault et al. 2008).

In the present study, there were probably morphological alterations of the nuclear membrane in experimental groups compared to controls. TEM observations in controls revealed a thin perinuclear space whereas in contaminated clams this space seemed to be enlarged. In the same way, nuclei shape appeared swollen and DNA was highly damaged. In addition, a more pronounced alteration was observed following 15 and 5 nm Au NP exposure. Such morphological features could indicate a disturbance of the nuclear membrane due to the induction of oxidative stress by reactive oxygen species (ROS) which in excess cause protein, DNA and membrane injury (reviews Nel et al. 2006; Aillon et al. 2009). However, in the absence of any significant increase of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), no lipid peroxidation was revealed in *S. plana* (Pan et al., 2012). On the other hand, lipid peroxidation products were detected in digestive glands of *M. edulis* exposed to 5 nm Au NPs (Tedesco et al. 2010a) whereas their previous investigation found no significant increase in tissues of mussels exposed to Au NPs at 13 nm (Tedesco et al. 2010b).

Taken together, our results demonstrate that the localization of Au NPs is clearly corroborated to DNA damage. DNA damage seemed to be more important with the 5 and 15 nm Au NPs. Our results are in agreement with several studies indicating a higher cytotoxicity

of smaller particles (e.g. Pan et al. 2007; Panessa-Warren et al. 2008; Tedesco et al. 2010a and b).

Conclusions

We have shown that Au NPs at 5, 15, 40 nm are able to penetrate within branchial and digestive epithelia of a benthic bivalve *Scrobicularia plana* during a waterborne contamination experiment. Differences between the selective tissue bioaccumulation were observed. In gills, only few Au NPs were observed whereas in digestive glands they were numerous and located within the nuclei whatever the size (5, 15, 40 nm). This study has shown a cytotoxicity, corroborating our previous study (Pan et al. 2012) which had shown an increase of biomarker responses linked to oxidative stress. Till now, most of the studies suggesting toxicity of Au NPs were based on *in vitro* experimentation. Our evaluation of toxicity *in vivo* suggests interactions with DNA which could lead to a necrosis process. That points out the necessity to investigate the feasibility of minimizing the cytotoxicity of Au NPs before their use in various medical applications without any hazardous effects on human health. Moreover, our results demonstrate uptake and bioaccumulation of Au NPs from an aquatic ecosystem to a marine bivalve. These findings are of interest in a species which plays a major role in the coastal and estuarine food chain since recent reports have brought evidence for transfer of gold particles within a terrestrial food chain (Judy et al. 2011) and within an estuarine food chain (Ferry et al. 2009). This study confirms that *S. plana* is a suitable animal model for environmental toxicological studies of nanoparticles.

Acknowledgements

This work was supported by a post-doctoral scholarship from the Fondation Franco-Chinoise pour la Science des Applications (FFCSA), China Scholarship Council (CSC) and the Région Pays de la Loire. We kindly thank Prof. Jacques Taxi for helpful discussions. We also acknowledge INSERM U791 for facilities to TEM access. The authors thank the NanoReTox program (part of the EC FP7/2007-2013) for providing contaminated bivalves.

References

- Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J., Forres, M. L., 2009. Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 457-466.
- Alkilany, A. M., Murphy, C. J., 2010. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research* 12, 2313-2333.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, S., Rainbow, P. S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P., Franco, R., 2008. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 943-950.
- 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*. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 11-26.
- Chitrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C. W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* 6, 662-668.
- Cho, W. S., Cho, M. J., Jeong, J., Choi, M., Cho, H. Y., Han, B. S., Kim, S. H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B. H., Jeong, J., 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236, 16-24.
- De Jong, W. H., Hagens, W. L., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. A. M., Geertsma, R. E., 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29, 1912-1919.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., El-Sayed, M. A., 2006. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters* 239, 129-135.
- El-Sayed, L. H., Huang, X., El-Sayed, M. A., 2005. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnosis: applications in oral cancer. *Nano Letters* 5, 829-834.

- Farkas, J., Christian, P., Urrea, J. A. G., Roos, N., Hassellöv, M., Tollefsen, K. E., Thomas, K. V., 2009. Effects of silver and gold particles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 96, 44-52.
- Ferry, J. L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P. L., Fulton, M. H., Scott, I. G., Decho, A. W., Kashiwada, S., Murphy, C. J., Shaw, T. J., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology* 4, 441-444.
- Franke, W. W., Scheer, U., Krohne, G., Jarasch, E. D., 1981. The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *Journal of Cell Biology* 91, 39s-50s.
- Huang, X., El-Sayed, E.H., Quian, W., El-Sayed, M. A. 2006. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society* 128, 2115-2120.
- Hughes, R. N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom* 49, 805-823.
- Hull, M. S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J. Y., Jones, J. C., Schultz, I. R., Vikesland, P. J., 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloiddally stable gold nanoparticles. *Environmental Science and Technology* 45, 6592-6599.
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, H. I., El-Sayed, M. A., 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of Chemical Research* 41, 1578-1586.
- Jovanovic-Taliman, T., Tetenbaum-Novatt, J., McKenney, A. S., Zilman, A., Peter, R., Rout, M. P., Chait, B. T., 2009. Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex. *Nature* 457, 1023-1027.
- Judy, J. D., Unrine, J. M., Bertsch, P. M., 2011. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science Technology* 45, 776-781.
- Kang, B., Mackey, M. A., EL-Sayed, M. A., 2010. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of the American society* 132, 1517-1519.
- Khlebtsov, N., Dykman, L., 2010. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Chemical Society Reviews* 40, 1647-1671.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandez, 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825-1851.
- Lanone, S., Boczkowski, J., 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine* 6, 651-663.
- Levy, R., Shaheen, U., Cesbron, Y., Sée, V., 2010. Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: critical review. *Nano Reviews* 1.
- Lewinsky, N., Colvin, V., Drezek, R., 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49.
- Li, J. J., Zou, L., Hartono, D., Ong, C. N., Bay, B. H., Yung, L. Y. L., 2008. Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts *in vitro*. *Advanced Materials* 20, 138-142.
- Marquis, B. J., Love, S. A., Braun, K. L., Haynes, C. L., 2009. Analytical Methods to Assess Nanoparticle Toxicity. *Analyst* 134, 425-439.
- Moreau, J. L., Baudrimont, M., Carrier, P., Peltier, G., Bourdineaud, J.P., 2008. Metal binding and anti-oxydant properties of chimeric tri- and tetra-domained metallothioneins. *Biochimie* 90, 705-716.
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., Baxter, S. C., 2008. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of Chemical Research* 41, 1721-1730.
- Nativo, P., Prior, I. A., Brust, M., 2008. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *Acs Nano* 8, 1639-1644.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.
- Pan, J. F., Buffet, P.E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Guibbolini, M., Christine, C., Roméo, M., Mouneyrac, C., 2012. Size Dependent Bioaccumulation and Ecotoxicity of Gold Nanoparticles in an Endobenthic Invertebrate: the Tellinid Clam *Scrobicularia plana*. *Environmental Pollution* accepted.
- Pan, Y. S., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahn-Dechent, W., 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 11, 1941-1949.
- Panessa-Warren, B. J., Warren, J. B., Maye, M. M., Van der Lelie, D., Gang, O., Wong, S., Ghebrehwet, B., Tortora, G. T., Misewich, J. A., 2008. Human epithelial cell processing of carbon and gold nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology* 5, 55-91.

- Panyala, N. R., Pena-Méndez, E. M., Havel, J., 2009. Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives. *Journal of Applied Biomedicine* 7, 75-91.
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., Dasgupta, A. K., 2007. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 111-119.
- Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., 2010. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 346-361.
- Payne, D. W., Thorpe, N. A., 1993. Carbohydrate digestion in the bivalve *Scrobicularia plana* (da costa) Comparative biochemistry and physiology. B. 104, 499-503.
- Peckys, D. B., de Jonge, N., 2011. Visualizing gold nanoparticle uptake in live cells with liquid scanning transmission electron microscopy. *Nano Letters* 11, 1733-1738.
- Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., Rafailovich, M., 2006. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 6, 766-773.
- Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudon, N., Gonzales, P., Mornet, S., Brisson, A., 2008. Impact of gold nanoparticle exposure on two freshwater species a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bulletin* 41, 116-126.
- Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., Richard, P., Blanchard, G., Gentil, F. 1999. Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon Bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: importance of locally produced sources. *Marine Ecological Progress Series* 187, 301-307.
- RNO Surveillance de la qualité du milieu marin Ministère de l'environnement et Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), Paris et Nantes, 2006.
- 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. *Environment International* 35, 523-531.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Makino, K., 2008. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66, 274-280.
- Stelzer, R., Hutz, R. J., 2009. Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation. *Journal of Reproduction and Development* 55, 685-690.

- Tedesco, S., Doyle, H., Redmond, G., Sheehan, D., 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 66, 131-133.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., 2010a. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 100, 178-186.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., Sheehan, D., 2010b. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* 151, 167-174.
- Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H., Schmid, G., 2005. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small* 1, 841-844.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J. A., 1951. Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 11, 55-59.
- Van der Oost, R., Porte-Visa, C., Van den Brink, N. W., in *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems* (Eds: P J Den Besten, M Munawar), Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2005, 87-152.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277, 1612-1619.
- Ward, J. E., Kach, D. J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves *Marine Environmental Research* 68, 137-142.
- Young, I. S., Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54, 176-186.

Figures

Figure 1. (a-c) TEM images of 5, 15, 40 nm AuNP on carbon-coated grids. In each panel, scale bars denote 50nm. (d) Elemental composition of nanoparticles collected through an analysis X by EDS.

Figure 2. Electron micrograph of a transverse section through the surface of the border wall of gill in *Scrobicularia plana*. The presence of cilia (*) which penetrate the cytoplasm indicates the apical side of the tissue. (a) localization of 40 nm AuNPs, (b) higher magnification in which three AuNPs are visible. Note the presence of numerous vesicles of different sizes (v), (c) localization of a 40 nm AuNP free in the cytoplasm ↘ just near the cell membrane.

Figure 3. Electron micrograph through the microvillus border of the digestive gland. Straight microvilli (*) are longitudinally oriented and anchored in the apical cytoplasm. The central microvillus core composed of a dense fibrillar meshwork (▲) is surrounded by a microtubule-zone (↗) near the apical web. 15 nm AuNPs are associated with these microtubules (➤).

Figure 4. Electron micrograph of the digestive gland, (a) in controls heterochromatin is mostly distributed at the periphery of the nucleus, while it is more dispersed in the central part, (b) single or small clusters of 40 nm AuNPs (white points on the negative film) are associated with chromatin, (c) positive picture from the same nucleus (c1), 40 nm AuNPs are visualized within three clustered nuclei (1, 2, 3), gold particles are always associated with chromatin, the degradation of which is higher in nucleus 1 than in nucleus 2.

Figure 5. Electron micrograph of the digestive gland, (a) 15 nm AuNP aggregates are localized within chromatin which appears strongly altered. At some places, no more electron-dense chromatin can be seen (*) and fibrillar material was observed instead of condensed chromatin (↗). Nucleus volume is swollen, (b) higher magnification of an AuNP aggregate with an approximate width of 40-50 nm.

Figure 6. Electron micrograph of the digestive gland, 15 nm AuNPs are localized within chromatin of several nuclei (*). The number of nuclei among the clusters is higher than that observed with 40 nm AuNPs.

Figure 7. Electron micrograph of the digestive gland, (a) 5 nm AuNP aggregates with an approximate width of 40-50 nm are localized within chromatin which appears strongly disorganized. There is an increase in filamentous structure. Some parts seem to be devoid of electron-dense material (*). (b) higher magnification of an aggregate. The perinuclear space is enlarged (↘) when compared to the control (c).

Figure 1.

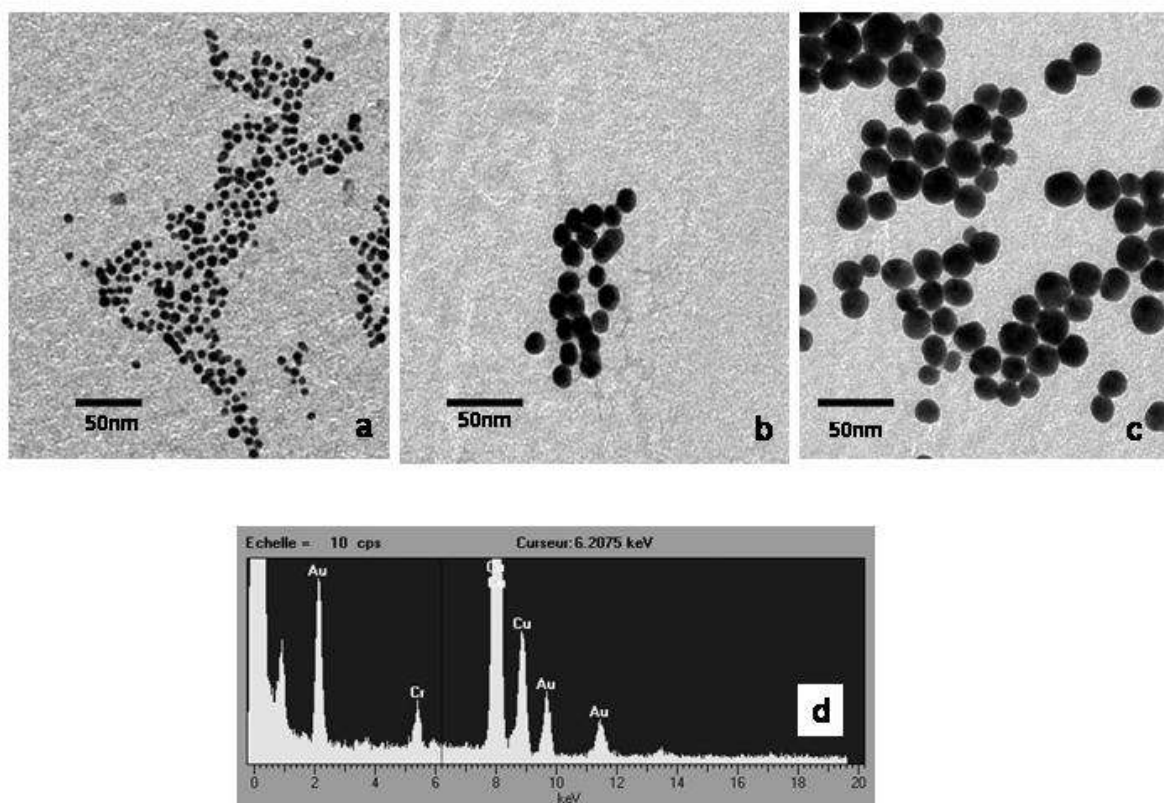


Figure 2.

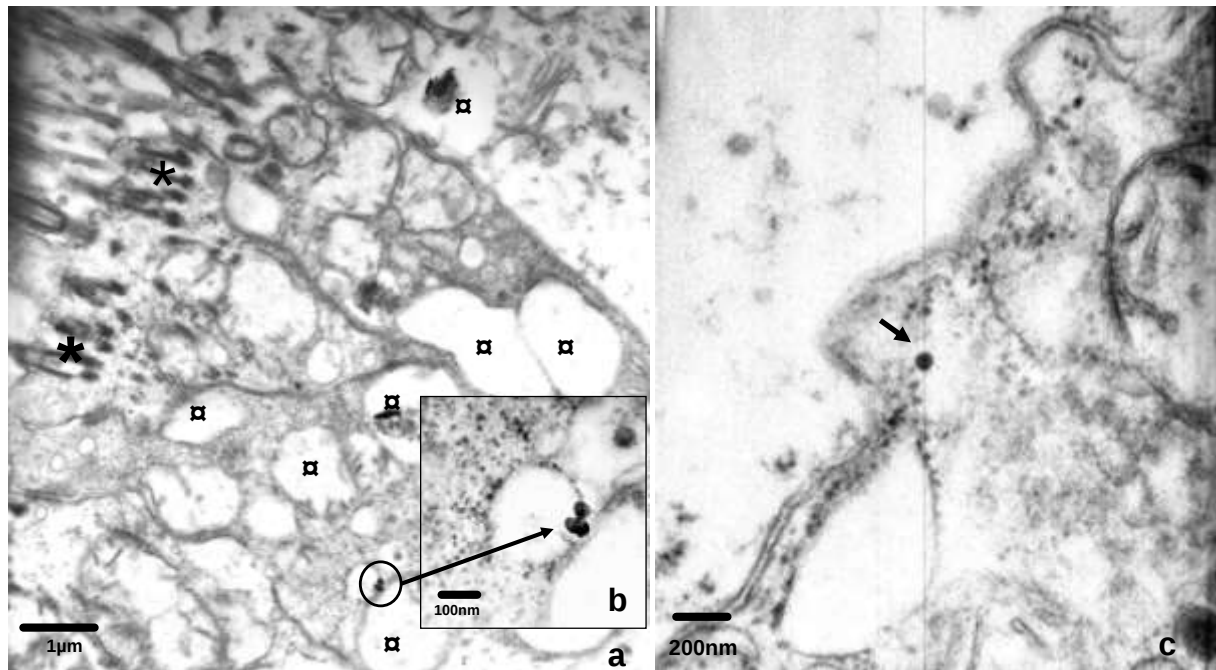


Figure 3.

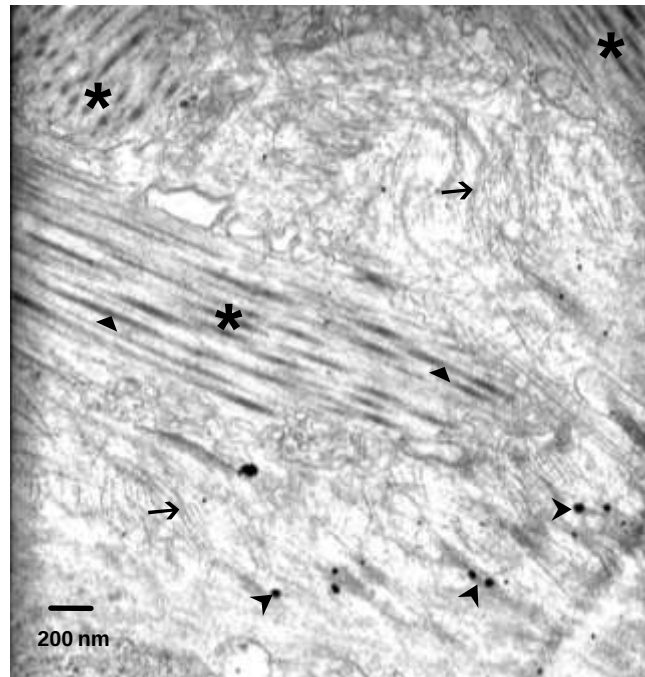


Figure 4.

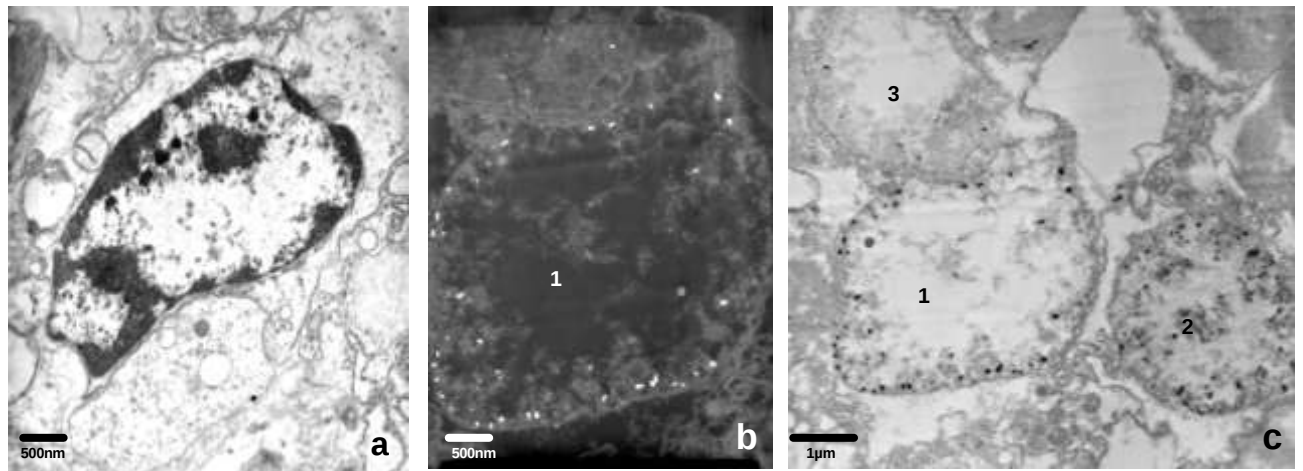


Figure 5.

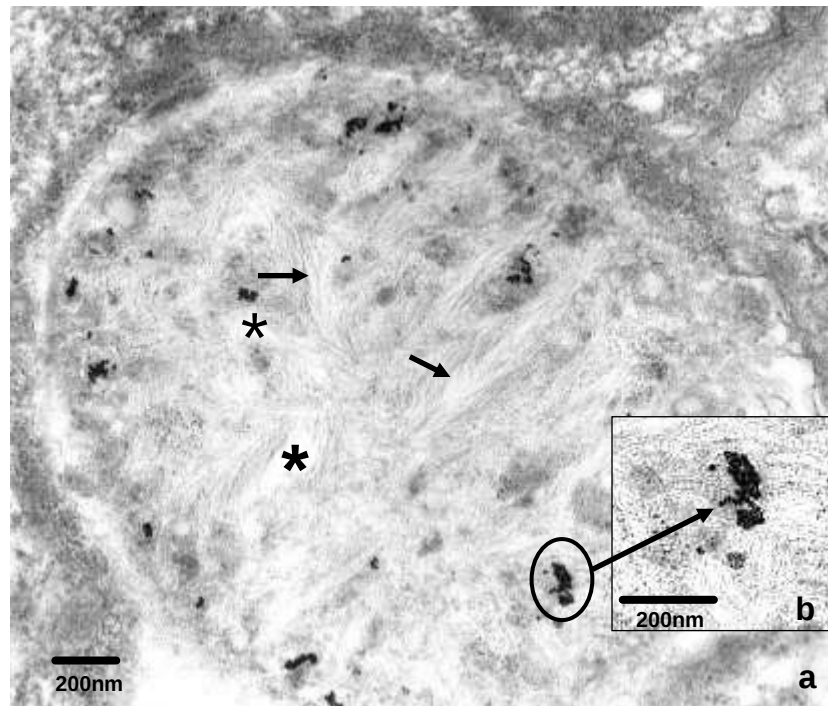


Figure 6.

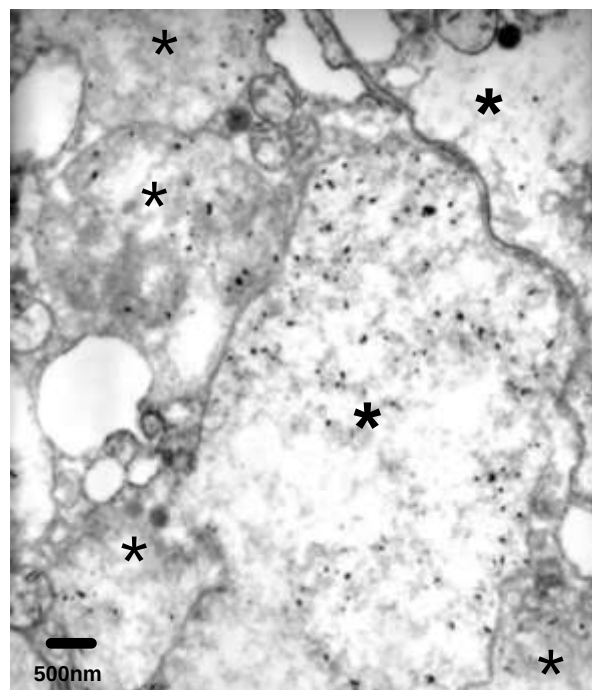
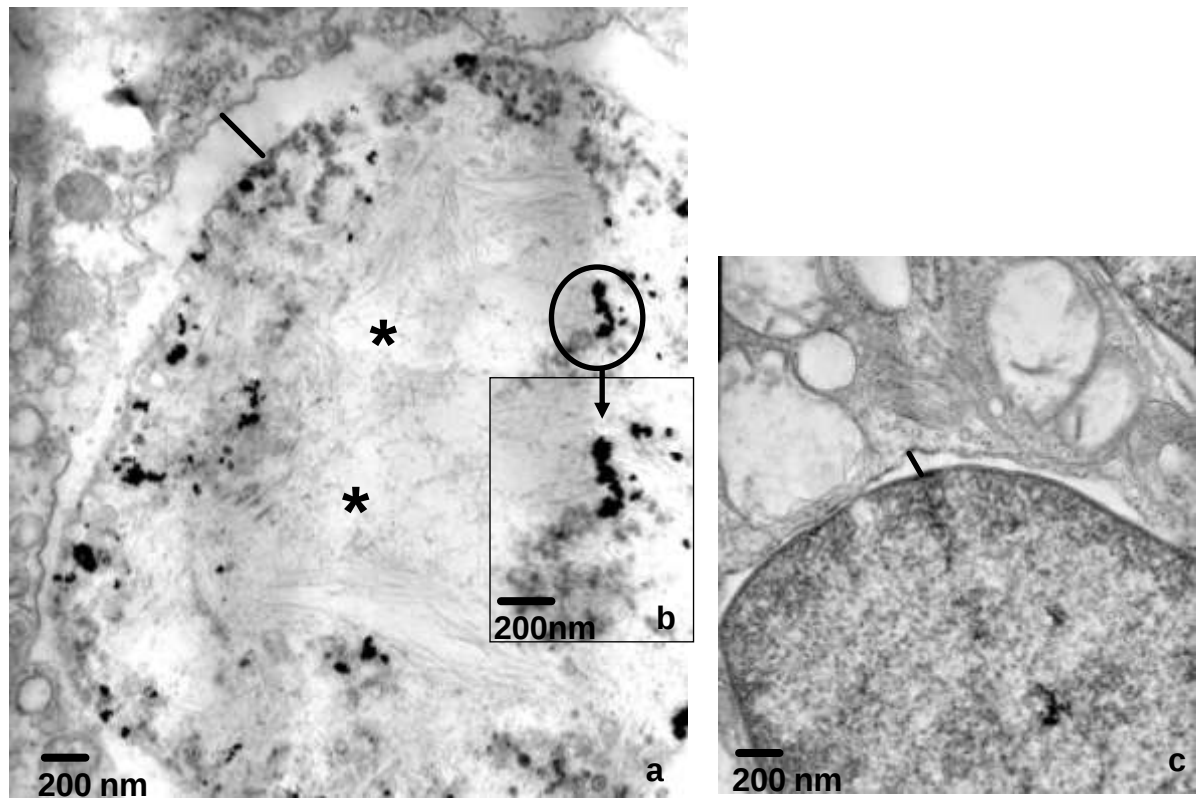


Figure 7.



2. Résultats additionnels

Une expérience similaire à celle réalisée chez les bivalves a été menée conjointement chez l'annélide *H. diversicolor*. Les annélides ont été placés individuellement dans des béciers en plastique de 100 ml remplis avec 50 ml d'eau de mer. Quatre traitements (eau de mer naturelle sans contamination; Au NP 5 nm, Au NP 15 nm, Au NP 40 nm à la concentration de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ont été réalisés en triplicat ($n=10 \times 3$) dans l'obscurité. Les milieux d'exposition (eau et NP) ont été renouvelés tous les deux jours pendant 16 jours. Les invertébrés n'ont pas été nourris pendant l'expérience. Les principaux résultats sont décrits dans le tableau 9.

Tableau 9 : Bioaccumulation et réponses des biomarqueurs biochimiques et comportementaux chez *H. diversicolor* exposés à trois tailles d'Au NP (5, 15 et 40 nm). Les lettres différentes en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$).

Au	<i>Hediste diversicolor</i>			
	Contrôle	Au NP 5 nm	Au NP 15 nm	Au NP 40 nm
Bioaccumulation (ng/g pf)	Nd	700 ± 370 ^A	2100 ± 1340 ^{A,B}	2890 ± 1570 ^B
Enfouissement (pente)	-0,7058 ^A	-0,247 ^B	-0,3719 ^B	-0,3756 ^B
Alimentation (larves consommées/h)	86 ± 9 ^A	78 ± 13 ^B	77 ± 11 ^B	85 ± 15 ^A
CAT ($\mu\text{mol/min/g ww}$)	33 ± 2 ^A	35 ± 3 ^A	38 ± 4 ^A	48 ± 6 ^B
GST (nmol/min/g ww)	49 ± 5	51 ± 9	53 ± 8	60 ± 3
SOD (U SOD/g ww)	28 ± 3	27 ± 6	28 ± 4	28 ± 5
LDH (nmol/min/mg prot)	286 ± 86 ^A	435 ± 78 ^B	404 ± 118 ^B	418 ± 115 ^B
TBARS (nmol/g wet w)	0,57 ± 0,08 ^A	0,33 ± 0,06 ^B	0,38 ± 0,03 ^B	0,38 ± 0,08 ^B
AChe (nmol/min/g ww)	24 ± 3 ^A	33 ± 3 ^B	20 ± 3 ^A	32 ± 5 ^B

Les annélides ont accumulé les Au NP des trois tailles (5 nm, 15 nm, 40 nm). L'enfouissement a été altéré chez les animaux exposés aux NP des trois tailles par rapport au contrôle. La prise alimentaire a été réduite chez les animaux exposés aux NP de 5 et 15 nm par rapport au contrôle. Concernant les biomarqueurs biochimiques, seule l'activité LDH a été induite pour les trois tailles de NP et l'activité CAT chez les annélides exposés aux Au NP de

40 nm. Aucun dommage n'a pu être mesuré car les concentrations de TBARS ont été réduites pour les trois tailles de NP et l'activité AChE a été augmentée chez les animaux exposés aux NP de 5 et 40 nm (la peroxydation lipidique se traduit habituellement par une augmentation des TBARS et la neurotoxicité par une inhibition de l'AChE).

3. Conclusion et perspectives

Conformément aux résultats de la littérature, les mesures de DLS montrent que les Au NP forment des agglomérats dans l'eau de mer. Le résultat le plus important que nous avons mis en avant est la bioaccumulation pour toutes les tailles de Au NP chez *S. plana* et *H. diversicolor*. De plus, les résultats de microscopie électronique à transmission (obtenus dans les tissus de *S. plana* uniquement) révèlent une internalisation des Au NP très majoritairement au niveau de la glande digestive. La microscopie nous a permis d'observer les Au NP des trois tailles préférentiellement dans les noyaux des cellules digestives ce qui constitue un résultat extrêmement intéressant. Bien que les NP soient agglomérées dans l'eau de mer, des particules individuelles ou sous forme de plus petits agglomérats ont été observés en TEM. Ceci suggère que les agglomérats ont pu être fractionnés par des mécanismes physico-chimiques dans le tractus digestif des animaux (Figure 31).

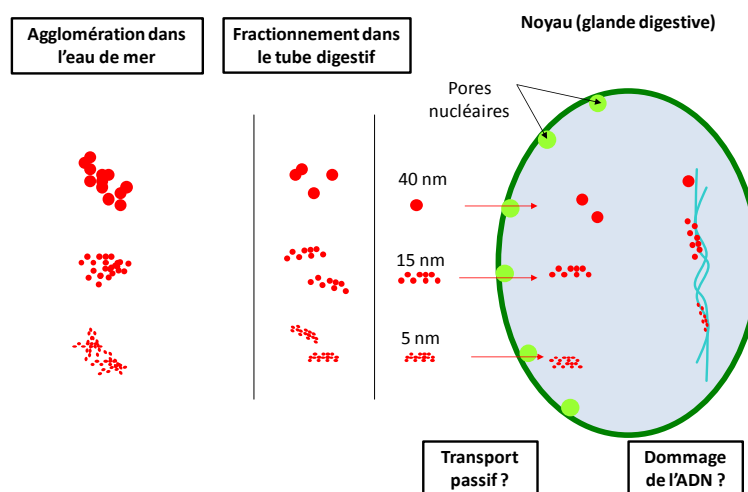
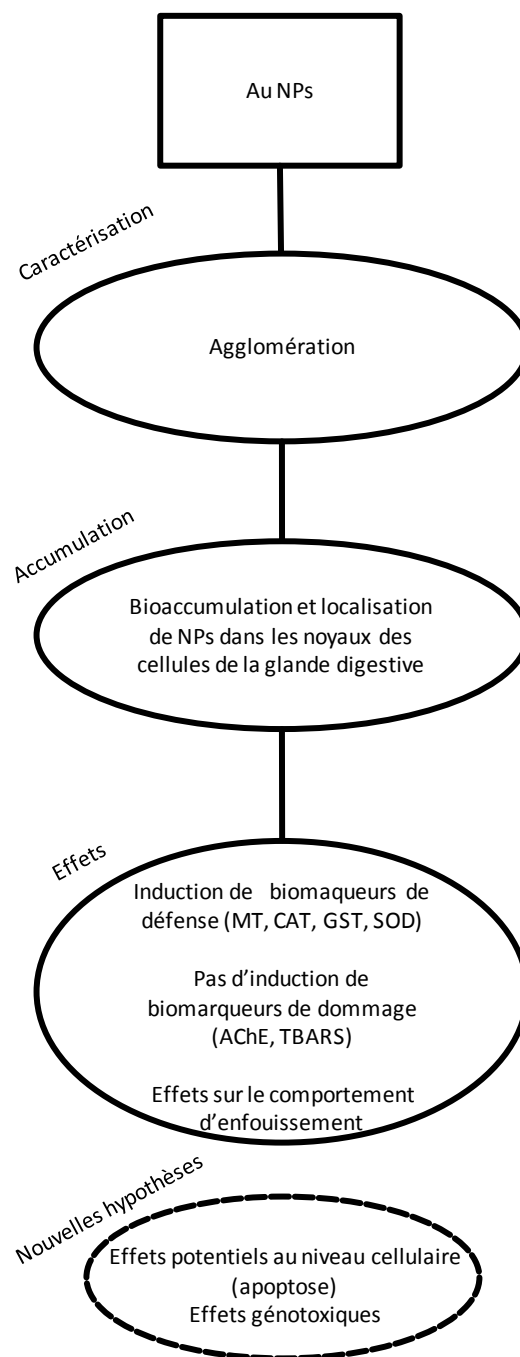


Figure 31 : Mécanisme hypothétique de la prénétration des Au NP dans les noyaux des cellules digestives.

L'entrée des Au NP dans les noyaux pourrait avoir lieu au niveau des pores nucléaires. Ces résultats confirment que les NP peuvent pénétrer dans les noyaux cellulaires et potentiellement occasionner des lésions sur l'ADN et des processus d'apoptose. Cette hypothèse reste cependant à confirmer par des analyses complémentaires (biomarqueur associé aux processus d'apoptose tel que la caspase-3 et un test de génotoxicité tel que l'essai comète) dont certaines seront présentées dans les autres chapitres de ce manuscrit. Concernant les réponses biochimiques chez les deux espèces d'invertébrés, une induction de biomarqueurs de défense a été observée chez les organismes exposés aux Au NP. Ces défenses semblent suffisantes pour lutter contre le stress oxydant rapporté dans de nombreuses études sur les effets toxiques des NP. En effet, aucun dommage n'a pu être mis en évidence par le biais des biomarqueurs biochimiques de dommage (TBARS, AChE). Cependant, des altérations du comportement des deux espèces d'invertébrés exposés aux NP ont été observées, ce qui pourrait avoir des conséquences pour les espèces dans leur environnement (ex : fuite face au prédateur, recherche de nourriture). Bien que ces résultats aient été obtenus avec des doses bien plus importantes que celles qui sont supposées être retrouvées dans l'environnement ($0,14 \mu\text{g Au L}^{-1}$ dans l'eau selon les prédictions via des modèles mathématiques, Tiede et al. 2009), ce travail nous a permis de mieux cerner le comportement et les mécanismes d'écotoxicité des Au NP métalliques sur les organismes marins.

Synthèse du chapitre 3



Chapitre 4 : Réponses biochimiques et comportementales des invertébrés *Scrobicularia plana* et *Hediste diversicolor* exposés aux nanoparticules d'argent par la colonne d'eau ou l'alimentation.

1. Contexte de l'étude

Dans le chapitre 3, nous avons étudié le comportement des Au NP et leurs effets lors d'une exposition directement par la colonne d'eau. Les deux prochains chapitres traitent plus particulièrement de la comparaison entre une exposition à des NP par l'eau ou par l'alimentation. Les NP choisies pour ces expériences sont l'Ag et le CdS dont le comportement physico-chimique en milieu aquatique est particulièrement complexe. Les effets de la salinité et des produits du métabolisme des organismes qui influencent la transformation de ces NP ont été étudiés ainsi que la comparaison des effets entre les formes (soluble ou nanoparticulaire) de l'Ag et du Cd.

Les préoccupations concernant l'exposition des organismes à des contaminants par leur alimentation ont fait l'objet de nombreuses études et plus particulièrement concernant les métaux (Ng et al. 2005; Wang et Rainbow 2005). Ainsi les mécanismes de bioamplification qui se traduisent par une augmentation des concentrations d'une substance à chaque niveau dans les réseaux trophiques sont particulièrement surveillés puisqu'ils peuvent provoquer de graves conséquences sur les superprédateurs, et plus particulièrement sur la santé humaine. Il est avéré que de très nombreux invertébrés marins acquièrent une partie des métaux traces présents dans leurs tissus par l'alimentation (Ng et al. 2005 et littérature citée). Les mécanismes de transfert sont influencés par le type et la qualité de la nourriture ingérée et par la forme physico-chimique du métal. Ng et al. (2005) ont montré que les transferts de Cd, d'Ag et de Zn chez des espèces de bivalves (*Perna viridis* et *Ruditapes philippinarum*) sont directement influencés par l'espèce d'algue ingérée et selon la spéciation des métaux dans les algues. De même Blackmore et Morton (2002) ont montré que l'accumulation de métal par la voie alimentaire dépend du type de proie et du type de métal chez le gastéropode *Thais clavigera* exposé à du Cd, Cu et du Zn. Rainbow et al. (2011) soulignent la complexité du phénomène puisque l'accumulation dépend du type de nourriture, du consommateur et également du métal étudié. De plus, l'assimilation dépend de la forme de métal accumulé par la proie.

Si les nombreuses interrogations concernant les transferts de métaux traces via l'alimentation ont fait l'objet de l'attention des scientifiques, toutes les questions concernant

le devenir des polluants par la voie alimentaire se posent donc également pour les NP. Peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent sur les effets des NP par la voie alimentaire (Cf chapitre 2). Une étude réalisée récemment avec un isotope du Zn (^{67}Zn) a montré une internalisation de Zn dans les diatomées *Nitzschia palea* qui constituaient le vecteur de NP pour le gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Croteau et al. 2011). Un transfert significatif de ^{67}Zn a pu ainsi être mis en avant chez les gastéropodes. Cependant, ces auteurs soulignent les difficultés pour cerner l'origine de la toxicité associée à l'incorporation de ZnO NP pouvant venir du métal lui-même, des propriétés des NP ou de la combinaison d'un effet nanoparticulaire associé à la libération d'ions métalliques. Pipan-Tkalec et al. (2010) ont également investigué l'accumulation de ZnO NP et du Zn soluble chez l'isopode *Porcellio scaber* exposé par la voie alimentaire via des feuilles contaminées. Ces auteurs ont montré que peu de différences sont observées entre les deux formes (soluble et nanoparticulaire), proposant ainsi l'hypothèse du rôle de la libération de Zn soluble provenant des NP dans le processus de bioaccumulation du Zn. De récents travaux ont été menés pour évaluer véritablement les transferts trophiques des NP dans des écosystèmes reconstitués (Ferry et al. 2009; Judy et al. 2011). Judy et al. (2011) ont observé un transfert trophique et une bioamplification des nanoparticules d'or à partir d'un producteur primaire (*Nicotiana tabacum*) vers un consommateur primaire (*Manduca sexta*). Ferry et al. (2009) ont démontré que le biofilm et les bivalves sont les organismes qui accumulent le plus les NP dans un mésocosme reconstituant des conditions estuariennes. Ces résultats ont nourri notre réflexion pour ajouter l'étude de la voie alimentaire en tant que vecteur de la contamination par des NP afin d'accroître la pertinence écologique de notre travail.

La pertinence écologique passe aussi par le choix d'une dose appropriée et réaliste. Comme cela a été présenté dans le chapitre 2, dans de nombreux travaux focalisés sur la toxicité des NP, les auteurs ont choisi des doses d'expositions fortes dépassant dans certains cas le mg.L^{-1} . Il est possible que des contaminations accidentelles aboutissent à la présence de fortes concentrations dans l'environnement, mais elles seront vraisemblablement gérées différemment (nettoyage ou isolement de zones contaminées) des contaminations venant de la libération continue de faibles doses de NP qui font l'objet d'études concernant la gestion du risque. Nous avons donc souhaité travailler avec des doses correspondantes à une pollution

chronique par les NP, susceptibles d'être retrouvées dans des environnements contaminés par des NP. En l'absence de technique fiable pour la quantification des NP dans l'environnement, les seules données présentes dans la littérature sont issues de modèles mathématiques (Gottschalk et al. 2009; Tiede et al. 2009). En l'absence de données chiffrées, la concentration testée ($10 \mu\text{g Ag L}^{-1}$) a été choisie compte tenu de la concentration maximale en Ag total ($8,9 \mu\text{g L}^{-1}$ dans la baie de Galveston, Texas) rapportée dans la littérature (Eisler 2007). A titre d'exemple, des concentrations de 0.06 à $2.9 \text{ mg d'Ag. L}^{-1}$ ont été signalées dans les zones intertidales (cité dans Wood et al. 2004). De plus, les données de la littérature proposent un rôle prépondérant de la libération d'argent sous forme soluble dans l'eau de mer (Cf chapitre 1). L'Ag issu des NP est donc susceptible d'être retrouvé sous forme soluble dans l'environnement.

Les problématiques abordées dans ce chapitre sont les suivantes:

- Quel est le comportement des Ag NP dans l'eau de mer prenant en compte l'effet des ligands potentiels libérés par les organismes ? Est-ce que les NP se dissolvent dans l'eau de mer ?
- Comment la forme physico-chimique (soluble ou nanoparticulaire) influence-t-elle la bioaccumulation d'Ag chez *S. plana* ?
- Quelle est l'influence de la voie d'exposition (par l'eau ou par l'alimentation) sur l'accumulation et les effets des Ag NP sur *S. plana* ?
- Est-ce que l'exposition à des doses réalistes d'Ag NP peut engendrer des réponses observables et éventuellement utilisables pour la gestion du risque associé aux NP ?

**Publication 3 : Behavioural and biochemical
responses of the endobenthic bivalve
Scrobicularia plana to silver nanoparticles in
seawater and microalgal food.**

Behavioural and biochemical responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food.

Pierre-Emmanuel Buffet^{a,b}, Jin-Fen Pan^{a,g}, Laurence Poirier^a, Claude Amiard-Triquet^{a*}, Jean-Claude Amiard^a, Pierre Gaudin^a, Christine Risso-de Faverney^e, Marielle Guibbolini^e, Douglas Gilliland^f, Eugenia Valsami-Jones^c, Catherine Mouneyrac^{a,b}

^aLUNAM Université, Université de Nantes, MMS, 9, rue Bias BP53508, 44035 Nantes Cedex 1, France;

^bInstitut de Biologie et Ecologie Appliquée, CEREAs, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 01, France;

^cDepartment of Mineralogy, Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK;

^dLaboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France;

^eUniversité de Nice-Sophia Antipolis, EA 4228 ECOMERS, Faculté des Sciences, Parc Valrose, BP 71, 06108 Nice, Cedex 2, France;

^fInstitute For Health and Consumer Protection European Commission - DG JRC Via E. Fermi I-21027 Ispra (VA) Italy;

^gCollege of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China.

* Corresponding author: LUNAM Université, Université de Nantes, MMS, 9, rue Bias BP53508, 44035 Nantes Cedex 1, France. PH: +33251125676, FX: +33251125679.

E-mail: Claude.Amiard-Triquet@univ-nantes.fr

Abstract

Because of their bactericidal effects, Ag nanoparticles (AgNPs) have promising industrial development but could lead to potential ecological risks. The aim of this study was to examine the uptake and effect of silver (soluble or as lactate AgNPs of 40 nm) at low concentrations ($10\mu\text{g L}^{-1}$) in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* exposed, for 14 days, directly (water) or via the diet (microalgae). The stability of AgNPs in seawater was examined using Dynamic Light Scattering. Release of soluble Ag from AgNPs in the experimental media was quantified by using Diffusive Gradient in Thin film. The bioaccumulation of Ag in bivalves was measured by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Behavioural and biochemical biomarkers were determined in bivalves. Aggregation of AgNPs and the release of soluble Ag from AgNPs were observed in the experimental media. For both forms of Ag, bioaccumulation was much more important for waterborne than for dietary exposure. The response of oxidative stress biomarkers (catalase, glutathion S-transferase, superoxide dismutase) was more important after dietary than waterborne exposure to Ag (soluble and NPs). These defences were relatively efficient since they led to a lack of response of damage biomarkers. Burrowing was not affected for bivalves exposed directly or through the diet to both Ag forms but feeding behaviour was impaired after 10 days of dietary exposure. Since no differences of responses to Ag either soluble or nanoparticulate were observed, it seems that labile Ag released from AgNPs was mainly responsible for the observed toxicity.

Keywords: Ag nanoparticles, Diet, Behaviour, Biomarkers, Oxidative stress, *Scrobicularia plana*.

Introduction

Because of their bactericidal effects, AgNPs have a promising future in a large range of commercial and industrial applications. Despite their advantages, their widespread use, could lead to potential ecological risks (Klaine et al., 2008). In seawater, nanoparticles are generally agglomerated, favoring deposition onto the sediment surface; thus benthic organisms may be at higher risk of exposure (e.g. Keller et al., 2010). *Scrobicularia plana* is an endobenthic bivalve which has a key role in the structure and functioning of estuarine and coastal ecosystems. *S. plana* is an essential vector for the trophic transfer of metals from microalgae (phytoplanktonic but moreover epibenthic) and sediment to wading birds and economically important species (flat fishes, crustaceans) as shown for mercury (Coelho et al., 2008). *S. plana* can interfere with the biogeochemical cycles of both nutrients and contaminants as a

consequence of its bioturbation activity. In addition, it is a useful species for the determination of a number of biomarkers either biochemical or behavioural (e.g. Solé et al., 2009; Boldina-Cosqueric et al., 2010).

Most of the standardized ecotoxicity tests are based on contamination through water or sediments but do not take into account the dietary source. It is now recognized that the uptake of metals from the diet is a significant route for their entry into marine animals (Wang, 2002), especially for particle-associated metals (Brown and Luoma, 1995). In the case of NPs, the study of bioaccumulation resulting feeding on NPs is just beginning (Croteau et al., 2011; Dybowska et al., 2011). Although some particles could perhaps be taken up across the epithelium of the gill, mantle and labial palps, the major route for internal exposure and potential effects is via capture and ingestion (Ward and Kach, 2009). The toxicity of metal NPs may be due either to their specific physical characteristics as NPs or to the specific toxicity of metals released from NPs in environmental conditions or within the gut and tissues of organisms. Thus several authors have compared biological effects induced by soluble Ag or AgNPs (Griffitt et al., 2008; Navarro et al., 2008). A review by Fabrega et al. (2011) shows that little research has been done on AgNPs in aquatic invertebrates. Mussels *Mytilus edulis* exposed to radiolabelled Ag added to seawater in a free-ionic phase and as AgNPs showed an important uptake and a similar Ag distribution with maximum concentrations in the digestive gland (Zuykov et al., 2011). In the oyster (*Crassostrea virginica*) adverse effects of AgNPs were observed on embryonic development and lysosomal integrity in adults despite the induction of metallothioneins (MTs) observed in both stages (Ringwood et al., 2010).

Oxidative stress is recognized as one of the most common effects of nanotoxicity (Klaine et al., 2008). Thus antioxidant defences (catalase CAT, superoxide dismutase SOD, glutathion S-transferase GST) are of particular interest when assessing the effect of NPs whereas thiobarbituric acid reactive substances TBARS are able to reveal if this protective effect is overwhelmed (Regoli et al., 2011). In addition, MTs which are involved in both antioxidant defence and metal detoxification, have been recognized as a useful tool to reveal the presence of bioavailable metals (reviewed in Amiard et al., 2006). Defence against the stress caused by contaminants is energy consuming and lactate dehydrogenase LDH activity is particularly important when a considerable amount of energy is rapidly required (Diamantino et al., 2001).

Cell death by apoptosis is a general biomarker which is expressed in multiple cell systems, conserved phylogenetically, modulated by environmentally relevant levels of chemical contaminants, and indicates a state of stress of organisms (Kiss 2010). Cells that undergo apoptosis can be identified by analyzing the morphological, biochemical, and molecular changes that take place during this universal biological process. The best recognized biochemical hallmark of both early and late stages of apoptosis is the activation of cysteine proteases (caspases). The detection of active caspase-3 in cells and tissues, a key enzyme in execution stage of apoptotic pathway, is an important method used to assess the induction of apoptosis (Abu-Qare et al., 2001; Risso de Faverney et al., 2001; Ahamed et al., 2010).

Acetylcholinesterase activity AChE is a core biomarker of neurotoxicity which interferes with behavioural responses. Behavioural markers are sensitive tools to assess the impact of contaminants at concentrations far below the lethal effect (Amiard-Triquet, 2009).

The aim of the present study was i) to evaluate biochemical and behavioural responses of *S. plana* exposed in the laboratory to Ag in the form of engineered Ag NPs or as soluble Ag at $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, a concentration relatively low compared to those generally used in previous studies reviewed by Fabrega et al. (2011) ; ii) to take into account the mode of exposure either direct to soluble and nanoparticulate Ag in seawater or indirect via food (microalgae, *Nitzschia* sp.) contaminated with both Ag forms. Direct exposure to silver in seawater was chosen because it was difficult to distribute evenly and reliably NPs in a natural sediment medium. *S. plana* as an intra-sedimentary species is able to freely contact with NPs in the aqueous medium. In the field, oxygenated water is flushed through the burrow from time to time, and within the shell, the soft tissues are bathed in pallial fluid which is primarily seawater. Exposure was characterized by using size distribution and dissolution of Ag in the experimental media and Ag bioavailability was confirmed by measuring bioaccumulation.

Material and methods

Chemicals used and particle characterization

AgNP stock suspension stabilized by lactate was obtained from JRC (EC Joint Research Center, Ispra) with the particle size of 40-45 nm. A suspension of Ag NPs (20 mg L^{-1}) was prepared in deionized water (DIW), stored at 20°C and used for testing within one month. Before use, this stock suspension was sonicated for 30 seconds. A stock solution of dissolved pure Ag metal as AgNO_3 (1 g Ag L^{-1} , in 2% HNO_3 w/w) was purchased from Fluka Analytical. All the other chemicals were purchased from Sigma Aldrich. Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the particle size distribution 20 min after they were dispersed in i) analytical grade DIW, ii) seawater used in experiments at $T=0$, iii) seawater from control treatment at $T=2$ where animals stayed during 2 days. Finally, the UV-Visible spectra of each sample were determined to verify the presence of the characteristic plasma resonance bands of AgNPs.

Animal collection and acclimation

Bivalves (*Scrobicularia plana*) were collected by hand from an intertidal mudflat in the Bay of Bourgneuf (1° 59' 04.80'' W, 47° 01' 50.35'' N), located on the West Atlantic coast (France), in June 2010. This site was chosen as a comparatively clean site after previous studies carried out in our laboratory with other bivalves mussels and oysters (Geffard et al., 2004). Animals of the same size (2.2 ± 0.2 cm, 1.40 ± 0.3 g) were selected to avoid a potential influence of this biological factor (Fossi Tankoua et al., 2011). Clams were transported to the laboratory in a cool box. The animals were then allowed to eliminate their gut content and acclimatized, in a temperature controlled room (20°C, temperature measured in the sediment at the time of collection), for 48 h in aerated filtered (0.45 µm) natural seawater.

Exposure protocol

Two experiments were carried out to expose bivalves for 14 days to Ag, either in seawater or in microalgal food.

Waterborne exposure

Bivalves were placed into 2.2 L polypropylene aquaria (12 individuals/tank) filled with 2 L seawater. Three treatments (natural seawater only; soluble Ag: $10 \mu\text{g Ag L}^{-1}$; Ag NPs: $10 \mu\text{g Ag L}^{-1}$) were carried out in a triplicate design in the dark at 20°C. The experimental media (water and NPs) were renewed every other day. Invertebrates remained unfed during the whole experiment. Previous studies carried out in our laboratory have shown that fast for a two weeks period did not induce a significant decrease of the condition index of clams or histopathological changes.

Dietary exposure

S. plana is an alternative deposit-feeder and uses predominantly the biofilm on the surface of mudflats (Hughes, 1969). Thus a microphytobenthic diatom *Nitzschia* sp06-1 (NCC178, from the Nantes Cultures Collection of MMS) was chosen as food. Algae were cultured in flasks (1L) filled with 900 mL Diatom Artificial Medium (DAM) described by Gagneux-Moreaux et al. (2007) without EDTA in order that silver remained bioavailable. Diatoms were exposed for 4 days during exponential growth to DAM only, DAM with soluble silver ($10\mu\text{g Ag L}^{-1}$), DAM with AgNPs ($10\mu\text{g Ag L}^{-1}$). Three replicates were used for each exposure. A preliminary experiment had shown that both soluble silver and AgNPs did not change diatom growth. At day 4, diatoms were gently washed to clean them from DAM and

from any loosely bound silver while keeping the biofilm on the bottom of flasks. The culture medium was replaced by 900 mL filtered seawater and bivalves were introduced (10 individuals/flasks). Three replicates were used for each exposure and were compared with a control treatment without animals. Media were changed every other day, replacing contaminated *Nitzschia* sp. and seawater. Doing so, it may be considered that uptake in bivalves is derived from silver really linked to microalgae since it is needed to use ligands, not only seawater, to provoke the release of metals firmly adsorbed on the outside of the cells (Hassler et al., 2004).

Metal quantification in experimental media

The dissolved fraction of Ag in experimental media was determined by using DGT tools (diffusive gradients in thin films) (Davison and Zhang, 1994). The DGT disc units (2.5 cm diameter) were purchased from DGT Research Ltd. A Chelex-100 resin beads and a diffusive gel with a pore size of about 5 nm were used (open pore diffusive gel). The thickness of gel was 0.82 mm. A filter of 0.14 mm thickness and 0.45 μm pore size covered the gel. For each condition, 6 or 8 DGT units were deployed in the containers respectively with *Nitzschia* sp. or *S. plana* individuals. Levels of Ag accumulated by the DGT units were measured on day 0, 2 and 4 for diatoms exposure and on day 0, 3, 7 and 14 for bivalve exposure (2 DGT units per sampling day). After sampling, DGT units were washed with ultra-pure water (Milli-Q) and placed in 2 mL vials. 1.5 mL of 1 M HNO_3 was added and left for 1 day to elute Ag from the Chelex resin. Silver determination was performed in the 1 M HNO_3 eluent by electrothermal atomic absorption spectrophotometry (EAAS, Varian SpectrAA55 spectrophotometer) with the Zeeman effect for background correction. Mass of metal accumulated (M) by the DGT unit was calculated as follows:

$$M = C_r V_r = C_e (V_g + V_e) / f_e$$

where C_r is the ion concentration in the resin layer, V_r is the total volume of resin, C_e is the Ag concentration in HNO_3 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), V_g and V_e , the volumes of the gel ($0.15\cdot 10^{-3}$ L) and the eluent ($1.5\cdot 10^{-3}$ L) respectively and f_e , the elution factor (0.8).

Metal quantification in biota

Ag bioaccumulation was estimated after 14 days of exposure in soft tissues of bivalves (*S. plana*, $n = 10$ per treatment) separately in the cytosol and the insoluble fraction which were prepared for MTs (see protocol in subsection 2.6). Tissue fractions were digested by heating (90°C) with suprapure HNO_3 . The same digestion procedure was applied to algae (see above 2.3.2). Then, the quantification of Ag was performed by using EAAS. Standard addition analyses were performed in an isomedium and added concentrations of Ag were 3.13 ng mL^{-1} ,

6.25 ng mL⁻¹, 12.5 ng mL⁻¹. All labware were cleaned in 10% nitric acid bath for 24 h and rinsed three times with DIW before use. The accuracy of analyses was checked by internal quality control with a standard reference material (Oyster tissue SRM 1566B, US NIST). The total concentration was recalculated by adding concentrations of Ag in the cytosol and the insoluble fraction.

Biochemical markers

After removing the shells, the soft tissues were immediately stored at -80°C until biochemical analysis. For LDH and MT, measurements were carried out individually (n = 10 per treatment). For GST, CAT, SOD, TBARS, Caspase 3-like (CSP 3-like) and AChE, determinations were carried out on 5 pools of 3 individuals per treatment. GST, CAT, SOD, TBARS, LDH and AChE activities were estimated spectrophotometrically as described previously in Buffet et al. (2011). Since AChE has not been characterized in *S. plana*, it is not clear if only AChE or also pseudocholinesterases are able to hydrolyze the substrate used. However, in the whole paper, the most commonly used abbreviation AChE for cholinesterases was adopted.

CSP 3-like activity was determined by measuring the release of aminotrifluoromethylcoumarin (AFC) from the caspase tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). After homogenization of the pooled soft tissues, the supernatant (S9) fraction was obtained by centrifugation at 9000 g for 30 min at 4°C. An aliquot of S9 was mixed with buffer B (312.5 mM HEPES pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3% CHAPS, 50 AM of DEVD-AFC). The fluorescence of free AFC was measured by using a fluorometer (Safas FLX Xenius, Monaco) at an excitation/emission wavelength of 390/530 nm every 3 min for 45 min. CSP 3-like activities were expressed in pmoles AFC min⁻¹mg⁻¹protein, according to a standard curve obtained from AFC. For MTs, the whole soft tissues of *S. plana* were homogenized then, the cytosolic (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by centrifugation at 30000 g for 30 min at 4°C. An aliquot of the soluble fraction (S1) was heated at 75°C for 15 minutes. Then MTs were isolated by centrifugation (15000 g for 10 minutes at 4 °C) and determined in the supernatant by differential pulse polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al., 2002). The standard addition method was used for calibration with rabbit liver MT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) in the absence of a marine bivalve MT standard.

Behavioural experiments

Burrowing tests were carried out according to the procedure described by Bonnard et al. (2009) after 6 days for direct exposure and 5 days for food exposure. Briefly, 20 bivalves per

condition were tested in two replicated experimental units which consisted of plastic containers filled with 5 cm of sediment freshly collected from their site of origin and topped with 2 L of aerated seawater.

After waterborne exposure, the feeding rate was quantified after 13 days according to the methodology described by Worrall and Widdows (1983) and adapted to our conditions. Algae (*Tetraselmis suecica*) freely swimming in the water column were used at a concentration of 10 000 cells mL⁻¹ in each tank. The concentration of algae not ingested by bivalves was measured after 1 hour.

After dietary exposure, diatoms (*Nitzschia* sp.) lining the bottom of flask were counted in containers with and without bivalves to determine the feeding rate of *S. plana* after 10 days of experiment.

$$CR = Vol \times [\ln(C1) - \ln(C2)] / t \quad (1)$$

where CR is the clearance rate of the clams (mL h⁻¹), C1 is the cell density (cell mL⁻¹) at time 1, C2 is the cell density (cell mL⁻¹) at time 2, t is the time interval of measurement (t2-t1, in h) and Vol is the volume of water (mL). The individual clearance rate was finally calculated from the mean of two replicated measurements for each treatment in triplicate.

Statistical analysis

Percentages of unburrowed individuals were first ln-transformed for linearization, then the regression coefficients of the least-square regression lines were compared using analysis of covariance (ANCOVA). Otherwise, results are presented as mean ± SD. Significant differences were established by using one-way analysis of variance (ANOVA) or non-parametric Mann and Whitney (Mann and Whitney, 1987) comparison tests when normality was not verified and variances of groups were different. The level of significance was established at $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed by using Xlstat pro 7.5.

Results

Fate of Ag nanoparticles in the experimental medium

The DLS size distribution (Fig. 1 A and B) shows that the high salt content of the seawater induces a rapid agglomeration of the particles as seen by the increase in size from 20-40 to greater than 400 nm. The presence of bivalves for 2 days in the experimental medium did not change the size distribution of Ag NPs (data not shown). The loss of individually dispersed particles through aggregation in seawater is also confirmed by the disappearance of

the characteristic plasmon resonance absorption band in the UV-Visible spectra around 390-450 nm (Fig. 1 C and D). Again no influence of bivalves was apparent (data not shown).

The mass of Ag accumulated by DGT units in the culture medium of algae and in the rearing medium of clams is shown in Figure 2A and B. During the 4 days of algal growth, the DGT results (Fig. 2A) showed a release of Ag from Ag NPs, the final level being as high as the level determined in the medium spiked with soluble Ag.

At the end of the laboratory exposure of clams (14 days), the results obtained for DGT exposed to Ag NPs, at a nominal concentration of $10 \mu\text{g Ag L}^{-1}$, demonstrated that the masses of accumulated Ag were similar to those accumulated by DGT units exposed to soluble Ag (respectively: $2.75 \pm 0.18 \text{ ng}$ and $2.15 \pm 0.62 \text{ ng}$) whereas values in controls were very close to the detection limit. This result indicates a small but detectable release of labile Ag from NPs in the medium during the time of experiment (Fig. 2B).

Ag bioaccumulation

After 4 days of algal growth in control or contaminated medium, the concentration of Ag was $0.009 \text{ pg Ag cell}^{-1}$ in control, and respectively 0.29 and $0.64 \text{ pg Ag cell}^{-1}$ in seawater with Ag NPs or soluble Ag. Taking into account the mean quantities of cells ingested by bivalves (see clearance rate in section 3.4 below), it was possible to calculate the total quantity of silver ingested on an average by one bivalve over the whole period of exposure to diatoms contaminated with soluble Ag or AgNPs. These values reached respectively 2.32 ng and 1.33 ng .

The data of silver accumulation in *S. plana* after 14 days waterborne or dietary exposure are shown in Figure 3. In the case of waterborne exposure, a significant increase of bioaccumulation was observed in the cytosolic fraction (S1) of bivalves exposed to both soluble Ag ($209 \pm 59 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) and Ag NPs ($228 \pm 64 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) compared to controls ($26 \pm 9 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$). The insoluble fraction (P1) was proportionally more important than the cytosolic fraction for silver storage but no significant differences occurred between different treatments. In the whole soft tissues, total (S1 + P1) bioaccumulated Ag was significantly higher in bivalves exposed to soluble Ag ($992 \pm 382 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) than in controls ($483 \pm 253 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) whereas the difference was not significant in bivalves exposed to Ag NPs ($753 \pm 467 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$).

In the case of dietary exposure, a significant increase of bioaccumulation was observed in the cytosolic fraction (S1) for bivalves fed diatoms exposed to soluble Ag ($59 \pm 35 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) only compared to controls ($13 \pm 5 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$). The insoluble fraction (P1) was the main compartment for Ag storage but the Ag concentration in this fraction was not significantly

enhanced by dietary exposure to Ag either soluble or as NPs. The same was observed for the whole soft tissues.

Biochemical markers

For both modes of exposure (water or diet), no significant changes were detected for MTs, TBARS, AChE, LDH, and CSP 3-like (Table 1). In the case of CAT, bivalves exposed to waterborne or dietary Ag (soluble and NPs) showed an increased activity. For GST and SOD, activities were significantly increased in bivalves exposed through the diet to both forms of Ag (soluble and NPs).

Behavioural biomarkers

The slope of the linearized data of burrowing tests are indicated in table 1. No significant differences were depicted for bivalves exposed directly (water) or through the diet to soluble Ag and AgNPs compared to controls.

The waterborne exposure of bivalves to soluble Ag or Ag NPs did not induce any change in the feeding rate based on the consumption of the phytoplanktonic microalgae *Tetraselmis suecica* (Fig. 4) The dietary exposure of bivalves to contaminated microphytobenthic algae *Nitzschia* sp. did not induce significant changes of the clearance rate after 4, 6 and 8 days (not shown) whereas after 10 days of exposure, a significant difference ($p < 0.05$) was shown by comparison to controls (Fig. 4).

Discussion

In order to put more ECO in the ECOTOXICOLOGICAL study of AgNPs, the dose of silver tested in the present study is consistently lower than generally used in previous toxicological studies. It remains very important compared to the predicted environmental concentrations modeled by Gottschalk et al. (2009) for surface water. On the other hand in the objective of comparing the toxicity of NP and soluble forms of Ag, the chosen dose is environmentally realistic for the latter. The concentration tested ($10 \mu\text{g Ag L}^{-1}$) was chosen considering the maximum concentration of total silver ($8.9 \mu\text{g L}^{-1}$ in Galveston bay, Texas) recorded in the literature (Eisler, 2007). Silver concentrations of $0.06\text{--}2.9 \mu\text{g L}^{-1}$ have been reported in intertidal areas whereas the US EPA marine criterion value is fixed at $2.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (cited in Wood et al., 2004). On the other hand, bioassays showed that the mean lethal time was > 16 days for *S. plana* exposed to a silver concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Berthet et al., 1992).

Dynamic light scattering (DLS) applied to AgNPs has shown a rapid aggregation of NPs in saline water. Extensive changes in aggregation state may be caused by addition of biological fluids including macromolecules such as polysaccharides and proteins (Fabrega et al., 2011). In the present study, the potential changes induced by compounds released in seawater by living organisms were not confirmed in the presence of bivalves in the experimental medium.

In the seawater constituting the culture medium of *Nitzschia* sp. or the rearing medium of clams *S. plana*, dissolution of Ag NPs was revealed since the labile fractions of Ag increased in both media and at the end of the experiment were as important as the labile fractions determined when soluble Ag was initially added. Studying citrate-stabilized and poly(vinylpyrrolidone)-stabilized AgNPs, Kittler et al. (2010) have shown that in some cases, NPs release up to 90% of their weight. These authors highlighted that the rate and degree of dissolution depended on the functionalization as well as on the storage mode. Salinity can have an effect on dissolved silver release (Liu and Hurt, 2010). In freshwater, Ag binds strongly to surfaces in low ionic strength water and precipitate as AgCl(s) if traces of chloride are present in the medium. Instead of precipitating, in estuarine and marine environment in the presence of high chloride content, chlorocomplexation of Ag favours the retention of at least some Ag in dissolved forms as AgCl_2^- , Ag^+ , Ag^- (Ward and Krammer, 2002; Ferguson and Hogstrand, 1998). In addition to chlorides, Ag is known to react strongly with sulfide and organic matter (Levard et al., 2012).

The formation of stable chlorocomplex favour dispersal of dissolved Ag available to biota (Luoma et al., 1995). Mechanisms of Ag NPs bioaccumulation in aquatic organisms have been recently reviewed (Fabrega et al., 2011). These authors mention uptake of Ag NPs revealed by transmission electron microscopy in zebrafish embryos and bacteria. Ag-chlorocomplexes play an important role in Ag accumulation via the direct pathway making Ag the strongest accumulated trace metal for some marine bivalves (Lanceleur et al., 2011). Soluble Ag is easily incorporated in marine bivalves including *Scrobicularia plana* (Berthet et al. 1992). In the present study, waterborne exposure clearly induced a significant bioaccumulation of Ag in the cytosolic fraction of soft tissues whatever the initial form of Ag (soluble Ag or Ag NP). Because the insoluble fraction is the major sink of bioaccumulated Ag (Berthet et al. 1992) the newly bioaccumulated metal was concealed in this initial store. Indeed, the initial concentration of Ag in controls were relatively low compared to data reported in Eisler (2010). The total Ag concentration in the soft tissues of control specimens was $483 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$ that is consistently lower than concentrations in *S. plana* from contaminated sites ($800\text{-}1200 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$ recalculated from data expressed in $\text{mg.kg}^{-1} \text{ dw}$ by Eisler, 2010). These values are of the same order of magnitude as those determined in the Ag treatments (753 and $992 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$ on an average for exposure to soluble and Ag NPs respectively). Level as high as $37000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$ being reached exceptionally (recalculated after Eisler, 2010). The tissue distribution of Ag was similar after dietary exposure and a

significant enhancement of bioaccumulated Ag was only observed into the cytosolic fraction from specimens fed diatoms exposed to soluble Ag. Again, this lack of a clear response is attributable to the limited uptake of Ag associated with algal food. In clams, such small quantities are within the individual variations of Ag concentrations in the whole soft tissues. However, the role of algal food as a vector of Ag transfer on longer term must not be neglected since Ag assimilation efficiency may be relatively high, varying from 20% to 70% depending on both phytoplankton and bivalve species (Ng et al., 2005).

For most of the studied biomarkers, no effect of Ag was observed considering either soluble or nanoparticulate forms and both of the modes of exposure (water and food). However, these biomarkers were proven previously as relatively responsive in situations of moderate stress. Indeed, in field studies, AChE has been shown as one of the most responsive biomarkers in *S. plana* (Solé et al., 2009; Boldina-Cosqueric et al., 2010). GST was also shown as sensitive enough to reveal the presence of stressors in estuarine and coastal areas in *S. plana* and another tellinid bivalve *Donax trunculus* (Boldina-Cosqueric et al., 2010; Tlili et al., 2010). An impairment of burrowing behaviour was also revealed in *S. plana* from French polluted estuaries despite the induction of another biomarker of defence MT (Boldina-Cosqueric et al., 2010). In experimental studies dealing with the ecotoxicity of CuO NPs, CAT, GST and SOD activities were induced in response to oxidative stress (Buffet et al., 2011), one of the most common effects associated with NPs (Klaine et al., 2008). In agreement with these findings, several biomarkers of defense were activated in the presence of both soluble and AgNPs, namely CAT, GST and SOD in *S. plana*. These mechanisms of defence may be relatively efficient considering the lack of response of markers of damage (TBARS, AChE, LDH, and CSP 3-like). On the other hand, MT was not induced in any condition of exposure tested in the present study, whereas it was in the case of exposure to CuO NPs (Buffet et al., 2011). Similarly, the synthesis of MT in green mussels *Perna viridis*, was not induced by Ag exposure (Wang, 2002). This absence of response is not surprising since Ag was shown as the less potent MT inducer among a set of metals (Cu>Zn>Cd>Ni>Ag) (Barka et al., 2001). For behaviour, impairments were observed in the bivalve *S. plana*, only for feeding behaviour after dietary exposure to algae exposed to both forms of Ag.

The response of biomarkers of defence (GST, CAT, SOD) in *S. plana* was more important after dietary than after waterborne exposure to Ag (soluble Ag or Ag NPs) despite a lower level of bioaccumulated Ag. However, previous studies underlined the fact that no direct relationships exist between total bioaccumulation and toxicity (Berthet et al., 1992). Indeed, an important fraction of silver may be detoxified under insoluble forms. In addition, these authors have shown differences in the physico-chemical forms of storage of cytosolic Ag in the bivalve *Crassostrea gigas* according to the route of exposure (food or water). Ag was stored in proteins belonging to different classes of molecular masses with likely differential susceptibility to toxic effects of Ag. An indirect evidence of differences in the nature of Ag stores is provided by differences in Ag efflux depending on the routes of

exposure in *S. plana*: Ag was lost faster following uptake from the dissolved phase compared to dietary Ag (Amiard et al., 1978). Moreover, it is recognized that Ag complexation contribute to the reduction of Ag toxicity compared with the Ag⁺ form (Luoma et al., 1995; Levard et al., 2011). Differences in toxicity observed between waterborne exposure and dietary exposure could be explained also by transformation of Ag NPs by algae. Navarro et al. (2008) have suggested that Ag⁺ formation occurs at the algal interface or in the exposure medium upon interaction with secreted algal products.

Conclusion

The present work contributes to the debate about the nanotoxicity of NPs themselves or labile Ag dissociated from the nanoparticles. A study involving several biological models (zebrafish, daphnids, microalgae) exposed to AgNPs has shown that the role of dissolved metal part was minor in observed toxicity (Griffitt et al., 2008). On the other hand, studies of the relative toxicity of Ag NPs and Ag as nitrate salt to the freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* have demonstrated the determinant role of soluble Ag in the observed toxicity resulting from AgNP exposure (Navarro et al., 2008). Similarly, soluble Ag was the primary cause of the observed toxicity of AgNPs in *Daphnia magna* (Zhao and Wang, 2012). Our own results with marine bivalves are in agreement with these observations since no differences of responses to Ag either initially soluble or nanoparticulate were shown. This is consistent with the detectable release of labile Ag from NPs in the exposure medium. In oyster embryos, it remains unknown whether the toxicity and gene expression responses were due to a nano effect or to dissolved Ag toxicity (Ringwood et al., 2010). Thus several questions remain incompletely answered and further investigations focusing on the mechanism driving nanomaterial dissolution and toxicity in seawater are needed.

Acknowledgements Warm thanks are due to Michele Roméo for her role in the implementation of this piece of work. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° [214478], project name NanoReTox. This work was supported by a scholarship from the Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications (FFCSA) and the Région Pays de la Loire, France while the second author visiting the University of Nantes.

References

- Abu-Qare, A.W., Abou-Donia, M.B., 2001. Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev* 4, 313-332.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J., 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Tox. Appl. Pharm.* 242, 263-269.
- Amiard, J-C., 1978. ^{110m}Ag Silver contamination mechanisms in a marine benthic food chain: Effects of contamination mechanisms on radionuclide elimination. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 34, 215-225.
- Amiard, J-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioural disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87-110.
- Barka, S., Pavillon, J-F., Amiard, J-C., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 128, 479-493.
- Berthet, B., Amiard, J-C., Amiard-Triquet, C., Martoja, R., Jeantet, A-Y., 1992. Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in Bivalve Molluscs: ecotoxicological and health consequences. *Sci. Tot. Environ.* 125, 97-122.
- Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J-C., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B., Berthet, B., 2010. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotox. Environ. Saf.* 73, 1733-1741.
- Bonnard, M., Romeo, M., Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of copper on the burrowing behaviour of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 11-26.
- Brown, C.L., Luoma, S.N., 1995. Use of the euryhaline bivalve *Potamocorbula amurensis* as a biosentinel species to assess trace metal contamination in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124, 129-142.

- Buffet P-E., Fossi Tankoua, O., 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.
- Coelho, J.P., Nunes, M., Dolbeth, M., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Pardal, M.A., 2008. The role of two sediment-dwelling invertebrates on the mercury transfer from sediments to the estuarine trophic web. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 78, 505-12.
- Croteau, M-N., Dybowska, A., Luoma, S.N., Valsami-jones, E., 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology*. 5, 79-90.
- Davison, W., Zhang, H., 1994. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*. 367, 545-548
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate deshydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*. 45, 553-560.
- Dybowska, A.D., Croteau, M-N., Misra, S.K., Berhanu, D., Luoma, S.N., Christian, P., O'Brien, P., Valsami-Jones, E., 2011. Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environ. Poll.* 159, 266-273.
- Eisler, R., 2007. *Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals*. Elsevier Science Ltd, Oxford.
- Eisler, R., 2010. *Compendium of Trace Metals and Marine Biota*. Vol 1 plant and invertebrates. Chapt 6. Molluscs. pp 143-397.
- Fabrega, J., Luoma, S., Tyler, C., Galloway, T., Lead, J., 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517-531.
- Ferguson, E.A., Hogstrand C., 1998. Acute silver toxicity to seawater-acclimated rainbow trout: Influence of salinity on toxicity and silver speciation. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 589-593.
- 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. Int.* 18, 1253-1263.

- Gagneux-Moreaux, S., Moreau, C., Gonzalez, J-L., Cosson, R.P., 2007. Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae J. Appl. Phycol. 5, 549-556.
- Geffard, A., Jeantet, A.Y., Amiard J.C., Le Pennec, M., Balland Dufrancais, C. & Amiard Triquet, C., 2004. Comparative study of metal handling strategies in bivalves *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*: a multidisciplinary approach. J. mar. biol. Ass. U.K. 84, 641-650.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1972-1978.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environ. Sci. Technol. 43, 9216-9222.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. Limnol. Oceanogr. Methods. 2, 237-247.
- Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. J. Mar. Biol. Ass. U. K. **49**, 805-823.
- Keller, A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H., Cherr, G., Cardinale, B., Miller, B., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962-1967.
- Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. Apoptosis. 15, 313-321.
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M., 2010. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. Chem. Mater. 22, 4548-4554.
- 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. 9, 1825-1851.
- Lanceleur, L., Schâfer, J., Chiffoleau, J.F., Blanc, G., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M., Audry, S., 2011. Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial-estuarine continuum- Evidence of changing silver sources. Chemosphere. 85, 1299-1305.
- Levard, C., Michel, F.M., Wang, Y., Choi, Y., Eng, P., Brown, G.E. Jr., 2011. Probing Ag nanoparticle surface oxidation in contact with (in)organics: an X-ray scattering and fluorescence yield approach. J. Synchrotron. Radiat. 18, 871-878.

- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G.V., Brown, G.E., 2012. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914.
- Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2169-2175.
- Luoma, S.N., Ho, Y.B., Bryan, G.W., 1995. Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 44-54.
- Mann, H.B. and Whitney, D.R., 1947. On a test whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.* 18, 50-60.
- 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 *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225-242.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959-8964.
- Ng, TY-T., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Amiard, J-C., Wang, W-X., 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 299, 179-191.
- Regoli, F., Benedetti, M., Giuliani, M.E., 2011. Antioxidant defenses and acquisition of tolerance to chemical stress. In *Tolerance to environmental contaminants*, Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S., Roméo, M., Eds. CRC Press: Boca Raton, FL, pp 153-173
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L., 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 69, suppl., 1 S49-51.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Rahmani, R., 2001. Toxic effects of wastewaters collected on upstream and downstream sites of a purification station in cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Arch. of Environ. Pollut. and Toxicol.* 41, 129-141.
- 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.
- Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Linking changes at subindividual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere.* 81, 692-700.

- Wang, W-X., 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. Mar. Ecol. Prog. Ser. 243, 295-309.
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension feeding bivalves. Mar. Environ. Res. 68, 137-42.
- Ward, T.J. and Kramer, J.R., 2002. Silver speciation during chronic toxicity tests with the mysid, *Americamysis bahia*. Comp. Biochem. and Physiol. Part C. 133, 75-86.
- Wood, C.M., McDonald, M.D., Walker, P., Grosell, M., Barimo, J.F., Playle, R.C., Walsh, P.J., 2004. Bioavailability of silver and its relationship to ionoregulation and silver speciation across a range of salinities in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). Aquatic. Tox. 70, 137-157.
- Worrall, C.M., Widdows, J., 1983. Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. Mar. Ecol. Prog. Ser. 12, 281-287.
- Zuykov, M., Pelletier, E., Demers, S., 2011. Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 71, 17-21.
- Zhao, C-M., Wang, W-X., Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. Nanotoxicology. 4, 361-370.

Table 1. Slope of burrowing tests and biochemical biomarker data in the whole soft tissues of *S. plana* from control, exposed to soluble Ag and exposed to Ag NPs. Values with different superscripts correspond to significant differences ($p < 0.05$). * Slopes of burrowing tests were obtained after ln transformation of the raw data (unburrowed animals depending on the time).

Biomarkers		<i>S. plana</i> (water exposure)			<i>S. plana</i> (food exposure)		
		Control	Soluble Ag	Ag NPs	Control	Soluble Ag	Ag NPs
Behaviour	Slope obtained from burrowing tests*	-0.0094 ^a	-0.0097 ^a	-0.0103 ^a	-0.0141 ^a	-0.0136 ^a	-0.0154 ^a
Defense	CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	69 (4) ^a	103 (1) ^b	99 (13) ^b	56 (5) ^a	112 (16) ^b	108 (15) ^b
	GST ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	186 (21) ^a	196 (14) ^a	191 (34) ^a	136 (13) ^a	246 (18) ^b	225 (29) ^b
	SOD (U mg^{-1} protein)	62 (14) ^a	59 (9) ^a	60 (16) ^a	42 (1) ^a	72 (8) ^b	67 (3) ^b
	MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ tissues)	1453 (281) ^a	1627 (259) ^a	1663 (419) ^a	1120 (298) ^a	1172 (395) ^a	1204 (347) ^a
	LDH ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	13 (4) ^a	14 (5) ^a	16 (8) ^a	26 (7) ^a	25 (4) ^a	25 (6) ^a
Damage	TBARS (nmol MDA mg^{-1} protein)	0.60 (0.03) ^a	0.45 (0.02) ^a	0.47 (0.06) ^a	0.39 (0.01) ^a	0.57 (0.05) ^a	0.54 (0.07) ^a
	AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	28 (4) ^a	22 (3) ^a	28 (4) ^a	22 (7) ^a	27 (5) ^a	25 (3) ^a
	CSP-3 like ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	1.31 (0.13) ^a	1.16 (0.04) ^a	1.28 (0.18) ^a	1.38 (0.12) ^a	1.95 (0.23) ^a	2.52 (0.73) ^a

Figure captions

Fig. 1 Size distribution (A) of AgNPs in Deionized water (DIW) and size evolution of Ag NPs in seawater (B). Plasmon resonance absorption band in the UV-Visible spectra in DIW (C) and seawater (D)

Fig. 2 Mean mass (and standard deviation) of Ag accumulated (ng) by DGT units (n = 6 for diatoms and 8 for clams) during the time of exposure. A Culture medium for algae; B Seawater of the rearing medium of clams

Fig. 3 Bioaccumulated concentrations of Ag in the whole soft tissues of clams after 14 days of waterborne or dietary exposure to soluble or nanoparticulate forms. Bars with different superscripts correspond to significant differences (Mann and Whitney, $p < 0.05$)

Fig. 4 Consumption of microalgae by clams after waterborne or dietary exposure to soluble or nanoparticulate Ag at day 13 and day 10 respectively. Bars with different superscripts correspond to significant differences (Mann and Whitney, $p < 0.05$)

Fig. 1

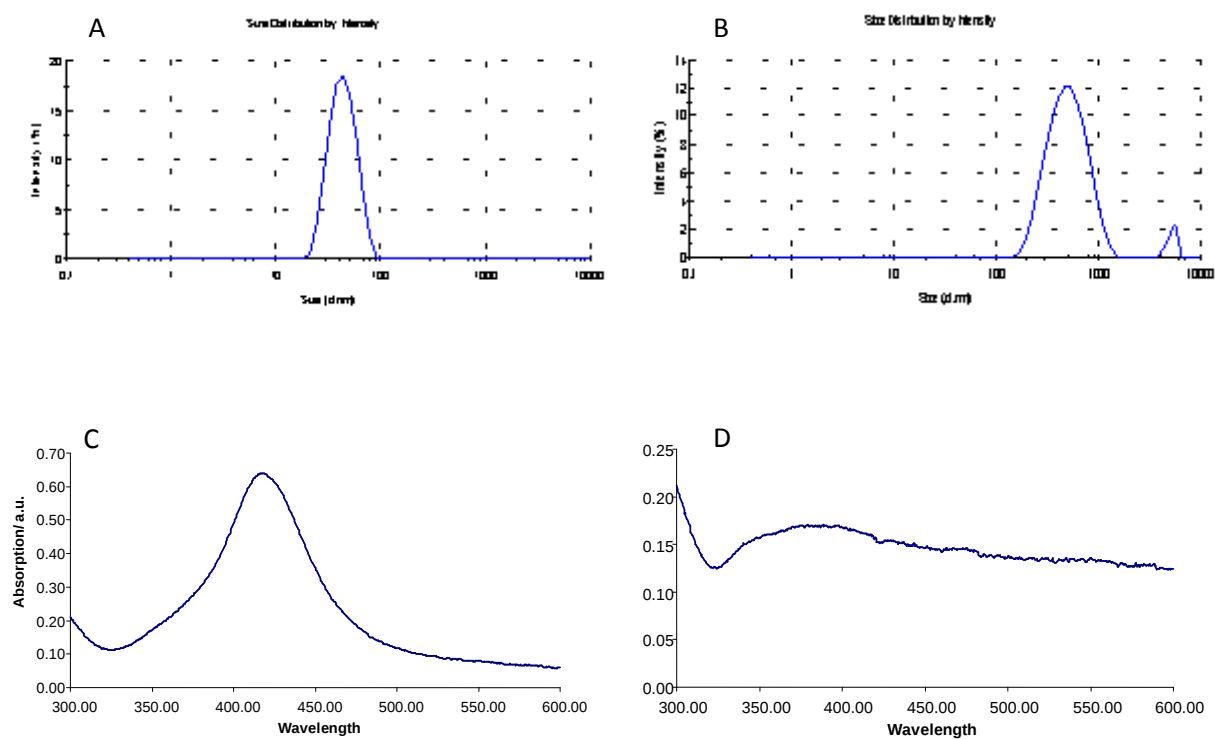


Fig. 2

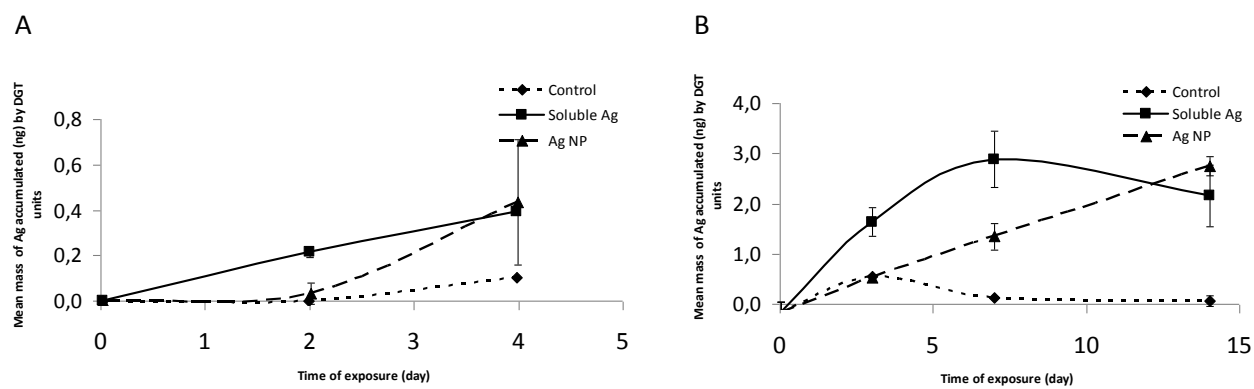


Fig. 3

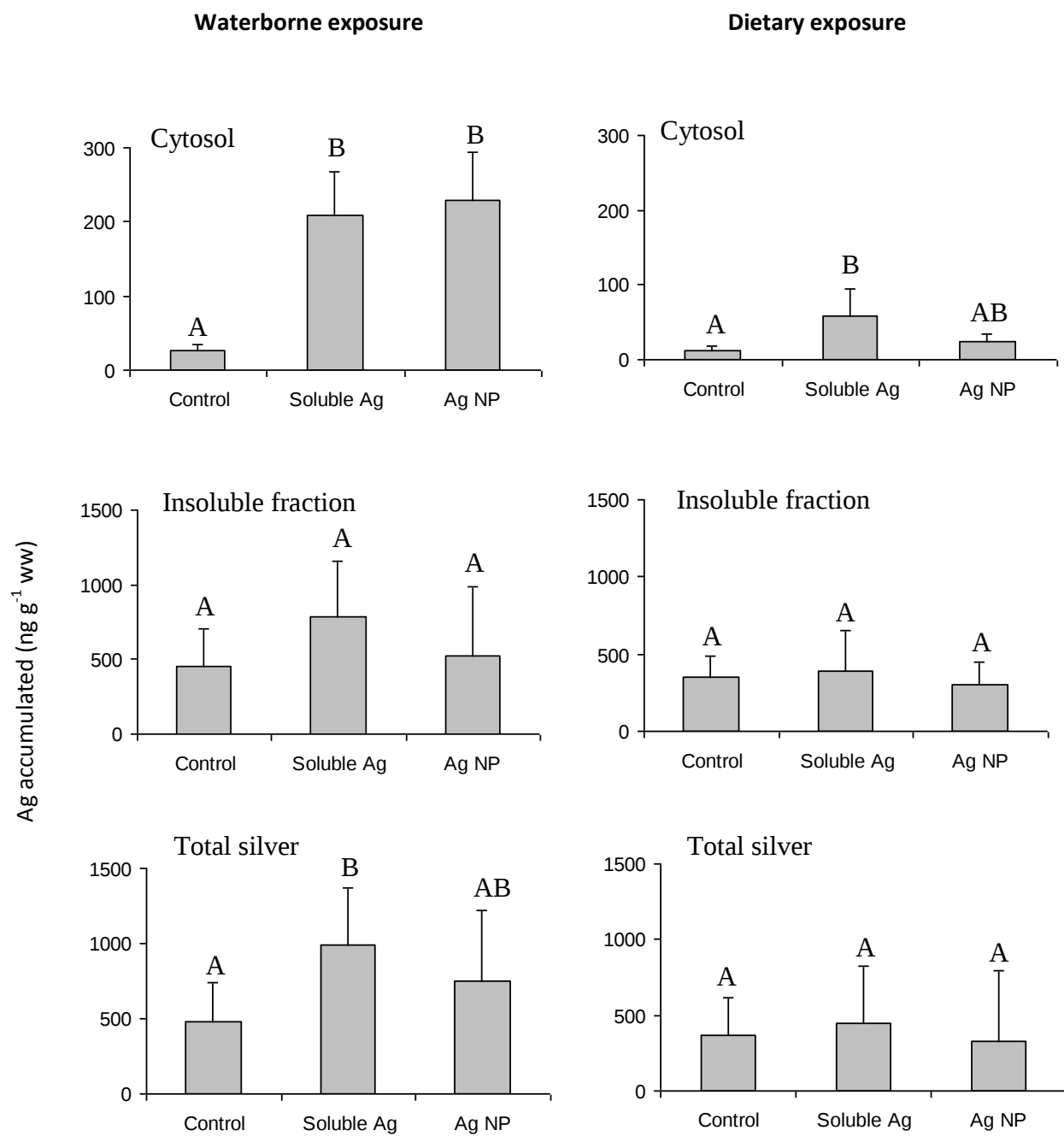
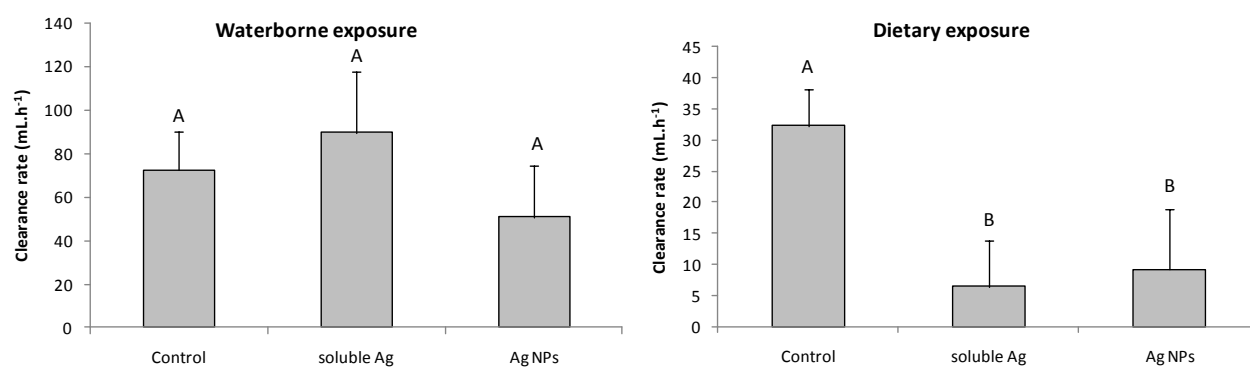


Fig. 4



2. Résultats complémentaires

Une expérimentation sur les effets des Ag NP sur *Hediste diversicolor* a été réalisée mais ne fait pas l'objet de la publication précédente. Cependant les résultats des réponses biochimiques et comportementales sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10). Le protocole d'exposition des annélides est le suivant:

Exposition via l'eau: Les annélides ont été placés individuellement dans des béciers en plastique de 100 ml remplis avec 50 ml d'eau de mer. Trois traitements (eau de mer naturelle sans contamination; Ag soluble: 10 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$; Ag NP: 10 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$) ont été réalisés en triplicat dans l'obscurité. Les milieux d'exposition (eau et NP) ont été renouvelés tous les deux jours pendant 14 jours. Les invertébrés n'ont pas été nourris pendant l'expérience. Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que le jeûne pendant deux semaines n'induit pas de diminution significative de l'indice de condition ou de changements histopathologiques.

Exposition par l'alimentation: Des morceaux d'annélides exposés à l'Ag soluble, aux Ag NP ou des morceaux de vers issus des contrôles de l'expérience d'exposition dans l'eau (voir ci-dessus), ont été utilisés en tant que source de nourriture comme décrit dans une précédente étude (Rainbow et al. 2006) et adaptée à nos conditions. Puisque les mâchoires de polychaetes peuvent contenir de fortes concentrations de métaux (Bryan et Gibbs 1980), seuls les corps des vers ont été utilisés comme sources de nourriture pendant les essais. Des auteurs ont montré que les écarts entre les concentrations en métaux dans les différents segments le long du corps ne varient pas significativement (Rainbow et al. 2006). Les pièces de vers (environ 0,2 cm de long) ont été congelées et utilisées comme vecteur de la contamination tous les deux jours.

Tableau 10 : Bioaccumulation et réponses des biomarqueurs biochimiques et comportementaux chez *H. diversicolor* exposés à l'Ag sous forme soluble ou nanoparticulaire par la colonne d'eau ou par l'alimentation. Les lettres différentes en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$)

Ag	<i>Hediste diversicolor</i>					
	Exposition par l'eau			Exposition par la nourriture		
	Contrôle	Ag soluble	AgNP	Contrôle	Ag soluble	AgNP
Bioaccumulation (ng/g pf)	51 ± 21 ^A	387 ± 292 ^B	279 ± 170 ^B	70 ± 39 ^A	295 ± 233 ^B	227 ± 232 ^{A,B}
Enfouissement (pente)	-0,4606 ^A	-0,2595 ^B	-0,3028 ^B	-0,6704 ^A	-0,238 ^B	-0,2745 ^B
Alimentation (larves consommées/h)	88 ± 14	85 ± 18	85 ± 14	80 ± 18	79 ± 24	83 ± 20
CAT (μmol/min/g ww)	776 ± 47 ^A	1141 ± 123 ^B	1138 ± 74 ^B	573 ± 39	733 ± 166	619 ± 7
GST (nmol/min/g ww)	1437 ± 60	1351 ± 47	1279 ± 46	1312 ± 169	931 ± 74	1525 ± 347
SOD (U SOD/g ww)	819 ± 32	853 ± 96	976 ± 141	825 ± 37	505 ± 65	786 ± 138
LDH (nmol/min/mg prot)	182 ± 55 ^A	211 ± 51 ^A	257 ± 65 ^B	176 ± 45 ^A	267 ± 85 ^B	277 ± 158 ^A
TBARS (nmol/g wet w)	9,9 ± 0,9 ^{AB}	11,8 ± 1,0 ^A	7,4 ± 0,8 ^B	11,5 ± 1,7	11,0 ± 0,9	8,0 ± 1,9
AChE (nmol/min/g ww)	834 ± 84	968 ± 72	942 ± 108	813 ± 172	511 ± 80	1075 ± 249
CSP (nmol/min/g ww)	23 ± 3 ^A	41 ± 3 ^B	43 ± 3 ^B	26 ± 2 ^A	72 ± 9 ^B	47 ± 8 ^A

Les annélides ont accumulé significativement l'Ag par les deux voies d'exposition (eau et nourriture) et pour les deux formes d'Ag (soluble et nanoparticulaire) à l'exception des animaux exposés aux Ag NP par l'alimentation où la variation mesurée n'est pas significative (seule une tendance apparaît). Le comportement d'enfouissement a été altéré chez les annélides exposés aux deux formes d'Ag et quel que soit le mode d'exposition. Une induction des activités CAT et CSP a été mesurée chez les animaux exposés aux deux formes d'Ag par la colonne d'eau. L'activité LDH a été significativement augmentée chez les annélides exposés aux Ag NP dans l'eau. Les activités LDH et CSP ont été significativement augmentées chez les annélides exposés par la voie alimentaire à l'Ag soluble uniquement et une tendance à l'augmentation a été observée chez les animaux exposés aux Ag NP.

3. Conclusion et perspectives

Le résultat le plus marquant concernant le comportement des Ag NP est leur agglomération puis leur dissolution dans l'eau de mer. Ainsi la libération d'Ag labile provenant des NP et mesurée par les DGT atteint un niveau similaire à celui mesuré dans l'exposition à l'Ag soluble. En accord avec ce résultat, les réponses biochimiques et comportementales mesurées chez les invertébrés sont globalement similaires dans les deux traitements (Ag nanoparticulaire ou soluble). Le second résultat d'intérêt concerne l'effet de la voie d'exposition sur la toxicité de l'Ag. En effet, un plus grand nombre de biomarqueurs ont répondu chez les bivalves exposés à l'Ag par la voie alimentaire (prise alimentaire, CAT, GST, SOD) par rapport à ceux exposés par l'eau où seule une induction de CAT a été détectée (Tableau 11). Chez les annélides les réponses des biomarqueurs sont plus contrastées et aucune tendance concernant l'effet de la voie d'exposition ne semble être détectée.

Tableau 11 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez *S. plana* et *H. diversicolor* selon la forme de l'Ag et la voie d'exposition (colonne d'eau ou alimentation). Induction significative du biomarqueur ↗, inhibition significative du biomarqueur ↘, tendance à l'induction du biomarqueur (non significatif) ↗, pas de variation significative =.

Ag	Scrobicularia plana			
	Exposition par l'eau		Exposition par la nourriture	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement	=	=	=	=
Alimentation	=	=		
MT	=	=	=	=
CAT				
GST	=	=		
SOD	=	=		
LDH	=	=	=	=
TBARS	=	=	=	=
AChE	=	=	=	=
CSP	=	=	=	=

Ag	Hediste diversicolor			
	Exposition par l'eau		Exposition par la nourriture	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement				
Alimentation	=	=	=	=
MT	Nd	Nd	Nd	Nd
CAT			=	=
GST	=	=	=	=
SOD	=	=	=	=
LDH	=			
TBARS	=	=	=	=
AChE	=	=	=	=
CSP				

Il est possible que les effets de l'Ag plus importants chez les bivalves exposés via les algues (*Nitzschia sp*) contaminées résultent de la modification de la spéciation de l'Ag dans l'eau de mer. En effet, il a été démontré que l'Ag existe dans le milieu marin sous forme de chlorocomplexes (Luoma et al. 1995). Cette forme est généralement moins toxique que la forme Ag⁺. La spéciation de l'Ag pourrait être modifiée par les substances issues du métabolisme des algues (formation d'Ag⁺) dans l'eau de mer comme proposé par Navarro et al.

(2008). Chez les annélides, les effets observés sont moins importants en réponse à l'exposition par la voie alimentaire. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce résultat est le phénomène de détoxification qui a pu avoir lieu entre la proie et le prédateur tel qu'il est décrit dans l'article sur le transfert de détoxification dans la chaîne alimentaire par Nott et Nicolaidou (1990). Ces travaux soulignent le nombre d'interactions possibles (stratégie d'alimentation du prédateur, type de proie) qui affectent la stabilité et les effets des NP dans l'eau de mer comme cela a été démontré pour des métaux traces (Ng et al. 2005; Rainbow et al. 2011).

Chapitre 5 : Réponses biochimiques et comportementales des invertébrés *Scrobicularia plana* et *Hediste diversicolor* exposés aux quantum dots de sulfure de cadmium par la colonne d'eau ou l'alimentation.

1. Contexte de l'étude

Ce chapitre est complémentaire du précédent et apporte des éléments de comparaison importants dans la compréhension des facteurs qui influencent la toxicité des NP. Nous avons souligné dans l'étude précédente que la toxicité des Ag NP est largement modulée par la transformation des NP dans l'eau de mer. Nos résultats ont montré une libération d'Ag labile aussi importante que la concentration mesurée pour l'exposition à l'Ag soluble. L'argent labile peut ensuite être transformé via la formation de chlorocomplexes avec les chlorures présents dans le milieu. Il en résulte que la toxicité provient principalement des effets des complexes formés dans l'eau de mer. Le phénomène est très compliqué et peut également être modifié par la présence du biofilm qui peut influencer le devenir des NP dans l'eau de mer. Dans ce chapitre nous allons étudier le devenir des CdS NP dans l'eau de mer et les effets qu'ils produisent sur les organismes lorsque ceux-ci sont exposés par la colonne d'eau ou par leur alimentation.

Le choix de la concentration d'exposition en Cd a été soumis à la même problématique que pour l'Ag. A l'heure actuelle, il n'y a pas de données environnementales concernant les concentrations en Cd NP que l'on peut trouver dans les milieux marins et côtiers. Afin de définir une dose environnementale, nous nous sommes appuyés sur les données provenant des études sur les métaux traces. Pour le Cd sous forme soluble, les effets sublétaux pour les animaux marins ont été enregistrés pour des concentrations de Cd ne dépassant pas $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Eisler 1985). A ces doses, les effets sont observables au niveau sub-individuel (biochimique) par des variations d'activités d'enzymatiques et au niveau individuel par la diminution de la croissance, la perturbation des voies respiratoires et la perturbation des contractions musculaires (Eisler 1985). Nous avons donc exposé *S. plana* et *H. diversicolor* à une concentration de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ directement par l'eau mais aussi par la voie alimentaire. Ce choix nous permettra également de comparer les résultats de l'exposition de nos organismes avec ceux observés dans le chapitre 4 pour l'exposition aux Ag NP étant donné que ces métaux ont des masses molaires très semblables.

Les problématiques abordées dans ce chapitre sont les suivantes:

- Quel est le comportement des CdS NP dans l'eau de mer en prenant en compte l'effet des ligands potentiels libérés par les organismes ? Est-ce que ces NP se dissolvent dans l'eau de mer ?
- Comment la forme physico-chimique (soluble ou nanoparticulaire) influence-t-elle la bioaccumulation du Cd chez *S. plana* et *H. diversicolor* ?
- Quelle est l'influence de la voie d'exposition (par l'eau ou par l'alimentation) sur l'accumulation et les effets des CdS NP sur *S. plana* et *H. diversicolor* ?
- Est-ce que l'exposition à de faibles concentrations de CdS NP peut engendrer des réponses observables et éventuellement utilisables pour la gestion du risque associé aux NP ?

**Publication 4 : Behavioural and biochemical
responses of the endobenthic invertebrates
Scrobicularia plana and *Hediste diversicolor* to
cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs):
Waterborne and dietary exposure**

Behavioural and biochemical responses of the endobenthic invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure

Pierre-Emmanuel Buffet^{a,b}, Laurence Poirier^a, Aurore Zalouk-Vergnoux^a, Sandrine Charles^c, Jean-Claude Amiard^a, Pierre Gaudin^a, Christine Risso-de Faverney^e, Marielle Guibbolini^e, Douglas Gilliland^f, Hanane Perrein-Ettajani^{a,b}, Eugenia Valsami-Jones^d, Catherine Mouneyrac^{a,b,*}

^aUniversité de Nantes, MMS, EA2160, Faculté de pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France,

^bInstitut de Biologie et Ecologie Appliquée, CEREa, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 01, France,

^cLaboratoire de biométrie et biologie évolutive, Université de Lyon 1, 43 bd du 11 novembre 1918, Villeurbanne ^dDepartment of Mineralogy, Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK,

^eUniversité de Nice-Sophia Antipolis, EA 4228 ECOMERS, Faculté des Sciences, Parc Valrose, BP 71, 06108 Nice, Cedex 2, France,

^fInstitute For Health and Consumer Protection European Commission - DG JRC Via E. Fermi I-21027 Ispra (VA) Italy

* Corresponding author: Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CEREa, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 01, France. PH: +33241816645, FX: +33241816674.

E-mail: catherine.mouneyrac@uco.fr

Introduction

Quantum dots (QDs) are a special class of nanoparticles (NPs) raising attention of scientists because of their properties of absorbance and fluorescence and their ability to act as semiconductors (reviewed in Hardman 2006). Cd based QDs such as Cd sulfide (CdS), Cd selenide (CdSe) and Cd telluride (CdTe), are the most studied nanoxide semiconductors and are widely used in the fields of medical imaging to tagging and sensing (Wiesner et Bottero 2007; Gagné et al. 2010), electronic and solar energies (Gagné et al. 2010) and they are at the forefront of nano-biotechnology research (Chen et al. 2012). The increased production of such nanomaterials (<http://www.mknano.com>) could lead to potential ecological risks resulting in their release into the environment especially aquatic environments which are the final destination of contaminants including NPs (Kaegi et al. 2008). In seawater, NPs are generally aggregated or agglomerated, favoring deposition onto the sediment surface (Klaine et al. 2008), mixing with the biofilm but also moving in the water column with the tidal cycle and marine currents. Under these conditions, biota will be exposed to NPs via different routes of exposure including food, which need to be investigated to evaluate NPs ecotoxicity.

In order to investigate putative ecological impairments caused by engineered nanoparticles (ENPs), the selection of species playing a key role in the structure and functioning of ecosystems and recognized as good models for biomonitoring purposes is necessary (Berthet et al. in Amiard-Triquet et al. 2011). *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* have a key role in the structure and functioning of both estuarine and coastal ecosystems and they contribute to the biogeochemical cycles of nutrients and contaminants during bioturbation activity. Invertebrates are essential vectors of metal transfer from environmental compartments (water, food or sediment) to higher trophic levels (Cattaneo et al. 2009) like wading birds and economically important species. In addition, bivalves are described as a unique target group for NP toxicity (Canesi et al. 2012) pumping large amount of particles from the water column or adsorbed onto the food and sediment surfaces. Worms using detritus and micro-organisms as food ingest concomitantly important volumes of sediment, leading to a potential exposure to NPs residing in sediments as proposed by Galloway et al. (2010). Thus, the bivalve *S. plana* and the ragworm *H. diversicolor* are good candidates for ecotoxicological studies about NPs (Buffet et al. 2011).

Recently, intense concerns appear concerning QDs toxicity and the role of dissolution of Cd NPs in the toxicity. *In vitro* studies show that the release of soluble Cd contributes to toxicity at least partly (Li et al. 2009; Su et al. 2010) but cytotoxicity cannot be attributed only to the toxic effect of free Cd²⁺ (Cho et al. 2007). Experimental studies in freshwater have shown that Cd-based NPs are rapidly aggregated or agglomerated after 24h, then a fraction of Cd (respectively 14 and 15%) is released in water (Gagné et al. 2008; Peyrot et al. 2009). However, Cd QDs exert higher toxicity compared to the same amounts of soluble Cd on bacteria and algae, suggesting a specific nano-effect (Priester et al. 2009; Domingos et al. 2011). Oxidative stress and generation of reactive oxygen substances (ROS) seem to be the

main source of toxicity of Cd-based NPs in cells (Lovrić et al. 2005; Li et al. 2009), in the freshwater cnidarian polyp *Hydra vulgaris* (Ambrosone et al. 2012), in the freshwater mussel *Elliptio complanata* (Gagné et al. 2008; Peyrot et al. 2009), in freshwater fish *Gasterosteus aculeatus* (Sanders et al. 2008) and in *Oncorhynchus mykiss* (Gagné et al. 2010) as previously described in reviews dealing with NPs (Klaine et al. 2008). Some authors suggest that mechanisms of defense against oxidant stress represent good biomarkers to evaluate the early responses to nanometals in aquatic systems (Tedesco et al. 2010; Buffet et al. 2011; Gomes et al. 2011). In spite of an increasing research effort about Cd-based NPs, most of these studies focus on cell toxicity whereas only few of them deal *in vivo* toxicity.

A strategy to assess NP effects is the use of biomarker tools, such as biochemical markers of defense involved in the response against oxidative stress (metallothionein: MT; catalase: CAT; glutathione-S-transferase: GST; superoxide dismutase: SOD) and biomarkers of damages resulting from the production of reactive oxidative substances (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS; caspase: CSP). Louis et al. (2010) have shown that metabolism is modified when fish *Oncorhynchus mykiss* are exposed to Cd-based NPs due to the additional energy need for defense mechanisms. Thus, lactate dehydrogenase activity (LDH) is particularly important when a considerable amount of energy is quickly required (Diamantino et al. 2001). In parallel to molecular and biochemical biomarkers, behavioural biomarkers are sensitive tools to assess the impact of contaminants and they are particularly relevant from an ecological point of view since they can alter species survival in avoidance against predators, foraging and reproduction (Amiard-Triquet 2009). Behaviour can be linked to the energy pathway since burrowing and feeding are particularly energy consuming. Burrowing and feeding tests have shown impairments due to the ecotoxicity of metal NPs in *S. plana* and *H. diversicolor* (Buffet et al. 2011; Pan et al. 2012). The Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) is an equipment that improves behavioural analysis by registering online movements of the organisms in test chambers (Gerhardt et Schmidt 2002) once they are already burrowed.

The aim of this work was to evaluate the effects of low concentration ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) compared to those generally used in previous studies (Lovrić et al. 2005; Gagné et al. 2008; Peyrot et al. 2009; Gagné et al. 2010; Su et al. 2010), compared to soluble Cd, on marine bivalves and ragworms exposed to these contaminants directly in seawater or via their food (respectively microalgae and pieces of worms). NPs were characterized in deionized water (DIW) and seawater, then the exposure of animals to soluble Cd was evaluated by using passive samplers (diffusive gradient in thin films: DGT) and bioaccumulation was measured in both species. A set of biomarkers at different levels of biological organization (sub-individual and individual) adapted for ecotoxicology studies was chosen to assess the effects of CdS NPs versus soluble Cd. According to our knowledge, this is the first paper about ecotoxicity of CdS QDs in marine organisms dealing with multiple routes of exposure (water and food).

Material and methods

Chemicals used and particle characterization

CdS QDs stock suspension was obtained from JRC (EC Joint Research Center, Ispra) with particle sizes between 5 and 6 nm and a Cd concentration of 700 mg.L⁻¹. NPs were washed using centrifugal ultrafiltration resulting in CdS NPs in pure water with no residual free stabilizer or other soluble impurities. After 5 min of sonication (Ultrasonicator BRANSON B-1200 E2 HF 100 W), a suspension of CdS (20 mg.L⁻¹) was prepared in (DIW). Measurements of size distribution were performed using a ZetaSizer Nano by Malvern in DIW, soft water and seawater.

Animal collection and acclimation

Bivalves and ragworms were collected by hand from an intertidal mudflat in the Bay of Bourgneuf (1° 59' 04.80'' W, 47° 01' 50.35'' N), located on the West Atlantic coast (France). Animals of the same weight (*S. plana*: 2.7 ± 0.5 g, *H. diversicolor*: 0.18 ± 0.07 g) were selected to avoid any potential influence of this biological factor (Tankoua et al. 2011). Clams and ragworms were transported to the laboratory in a cool box. The animals were then allowed to eliminate their gut content and acclimated in a temperature controlled room (15°C, temperature measured in the sediment at the time of collection), for 48 h in aerated filtered (0.45 µm) natural seawater. This acclimation time period was chosen after Poirier et al. (2006) and Burlinsson and Lawrence (2007).

Exposure protocol

Two experiments were carried out to explore the effect of different routes of exposure either in seawater or in food.

Waterborne exposure

Taking into account that intra-sedimentary species are able to freely contact with NPs in the aqueous medium from their burrows, animals were first exposed in seawater. Bivalves were placed into 2.2 L polypropylene aquaria (12 organisms per tank) filled with 2 L seawater whereas ragworms were individually placed in plastic beakers of 100 mL filled with 50 mL of seawater. Three treatments (natural seawater without contamination; soluble Cd: 10 µg Cd L⁻¹; CdS NPs: 10 µg Cd L⁻¹) were carried out in a triplicate design in the dark. The experimental media (water and NPs) were renewed every following day during 14 days. Invertebrates remained unfed during the whole experiment. Previous studies carried out in our laboratory

have shown that even if animals were not fed during two weeks it does not induce a significant decrease of the condition index of clams or histopathological changes of both species.

Dietary exposure

In the second part of this experiment, foods were exposed to soluble Cd and CdS NPs in order to use them as vectors of contaminants. A microphytobenthic diatom *Nitzschia* sp06-1 (NCC178, from the Nantes Cultures Collection of MMS) was chosen as food for *S. plana* because this alternative deposit-feeder predominantly uses the biofilm on the surface of mudflats (Hughes 1969). Algae were cultured in flasks (1 L) filled with 900 mL Diatom Artificial Medium (DAM) described by Gagneux-Moreaux (2007) without EDTA. Diatoms were exposed for 4 days during exponential growth to DAM, DAM with soluble Cd (10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$) and DAM with CdS NPs (10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$). At day 4, diatoms were gently washed to clean them from DAM and from any loosely bound Cd while keeping the biofilm on the bottom of flasks. The culture medium was replaced by 900 mL filtered seawater and bivalves were introduced (10 organisms per flasks). Three replicates were used for each exposure and were compared with a control treatment without animals. Media were changed every following day, renewing contaminated *Nitzschia* sp. and seawater. Since ligand is needed to enhance the release of metals firmly adsorbed on the outside of the cells (Hassler et al. 2004), it may be considered that uptake in bivalves is derived from Cd really linked to microalgae.

For dietary exposure of *H. diversicolor*, we used pieces of ragworms exposed to soluble Cd, CdS NPs or pieces of control worms from the waterborne exposure experiment (see section 2.3.1) as previously described in Rainbow et al. (2006) and adapted to our conditions. Because jaws of nereid polychaetes may contain high concentration of metals (Bryan et Gibbs 1980), only bodies of decapitated worms were used as a food source. In addition, Rainbow et al. (2006) have shown that variations between metal concentrations of different sections of body along the length of the worm behind the head didn't changed significantly. Pieces of worms (about 0.2 cm long) were frozen and used as food package every two days.

Metal quantification in experimental media

The dissolved fraction of Cd in experimental media was determined by using DGT tools (diffusive gradients in thin films) (Davison et Zhang 1994). The DGT disc units (2.5 cm diameter) were purchased from DGT Research Ltd. A Chelex-100 resin beads and a diffusive gel with a pore size of about 5 nm were used (open pore diffusive gel). The thickness of gel was 0.82 mm. A filter of 0.14 mm thickness and 0.45 μm pore size covered the gel. For each

condition, 6 or 8 DGT units were deployed in the containers respectively with *Nitzschia* sp. or *S. plana* individuals. Levels of Cd accumulated by the DGT units were measured on day 0, 2 and 4 for diatoms exposure and on day 0, 3, 7 and 14 for bivalve exposure (2 DGT units per sampling day). After sampling, DGT units were washed with ultra-pure water (Milli-Q) and placed in 2 mL vials. 1.5 mL of 1 M HNO₃ was added and left for 1 day to elute Cd from the Chelex resin. Cd determination was performed in the 1 M HNO₃ eluent by electrothermal atomic absorption spectrophotometry (EAAS, Varian SpectrAA55 spectrophotometer) with the Zeeman Effect for background correction. Mass of metal accumulated (M) by the DGT unit was calculated as previously described in Buffet et al. (2011).

Metal quantification in biota

Cd bioaccumulation was estimated after 14 days of exposure in the whole soft tissues of bivalves (n = 10 per treatment) and in ragworms (n = 10 per treatment). Tissue fractions were digested by heating (90°C) with Aqua Regia (HCl/ HNO₃:75/25). Then, the quantification of Cd was performed by using EAAS. All labware were cleaned in 10% nitric acid bath for 24 h and rinsed three times with DIW before use. The accuracy of analyses was checked by internal quality control with a standard reference material (Mussel tissue SRM 2976, National Institute of Standards and Technology).

Biochemical markers

After 14 days of exposure, whole soft tissues of animals were immediately stored at -80°C until biochemical analysis. For LDH and MT, measurements were carried out on individuals (n = 10 per treatment). Methodologies applied for the determination of biochemical markers (MT, GST, LDH, CAT, SOD, TBARS, AChE) have been described in details by Buffet et al. (2011). MT analysis was performed only in *S. plana* since MT is not relevant as a biomarker in *H. diversicolor* (Poirier et al. 2006). Briefly, MTs were quantified by Differential Pulse Polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al. 2002) after partial purification in soft tissue homogenates. Lipid peroxidation was estimated by the formation of TBARS, quantified by reference to MDA absorbance at 530 nm (Halliwell et Gutteridge 1985). For GST, CAT, SOD, AChE and LDH activities, tissues were homogenised and enzyme activities were determined spectrophotometrically in the enzyme fraction (S9 fraction) as described by Habig et al. (1974). for GST, Claiborne (1985) for CAT, McCord and Fridovich (1969) for SOD, Galgani and Bocquene (1991) for AChE, Diamantino et al. (2001) for LDH. CSP 3-like activity was determined by measuring the release of aminotrifluoromethylcoumarin (AFC) from the caspase tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). After homogenization of the pooled soft tissues, an aliquot of S9 was mixed with buffer B (312.5 mM HEPES pH 7.5,

31.25% sucrose, 0.3% CHAPS, 50 AM of DEVD-AFC). The fluorescence of free AFC was measured by using a fluorometer (Safas FLX Xenius, Monaco) at an excitation/emission wavelength of 390/530 nm every 3 min for 45 min. CSP 3-like activities were expressed in pmoles AFC min⁻¹mg⁻¹protein, according to a standard curve obtained from AFC.

All the results were expressed with reference to protein concentrations determined according to Bradford (1976). For MT, LDH determinations were carried out individually (n = 10 per species and per treatment, control and Cd either soluble or as CdS NPs). For GST, CAT, SOD, TBARS, AChE and CSP-3 like determinations were carried out on pools of 2-4 individuals per species (*H. diversicolor*, *S. plana*) depending on the weight of tissues.

Behavioural experiments

Burrowing tests were carried out according to the procedure described by Bonnard et al. (2009) after 7 or 8 days to waterborne exposure of *H. diversicolor* and *S. plana*, respectively and 6 or 7 days to dietary exposure of *H. diversicolor* and *S. plana* respectively. Briefly, 20 bivalves per condition were tested in two replicated experimental units which consisted of plastic containers filled with 5 cm of sediment freshly collected from their site of origin and topped with 2 L of aerated seawater.

Automated behavioural toxicity tests were carried out with the Multifreshwater Biomonitor (MFB) after 7 and 14 days of waterborne or dietary exposure of both species. One top of each sensor-chamber was closed with mesh and the other one opened in order to visually identify movements of animals. For *H. diversicolor*, movements inducing signals within the range of 0.5 Hz were identified as undulation, and signals between 1.0 and 2.0 Hz indicate head movements and feeding activity. For *S. plana*, movements inducing signals within the range of 0.5 Hz were identified as burrowing activities with foot movements, and signals between 1.0 and 2.5 Hz indicated feeding and ventilation siphon movements. The sensor chambers were placed vertically in plastic tank with a shallow layer of sediment and topped up with 1 L seawater. The lower half of the chamber was filled with sediment and one individual per chamber (n=7 per treatment) was placed at sediment surface and was allowed to acclimate during 1h before MFB recording started. Then it was performed over 7 hours. The behavioural patterns were examined visually by observing invertebrate movements in combination with the MFB oscilloscope signals. One chamber without organisms was used as control for noise signals.

The feeding rate of both species was quantified after 14 days for both water and food exposures. The feeding rate of *S. plana* was quantified according to the methodology described by Worall and Widdows (1983) and adapted to our conditions. Algae *Tetraselmis suecica* were used as food at a concentration of 10 000 cell mL⁻¹ in each tank (3 tanks per exposure treatment, 12 clams per tank). The concentration of algae not ingested by bivalves

was measured after 1 h. The feeding rate of *H. diversicolor* was quantified according to the methodology described by Moreira et al. (2005). Twenty worms were fed with 100 *Artemia salina* larvae into their individual plastic beakers containing 50 mL of seawater. They were left undisturbed for 1 h, then, the remaining larvae were collected and counted. The results were expressed as the number of larvae ingested per hour per organism.

Statistical analysis

The assumptions of normality and homoscedasticity of all results were evaluated using Shapiro-Wilk and Fisher tests to choose appropriate parametric or non parametric statistics and to compare treatments (controls, soluble Cd and CdS NPs). Significant differences were considered at $p < 0.05$. To compare data from treatments, Mann and Whitney tests were performed on biomarkers data with exception of burrowing tests. Burrowing kinetics statistic analysis were performed on R using a generalized non linear model with α as burrowing rate (h^{-1}):

$$p(t) = e^{-\alpha t}$$

A binomial model B (a,b) was used since α is a binary value (unburrowed/burrowed) with a probability of success and b number of observations:

$$N(t) \sim B\left(\frac{p(t-1) - p(t)}{p(t-1)}, N(t-1)\right)$$

Burrowing kinetic differences were estimated using the Bayesian inference. For each treatment the distribution allow to obtain means and credible interval at $p < 0.05$

Results

Characterization of CdS NPs

Results of characterization of CdS NPs in deionized water (A), after 24h in soft water (B) and after 24h in seawater (C) are depicted in figure 1. Distribution of sizes did not changed dramatically in soft water and seawater with the exception of the formation of few agglomerates or aggregates with size comprised between 100 and 300 nm.

Solubility of CdS NPs in the experimental medium

Fig. 2A and Fig. 2B display the evolution of Cd accumulation by DGT during 15 days of waterborne exposure respectively for *S. plana* and *H. diversicolor*. Fig. 2C is relative to the evolution of Cd accumulation by DGT during 4 days of contaminated culture for *Nitzschia* sp. The results depicted in A, B and C graphs are similar with the highest quantities of labile Cd in the media initially contaminated with Cd²⁺. The quantities of labile Cd in the media initially contaminated with CdS NPs were lower but much more important than those for the control treatments. In that last case, the observed accumulations are small because there is no background Cd source.

Considering CdS NP contamination, the observed Cd accumulation in DGT mean that NPs were partially solubilised in the water of culture and rearing media. Since initial levels of contamination were identical for both sources (Cd as CdS NPs and soluble Cd), it indirectly means that another part was staying under the NP form.

Cadmium bioaccumulation

After 14 days of waterborne exposure, Cd concentrations significantly increased in whole soft tissues of clams and ragworms exposed to soluble Cd (*S. plana*: 290 ± 73 ng.g⁻¹, *H. diversicolor*: 196 ± 71 ng.g⁻¹) and CdS NPs (*S. plana*: 311 ± 52 ng.g⁻¹, *H. diversicolor*: 480 ± 247 ng.g⁻¹) compared to controls (*S. plana*: 31 ± 8 ng.g⁻¹, *H. diversicolor*: 40 ± 20 ng.g⁻¹). Cd concentrations determined in ragworms exposed to CdS NPs were significantly higher than concentrations in animals exposed to soluble Cd.

After 14 days of dietary exposure, Cd levels significantly increased only in tissues of clams exposed to CdS NPs (78 ± 25 ng.g⁻¹) compared to controls (55 ± 17 ng.g⁻¹). No difference was observed in other treatments and for both species.

Biochemical markers

The results of biomarker analysis in *S. plana* are shown in Table 1. Concerning waterborne exposure, CAT, GST and CSP significantly increased in animals from both Cd treatments compared to controls and activities were significantly enhanced in the presence of Cd as NPs than as soluble form, except for CSP. SOD, LDH activities and TBARS levels that were significantly increased only in clams exposed to CdS NPs. Concerning dietary exposure, activities of CAT and CSP significantly increased in clams exposed to both form of Cd compared to controls and GST only in clams exposed to CdS NPs.

The results of biomarker analysis in *H. diversicolor* are shown in Table 2. Concerning waterborne exposure, CAT, GST and CSP significantly increased in animals from both Cd treatments compared to controls and activities were significantly enhanced in the presence of Cd as NPs than as the soluble form, except for CAT. Concerning dietary exposure, CAT and CSP significantly increased in animals from both Cd treatments compared to controls and activities were significantly enhanced in the presence of Cd as NPs than as the soluble form. No significant difference was detected in other species, treatments and routes of exposure for MT and AChE.

Behavioural markers

Results of burrowing test for *S. plana* and *H. diversicolor* exposed to the two forms of Cd in water (respectively A, C) or via the food (B, D) are reported in the Figure 3. The mean rates of burrowed animals and credible interval showed that differences occurred only in clams exposed to Cd via the food. The burrowing kinetic was significantly affected for clams exposed to Cd as NPs compared to controls or Cd as the soluble form. However, no difference between the treatments (soluble Cd and CdS NPs) is detectable.

Significant differences occurring during the MFB analysis in *S. plana* and *H. diversicolor* exposed to Cd are depicted in the figure 4. For bivalves, their behaviour was modified only in the case of waterborne exposition to CdS NPs during 14 days, with a reduction of the frequency (0.5 Hz) corresponding to the foot movements. Concerning ragworms, significant reductions of the frequency corresponding to the body undulation (0.5 Hz) were observed after 7 days of exposition to both forms of Cd compared to controls. The same observation is possible considering animals dietary exposed to CdS NPs compared to controls and soluble Cd treatments.

Results of feeding tests indicate that algae consumptions of clams were significantly reduced after waterborne exposition to both forms of Cd (control: $4960 \pm 386 \text{ cell.h}^{-1}$, soluble Cd: $2347 \pm 652 \text{ cell.h}^{-1}$, CdS NPs: $3300 \pm 859 \text{ cell.h}^{-1}$) and after dietary exposition to CdS NPs ($1008 \pm 460 \text{ cell.h}^{-1}$) only compared with controls ($2847 \pm 971 \text{ cell.h}^{-1}$). No difference (data not shown) was observed considering the feeding of ragworms.

Discussion

It is usually admitted that many NPs tend to aggregate in freshwater and seawater (Klaine et al. 2008), especially when NPs are uncoated with cationic or anionic polymers that prevent them from forming aggregates (Gagné et al. 2010). Louis et al. (2010) have shown that more than 50% of CdTe NPs capped by CdS, with a primarily size between 1-10 nm, formed aggregates above 10 nm in natural freshwater. Gagné et al. (2008) have demonstrated that

CdTe NPs tend to form aggregate of different sizes in water using successive filtration steps. These authors showed that CdTe NPs were mainly aggregated with sizes upper than 450 nm (80%). In our experiment, we have observed the formation of aggregates or agglomerates with sizes between 100 and 300 nm in DIW, soft water and seawater by using DLS. However the majority of CdS NPs kept their nanoscale (1-10 nm) in all media tested in spite of the absence of coating.

In studies of ecotoxicology about Cd NPs, questions concerning the solubility of particles are addressed to evaluate how NP properties contribute to their toxicity (Priester et al. 2009; Domingos et al. 2011). Some authors have previously shown a significant but limited dissolution of Cd-based NPs in freshwater. By using filtrations, Gagné et al. (2008) have demonstrated that 15% of CdTe introduced in freshwater were present in the dissolved phase (including molecular/ionic Cd^{2+}). Domingos et al. (2011) have shown that labile Cd concentrations increased with the concentrations of QDs and with the decrease of pH and Cd^{2+} concentration corresponded to a relatively small proportion of the total Cd in solution, ranging from 0.3% to 21.7%. Ambrosone et al. (2012) have measured also low proportions of dissolved CdTe NPs (12-14%) after 12-24h in freshwater. In the present study, we have determined the labile fraction of Cd in our experimental medium (seawater) occurring with the time of experiment by using passive samplers (DGT). The labile fractions measured in DGT increased linearly with the time of experiment and were very similar in algae culture medium, and animal media. Interestingly, the labile fraction of Cd in DGT from CdS NP exposure aquaria were 2 times lower than the values in DGT from soluble Cd exposure aquaria. These results demonstrated that a significant fraction of CdS NPs (about 50%) remained under the nanoparticulate form. Considering characterization and DGT results together, there is an evidence that a significant fraction of CdS NPs kept the nanoscale during at least 14 days.

In our experiment, invertebrates *S. plana* and *H. diversicolor* have significantly accumulated Cd in both waterborne soluble Cd exposure and waterborne CdS NPs exposure. After dietary exposure, bioaccumulation was not significant except in clams exposed to Cd NPs via algae. Consequently, the assimilation of Cd associated with algal food or pieces of worms seemed to be limited. However, the role of food as a vector of Cd transfer on longer term must not be neglected since assimilation efficiency of metals may be different depending on both phytoplankton and invertebrates species (Ng et al. 2005).

For the two species, CAT and GST activities were the most sensitive biomarkers of defence responding to both Cd treatments (soluble and CdS NPs) and for both waterborne and dietary exposures (except for GST activity in the case of clams dietary exposed to soluble Cd via algal food and worms exposed to both form of Cd). CAT and GST activities were previously demonstrated as sensitive defence biomarkers in other studies dealing with metallic NPs effect on the same species (Buffet et al. 2011; Pan et al. 2012). In addition, in waterborne exposure, inductions of CAT and GST were higher in clams exposed to Cd as NPs compared to the soluble form. GST activity was more enhanced in waterborne exposed to CdS NPs

worms than in animals exposed to soluble Cd. CAT was enhanced in dietary exposed to CdS NPs worms compared to animals exposed to soluble form. These results are in agreement with authors demonstrating a higher toxicity of CdSe and CdTe/CdS NPs compared to soluble Cd (Priester et al. 2009; Domingos et al. 2011). Defence mechanisms seemed to play their role by preventing lipid peroxidation and neurotoxicity since no increase of TBARS concentrations or decrease of AChE activities were observed in the two species, treatments and routes of exposure. However, CSP activities increased for the two species, treatments and routes of exposure compared to controls. CSP induction was higher in worms exposed to NPs compared to other conditions. The cytotoxicity is often related to activation of mitochondria with formation of reactive oxygen species (ROS) and classical apoptosis mechanisms (Cho et al. 2007). These informations suggest that defences (especially CAT and GST involved in the protection against formation of oxidative substances) are not sufficient to prevent the ROS generation and the associated apoptosis mechanism. Since mitochondria represent the major source of ROS production in cells (Gagné et al. 2010) and are the most important organelles for the energy production, it could alter functions at a higher biological level. This hypothesis can be supported since MFB results give access to crucial information in a sensitive and quantitative way concerning behaviour of invertebrates inside sediment. Results indicate that body movements (foot movements of clams and body undulations of worms), particularly energy consuming, were impaired in the two species exposed to CdS NPs (after 7 days for waterborne and dietary exposed ragworms and after 14 days for waterborne exposed clams). This result is in agreement with authors showing that metabolism is modified when fishes are exposed to CdTe NPs capped by CdS due to the additional energy need for defense mechanisms (Louis et al. 2010). These biomarkers are particularly interesting and sensitive for risk assessment and ecological point of view since energy pathway is at base of growth and reproduction.

For clams exposed to CdS NPs via the water, CAT, GST, SOD, LDH and CSP activities were significantly induced whereas only CAT, GST and CSP activities were increased for the exposition to CdS NPs via the food. For ragworms exposed to CdS NPs via the water, CAT, GST and CSP activities were significantly induced whereas only CAT and CSP activities were increased in worms exposed to CdS NPs via the food (CAT, CSP). These responses are probably correlated to Cd accumulated depending on the route of exposure and dietary strategies of each species. The present study is in agreement with other studies about Cd based NPs showing oxidative processes and ROS production as the main consequences of the exposure to Cd based NPs (Cho et al. 2007). The effect of ROS in cells can alter the processes of energy production leading to disturbances of behavior potentially altering higher levels of invertebrates' biology (growth, reproduction). The observed effects are more important for organisms of the two species exposed to CdS NPs compared to animals exposed to soluble Cd. Since an fraction of CdS NPs was not solublized in the experimental media, effects of these NPs cannot be associated only to soluble Cd released from NPs highlighted by DGT results but also to the nanometric size effect as previously seen in human cells exposed to CdTe

(Lovrić et al. 2005; Su et al. 2010) in bacteria exposed to CdSe (Priester et al. 2009) and in fish exposed to CdTe (Gagné et al. 2008).

To our best knowledge, this is the first experiment dealing with ecotoxic effects of CdS NPs in marine species. The present study contributes to the debate about the role of the dissolution of NPs to explain their toxicity. In addition, this experiment demonstrates the potential of passive samplers (DGT) to evaluate the labile fraction released in experimental media. Effects due partly to the nanoparticulate properties were observed in *S. plana* and *H. diversicolor*. Biochemical and behavioural impairments were demonstrated as a consequence of waterborne and dietary exposures. From a risk assessment point of view our findings suggest that low doses of uncoated CdS NPs may pose environmental and health risks.

Acknowledgements. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° [214478], project name NanoReTox.

References

- Ambrosone, A., L. Mattera, V. Marchesano, A. Quarta, A. S. Susa, A. Tino, A. L. Rogach, and C. Tortiglione. 2012. Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials* **33**:1991-2000.
- Amiard-Triquet, C. 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **15**.
- Amiard-Triquet, C., P. S. Rainbow, and M. Roméo, editors. 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton. pp. 265-297
- Bonnard, M., I.-C. Eom, J.-L. Morel, and P. Vasseur. 2009. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50**:60-67.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Bryan, G. W. and P. E. Gibbs. 1980. Metals in nereid polychaetes: the contribution of metals in the jaws to the total body burden. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **60**:641-654.
- Buffet, P.-E., O. F. Tankoua, J.-F. Pan, D. Berhanu, C. Herrenknecht, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, J.-B. Bérard, C. Risso, M. Guibbolini, M. I. Roméo, P. Reip, E. Valsami-Jones, and C. Mouneyrac. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates

- Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* **84**:166-174.
- Burlinson, F. C. and A. J. Lawrence. 2007. Development and validation of a behavioural assay to measure the tolerance of *Hediste diversicolor* to copper. *Environmental Pollution* **145**:274-278.
- Canesi, L., C. Ciacci, R. Fabbri, A. Marcomini, G. Pojana, and G. Gallo. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* **76**:16-21.
- Cattaneo, A., R. Gornati, M. Chiriva-Internati, and G. Bernardini. 2009. Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal* **6**:78-97.
- Chen, N., Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, and C. Fan. 2012. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* **33**:1238-1244.
- Cho, S. J., D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth, and F. M. Winnik. 2007. Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. *Langmuir* **23**:1974-1980.
- Claiborne, A. 1985. Catalase activity. CRC Press Inc. pp. 283–284.
- Davison, W. and H. Zhang. 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* **367**:546-548.
- Diamantino, T. C., E. Almeida, A. M. V. M. Soares, and L. Guilhermino. 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* **45**:553-560.
- Domingos, R. F., D. F. Simon, C. Hauser, and K. J. Wilkinson. 2011. Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* – Nanoparticles or the Free Ions? *Environmental Science & Technology* **45**:7664-7669.
- Gagné, F., J. Auclair, P. Turcotte, M. Fournier, C. Gagnon, S. Sauvé, and C. Blaise. 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* **86**:333-340.
- Gagné, F., M. Fortier, L. Yu, H. L. Osachoff, R. C. Skirrow, G. van Aggelen, C. Gagnon, and M. Fournier. 2010. Immunocompetence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots. *Journal of Environmental Monitoring* **12**:1556-1565.
- Gagneux-Moreaux, S., C. Moreau, J.-L. Gonzalez, and R. Cosson. 2007. Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia*; and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* **19**:549-556.
- Galgani, F. and G. Bocquene. 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* **25**:147-150.

- Galloway, T., C. Lewis, I. Dolciotti, B. D. Johnston, J. Moger, and F. Regoli. 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* **158**:1748-1755.
- Gerhardt, A. and S. Schmidt. 2002. The multispecies freshwater biomonitor a potential new tool for sediment biotests and biomonitoring. *Journal of Soils and Sediments* **2**:67-70.
- Gomes, T., J. P. Pinheiro, I. Cancio, C. G. Pereira, C. Cardoso, and M. J. Bebianno. 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology* **45**:9356-9362.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.
- Halliwell, B. and J. Gutteridge, editors. 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford.
- Hardman, R. 2006. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ health Perspect* **114**:165-172.
- Hassler, C. S., V. I. Slaveykova, and K. J. Wilkinson. 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography-Methods* **2**:237-247.
- Kaegi, R., A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt, and M. Boller. 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* **156**:233-239.
- Klaine, S. J., P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, and J. R. Lead. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:1825-1851.
- Li, K. G., J. T. Chen, S. S. Bai, X. Wen, S. Y. Song, Q. Yu, J. Li, and Y. Q. Wang. 2009. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicology in Vitro* **23**:1007-1013.
- Louis, S., F. Gagne, J. Auclair, P. Turcotte, C. Gagnon, and C. Emond. 2010. The characterisation of the behaviour and gill toxicity of CdS/CdTe quantum dots in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology* **1**:52-69.
- Lovrić, J., S. J. Cho, F. M. Winnik, and D. Maysinger. 2005. Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death. *Chemistry & Biology* **12**:1227-1234.
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **244**:6049-6055.
- Moreira, S. M., M. Moreira-Santos, L. Guilhermino, and R. Ribeiro. 2005. A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**:2010-2018.

- Mouneyrac, C., J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, A. Cottier, P. S. Rainbow, and B. D. Smith. 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **57**:225-242.
- Ng, T. Y.-T., C. Amiard-Triquet, P. S. Rainbow, J. C. Amiard, and W.-X. Wang. 2005. Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* **299**:179-191.
- Pan, J.-F., P.-E. Buffet, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, D. Gilliland, Y. Joubert, P. Pilet, M. Guibbolini, C. Risso de Faverney, M. Roméo, E. Valsami-Jones, and C. Mouneyrac. 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environmental Pollution* **168**:37-43.
- Peyrot, C., C. Gagnon, F. o. Gagné, K. J. Wilkinson, P. Turcotte, and S. b. SauvÃ©. 2009. Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **150**:246-251.
- Poirier, L., B. Berthet, J.-C. Amiard, A.-Y. Jeantet, and C. Amiard-Triquet. 2006. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **86**:71-82.
- Priester, J. H., P. K. Stoimenov, R. E. Mielke, S. M. Webb, C. Ehrhardt, J. P. Zhang, G. D. Stucky, and P. A. Holden. 2009. Effects of Soluble Cadmium Salts Versus CdSe Quantum Dots on the Growth of Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* **43**:2589-2594.
- Rainbow, P. S., L. Poirier, B. D. Smith, K. V. Brix, and S. N. Luoma. 2006. Trophic transfer of trace metals from the polychaete worm *Nereis diversicolor* to polychaetes *Nereis virens* and the decapod crustacean *Palaemonetes varians*. *Marine Ecology Progress Series* **321**:167-181.
- Su, Y., M. Hu, C. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L.-h. Wang, P. Shen, and Q. Huang. 2010. The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties. *Biomaterials* **31**:4829-4834.
- Tankoua, O., P.-E. Buffet, J.-C. Amiard, C. Amiard-Triquet, C. Mouneyrac, and B. Berthet. 2011. Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana*; used in programmes monitoring estuarine quality. *environmental science and pollution research* **18**:1253-1263.
- Tedesco, S., H. Doyle, J. Blasco, G. Redmond, and D. Sheehan. 2010. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* **100**:178-186.
- Wiesner, R. and J.-Y. Bottero, editors. 2007. *Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials*. 540 p.

Worall, C. M. and J. Widdows. 1983. Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. Marine Ecology Progress Series **12**.

Table 1

Biomarkers		<i>S. plana</i> (water exposure)			<i>S. plana</i> (food exposure)		
		Control	Soluble Cd	CdS NPs	Control	Soluble Cd	CdS NPs
Defense	CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	61 (5) ^a	85 (2) ^b	90 (2) ^c	58 (2) ^a	87 (3) ^b	87 (7) ^b
	GST (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	213 (15) ^a	274 (31) ^b	350 (29) ^c	216 (52) ^a	262 (16) ^a	327 (41) ^b
	SOD (U SOD mg ⁻¹ protein)	26 (3) ^a	28 (4) ^a	43 (9) ^b	35 (7) ^a	36 (8) ^a	38 (3) ^a
	MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ tissues)	1956 (198) ^a	2043 (164) ^a	1995 (208) ^a	1982 (364) ^a	1938 (333) ^a	2145 (328) ^a
	LDH (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	19 (5) ^a	18 (6) ^a	32 (7) ^b	18 (8) ^a	15 (6) ^a	19 (9) ^a
Damage	TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein)	0.33 (0.09) ^a	0.25 (0.04) ^a	0.21 (0.07) ^b	0.41 (0.08) ^a	0.50 (0.07) ^a	0.51 (0.06) ^a
	AChE (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	22 (4) ^a	24 (4) ^a	26 (7) ^a	21 (6) ^a	20 (2) ^a	23 (4) ^a
	CSP-3 like (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	1.29 (0.11) ^a	1.89 (0.14) ^b	1.98 (0.18) ^b	1.35 (0.14) ^a	2.15 (0.2) ^b	2.43 (0.31) ^b

Table 2

Biomarkers		<i>H. diversicolor</i> (water exposure)			<i>H. diversicolor</i> (food exposure)		
		Control	Soluble Cd	CdS NPs	Control	Soluble Cd	CdS NPs
Defense	CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	55 (4) ^a	89 (6) ^b	94 (1) ^b	59 (2) ^a	73 (3) ^b	97 (8) ^c
	GST ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	65(8) ^a	88 (7) ^b	127 (14) ^c	70 (24) ^a	80 (7) ^a	91 (15) ^a
	SOD (U SOD $\text{mg}^{-1} \text{protein}$)	60(6) ^a	38(5) ^b	55(3) ^a	43 (5) ^a	45 (3) ^a	43 (12) ^a
	LDH ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	264 (54) ^a	291 (77) ^a	277 (82) ^a	243 (38) ^a	238 (118) ^a	196 (40) ^a
Damage	TBARS ($\text{nmol MDA mg}^{-1} \text{protein}$)	0.50 (0.08) ^a	0.49 (0.10) ^a	0.50 (0.08) ^a	0.48 (0.06) ^a	0.50 (0.04) ^a	0.57 (0.11) ^a
	AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	75 (27) ^a	74 (29) ^a	68 (20) ^a	92 (18) ^a	79 (18) ^a	114 (33) ^a
	CSP-3 like ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	1.24 (0.06) ^a	2.10 (0.08) ^b	2.27 (0.02) ^c	1.21 (0.04) ^a	1.62 (0.04) ^b	2.09 (0.09) ^c

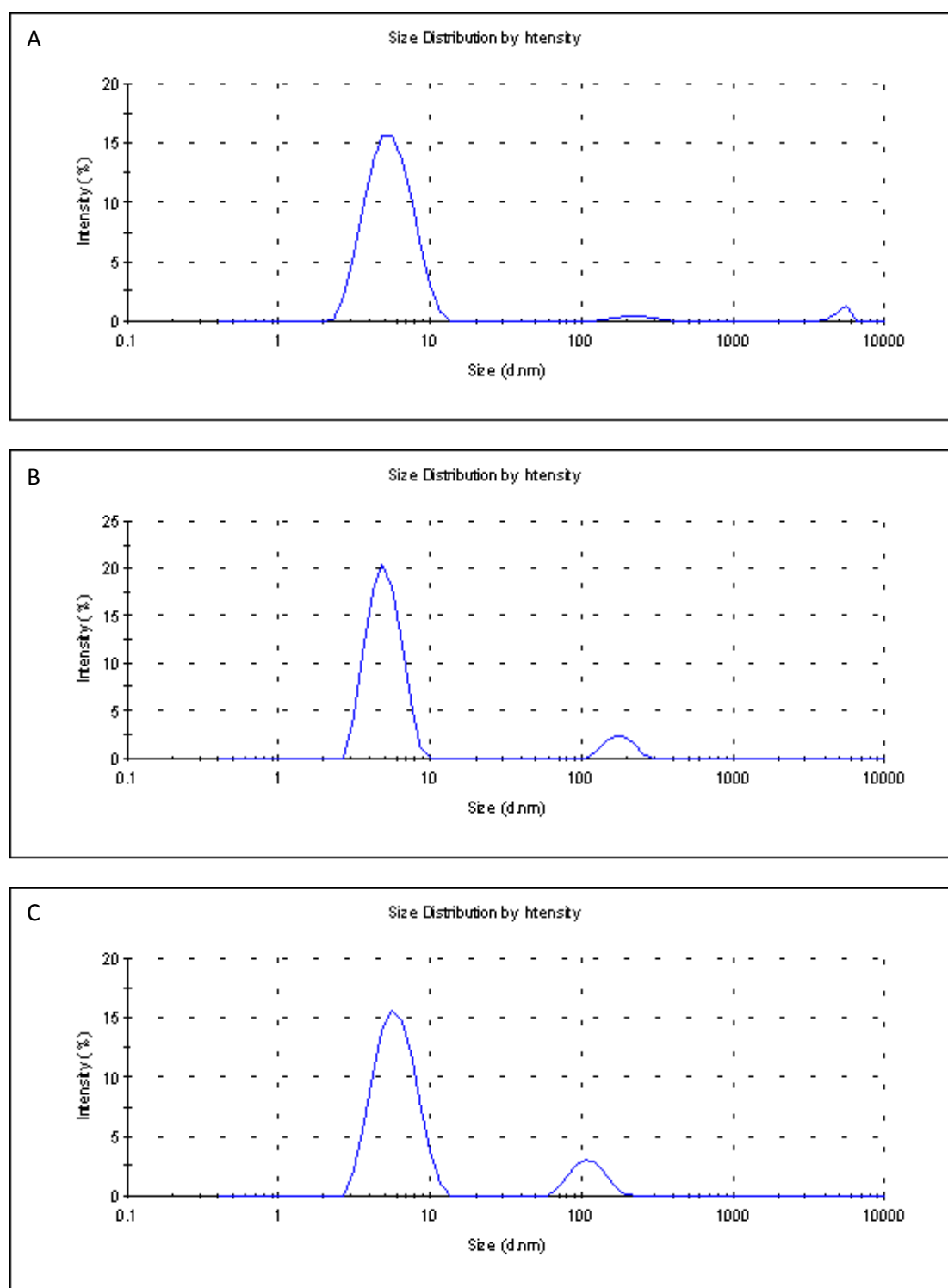
Figure captions

Figure 1 Size distributions of CdS particles after synthesis (A), 24h after dilution with softwater (B), 24h after dilution in seawater (C).

Figure 2 Mean masses of Cd accumulated by DGT units (ng) deployed in water at successive times of exposure. A: the aquaria with *S. plana* and water contamination (n = 3); B: the beakers with *H. diversicolor* and water contamination; C: culture medium of *Nitzschia* sp.

Figure 3 Mean and credible intervals ($p < 0.05$) of the burrowing rate (h^{-1}) estimated in *S. plana* waterborne exposed (A), dietary exposed (C) and *H. diversicolor* waterborne exposed (B), dietary exposed (D).

Figure 4 Mean frequency and standard deviation of signals recorded with Multi Freshwater Biomonitor (MFB) and corresponding to body undulation in *H. diversicolor* after 7d waterborne exposure (A), 7d dietary exposure (B) and foot movement in *S. plana* after 14d waterborne exposure (C).

**Fig. 1**

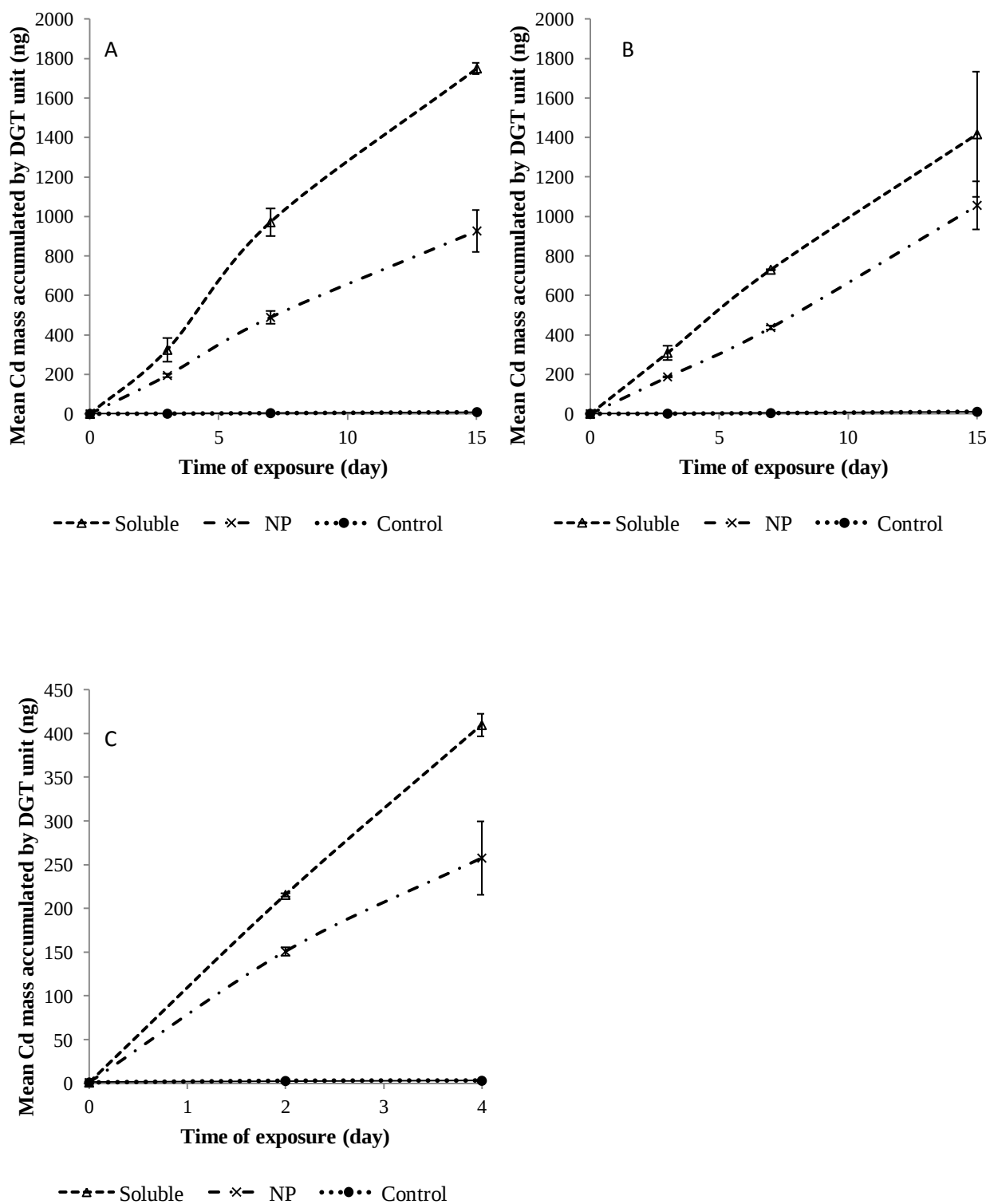


Fig. 2

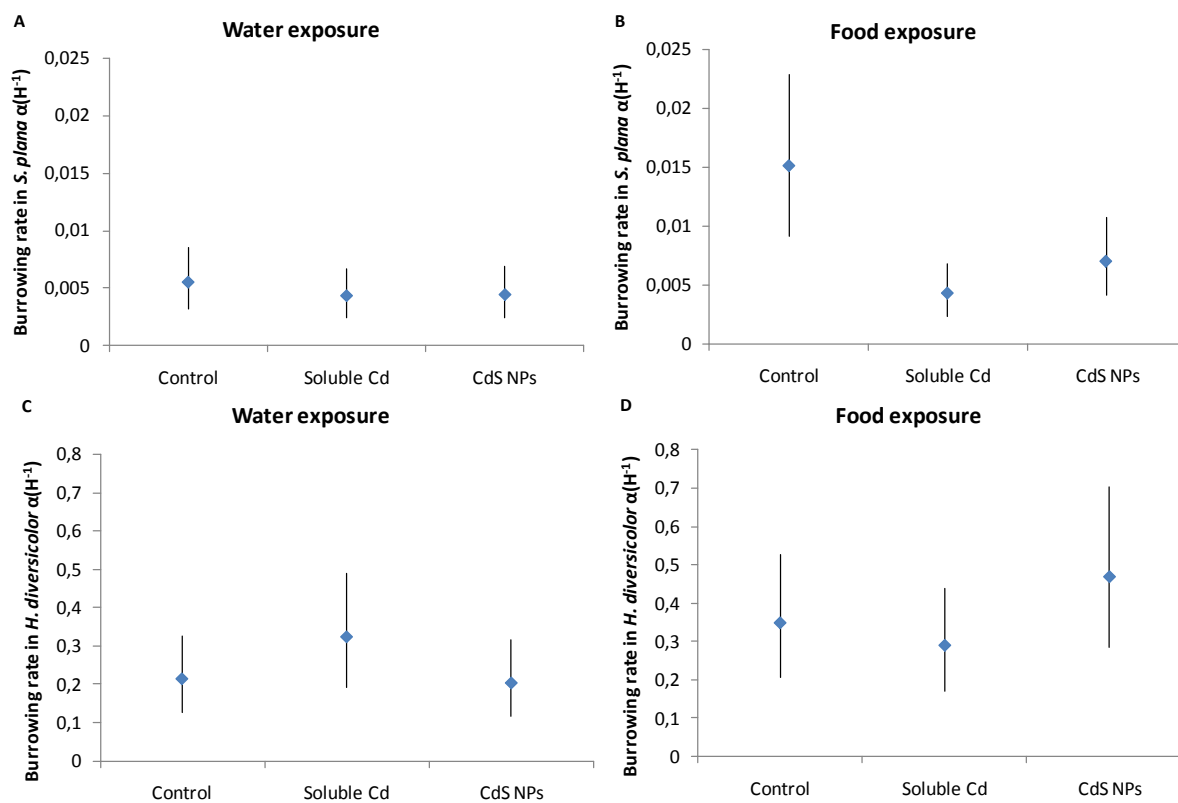


Fig. 3

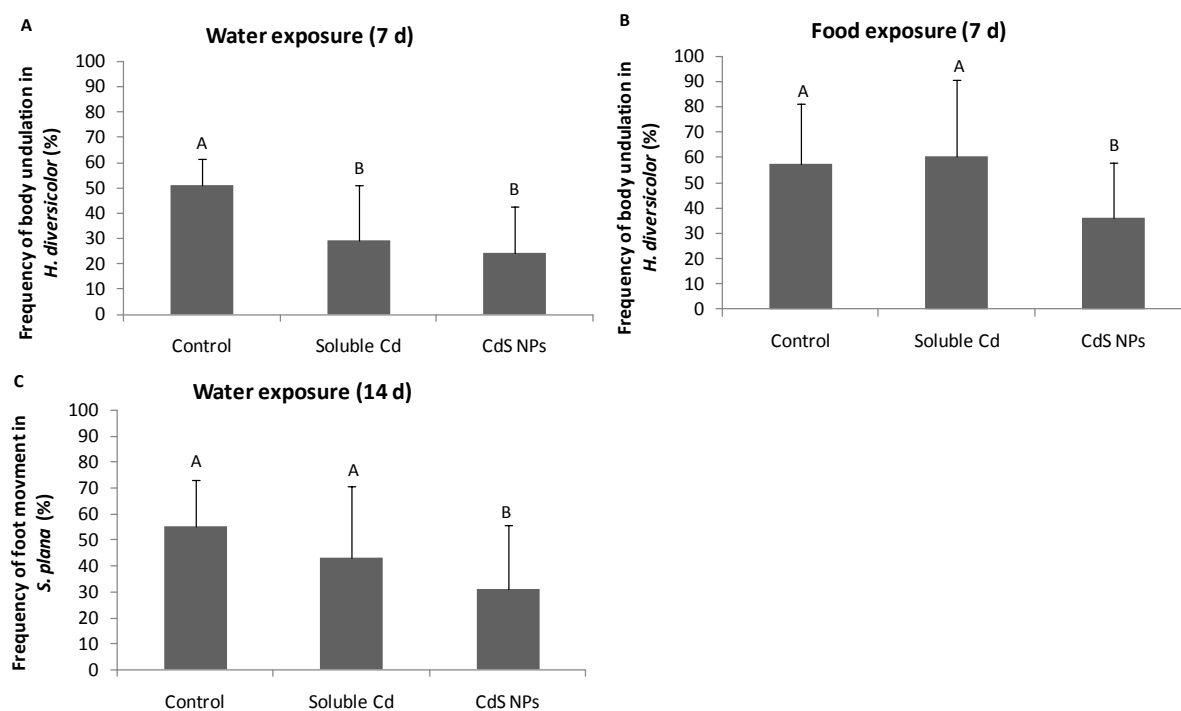


Fig 4.

2. Conclusion et perspectives

A l'issue de ces travaux, les résultats les plus marquants résident dans les possibilités innombrables d'interactions entre les NP et le milieu d'exposition. En effet, les résultats obtenus par la caractérisation montrent une fois de plus une agglomération des NP dans l'eau de mer. Les capteurs passifs montrent une libération de Cd labile mais la moitié des CdS reste sous forme nanoparticulaire. Après 14 jours, les réponses des biomarqueurs (Tableau 12) chez *S. plana* sont plus nombreuses pour les bivalves exposés à la forme nanoparticulaire et ce, quelle que soit la voie d'exposition. Le Cd labile provenant des NP ne peut donc pas expliquer à lui seul la toxicité des CdS NP. Ces résultats montrent donc que les effets observés sont probablement liés aux caractéristiques physico-chimiques des NP. Concernant *H. diversicolor*, les biomarqueurs (Tableau 12) répondant aux CdS NP et au Cd soluble sont similaires (CAT, GST, CSP) quelle que soit la voie d'exposition à l'exception de l'induction de SOD chez les annélides exposés au Cd soluble par l'eau. Cependant, l'induction des activités GST et CSP sont significativement plus élevées chez les annélides exposés aux NP dans l'eau par comparaison avec ceux exposés à la forme soluble. De même, l'induction des activités CAT et CSP sont significativement plus élevées chez les annélides exposés aux NP par la voie alimentaire par comparaison avec ceux exposés à la forme soluble.

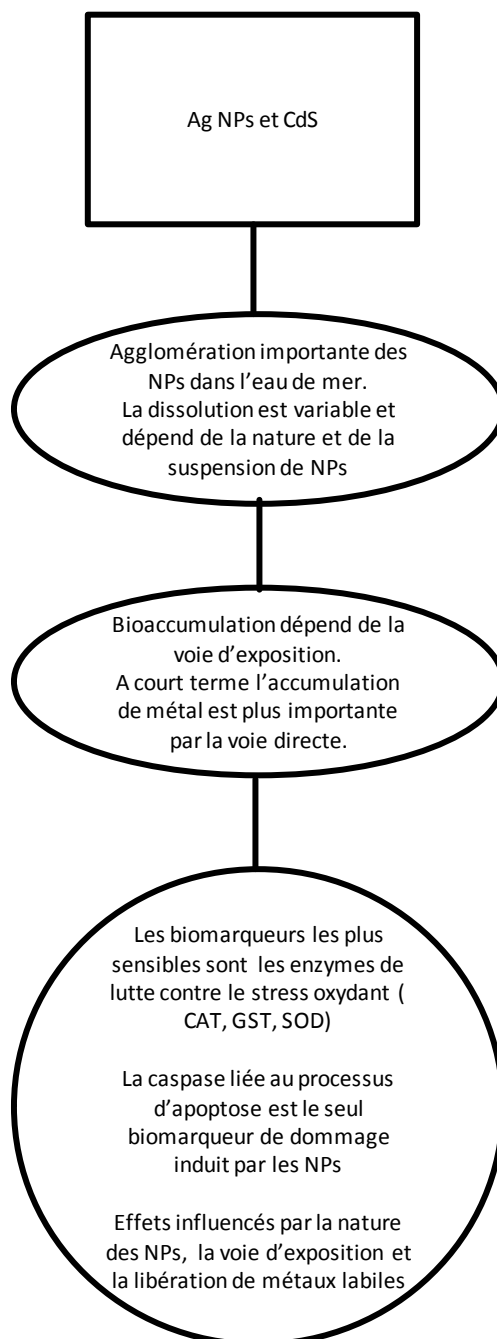
Tableau 12 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez *S. plana* et *H. diversicolor* selon la forme de Cd et la voie d'exposition (colonne d'eau ou alimentation). Induction significative du biomarqueur ↗, inhibition significative du biomarqueur ↘, pas de variation significative =.

Cd	Scrobicularia plana			
	Exposition par l'eau		Exposition par la nourriture	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement	=	=	=	=
Alimentation			=	
MT	=	=	=	=
CAT				
GST			=	
SOD	=		=	=
LDH	=		=	=
TBARS	=		=	=
AChE	=	=	=	=
CSP				

Cd	Hediste diversicolor			
	Exposition par l'eau		Exposition par la nourriture	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement	=	=	=	=
Alimentation	=	=	=	=
MT	Nd	Nd	Nd	Nd
CAT				
GST			=	
SOD		=	=	=
LDH	=	=	=	=
TBARS	=	=	=	=
AChE	=	=	=	=
CSP				

Utilisant un protocole expérimental et une dose d'exposition similaires à ceux du chapitre 4, nous avons mis en avant les variabilités entre les Ag NP et CdS NP concernant la stabilité, la spéciation et la voie de contamination des NP qui ont des rôles importants dans les mécanismes de toxicité observés chez nos deux espèces sentinelles. Les biomarqueurs biochimiques et comportementaux semblent être des outils très performants lorsqu'ils sont couplés à des techniques de caractérisation permettant le suivi du comportement des NP dans l'eau de mer et des mesures de bioaccumulation, permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des NP dans l'environnement.

Synthèse des chapitres 4 et 5



**Chapitre 6 : Comportement des nanoparticules
d'oxyde de zinc marquées par un isotope stable
(^{67}Zn) dans le sédiment et leurs effets sur deux
espèces endobenthiques *Scrobicularia plana* et
*Hediste diversicolor***

1. Contexte de l'étude

La plupart des NP métalliques entrent en interaction avec les composés de l'eau douce, de l'eau de mer et les sédiments lorsqu'elles pénètrent dans l'environnement ; ce qui se traduit généralement par leur dissolution et/ou leur agglomération (Pang et al. 2012). Du fait du comportement spécifique des NP dans les milieux aquatiques naturels, elles vont préférentiellement être déposées puis stockées dans les sédiments (Nowack et Bucheli 2007; Klaine et al. 2008). Afin de prédire les effets des NP sur le long terme, il est obligatoire de comprendre le devenir des NP dans le compartiment sédimentaire ainsi que les effets pouvant survenir sur les organismes endobenthiques qui constituent des cibles privilégiées des NP dans les sédiments. Ce chapitre est donc dédié à l'étude du comportement et des effets des ZnO NP dans ce compartiment particulier ainsi que l'utilisation de techniques possibles à mettre en œuvre pour améliorer nos pratiques dans les expériences sur les NP dans les sédiments.

La spéciation des métaux dans les sédiments est une problématique très importante pour la gestion du risque des métaux traces dans l'environnement. Le comportement et le devenir des métaux sont régis par une variété de processus physico-chimiques qui dictent leur disponibilité et leur mobilité dans les systèmes sédimentaires (Luoma et Rainbow 2008). Ces auteurs présentent aussi les nombreuses techniques nécessaires à l'analyse du comportement des métaux au sein du sédiment et mettent en exergue les difficultés concernant l'échantillonnage et le traitement pour réaliser des expériences dans le sédiment. Lorsqu'on travaille sur des NP métalliques, la complexité d'analyse est accrue. La recherche sur l'impact environnemental des NP manufacturées est toujours entravée par un manque d'outils fiables pour détecter, visualiser, quantifier et retracer les transferts des particules dans les systèmes naturels et biologiques complexes (Dybowska et al. 2011). L'étude des NP métalliques est complexifiée également du fait de la présence de métaux à des concentrations non négligeables qui sont naturellement présents dans le sédiment (et les organismes). Les techniques de marquage isotopique peuvent constituer un outil de grande valeur pour répondre aux interrogations concernant le comportement des NP dans les sédiments.

Les techniques utilisant des isotopes stables sont appliquées depuis de nombreuses années en géologie pour évaluer l'origine des roches, et en écologie pour comprendre les relations existantes dans les réseaux trophiques, dans les études du métabolisme, dans les études sur la nutrition et également en santé humaine (Gulson et Wong 2006). Deux approches sont possibles concernant l'utilisation des isotopes stables. La première est basée sur les variations d'abondance isotopique des produits stables issus de la dégradation radioactive. La seconde approche est utilisable pour les éléments n'ayant pas de parents radioactifs. Dans ce cas précis la variation d'abondance entre les isotopes est très faible voire négligeable (Gulson et Wong 2006). Ces auteurs suggèrent que l'utilisation de cette deuxième approche est particulièrement intéressante pour réaliser le suivi des nanoproduits dans l'environnement. L'utilisation de cette technique nécessite de surmonter certains des obstacles :

- synthèse des matériaux enrichis en isotopes,
- méthode d'analyse pour éliminer le bruit de fond pour des études utilisant des doses faibles,
- limites de détection dans les tissus après des temps d'exposition relativement courts

Dybowska et al. (2011) ont démontré que l'étude de la contamination par des NP à des doses environnementales réalistes est possible grâce à l'utilisation de ces traceurs. D'un point de vue technique, des précautions doivent être prises pour réaliser ces analyses. En effet, le choix des isotopes doit intégrer l'abondance naturelle des isotopes dans le milieu d'exposition et dans les organismes étudiés, les limites de détection des techniques de mesures envisagées pour l'analyse mais également leur coût. Un rapport réalisé par Rehkämper et al. (2010) fait état des avantages et inconvénients de l'utilisation de ces techniques pour leur usage dans les tests d'écotoxicologie. Dans le cas de l'étude sur le zinc, le ^{67}Zn et le ^{70}Zn sont indiqués puisque leur abondance naturelle est relativement faible (Figure 32) et qu'ils permettent d'utiliser des techniques comme l'ICP-MS quadripole.

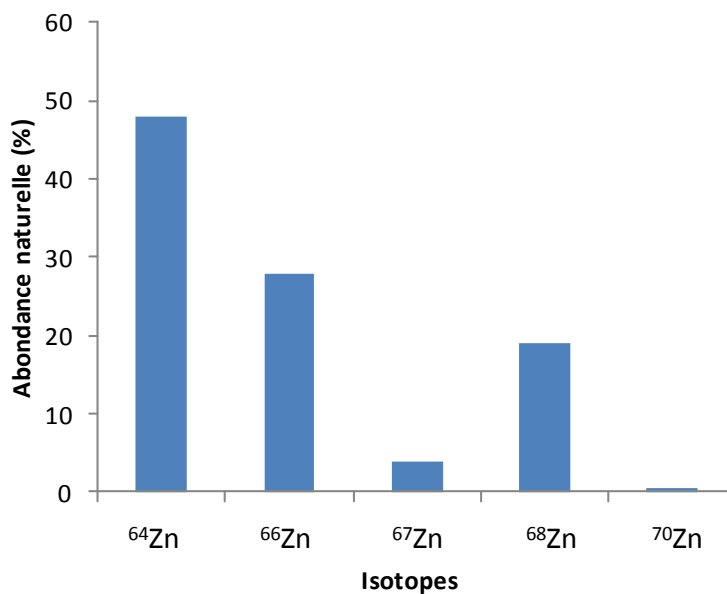


Figure 32 : Abondance naturelle des isotopes du Zinc.

Le ^{68}Zn est également intéressant puisqu'il est moins coûteux à produire que les autres isotopes mais nécessite cependant des techniques d'analyses très pointues (Spectromètre de masse ICPMS double focalisation et multi-collection couplé). Dybowska et al. (2011) proposent ainsi d'utiliser les travaux basés sur l'utilisation des NP marquées par des isotopes stables pour constituer une base de nanomatériaux de référence appropriée qui peuvent être facilement détectés dans les expériences de nanotoxicologie en laboratoire et sur le terrain.

Dans ce travail, nous avons donc choisi de travailler à la concentration de 3 mg Zn. kg^{-1} . Cette dose a été choisie au regard des travaux de Tiede et al. (2009) et correspond à une concentration environnementale prédite par des modèles mathématiques. Puisque ce travail a été réalisé dans le sédiment, nous avons utilisé des ZnO NP marquées par l'isotope stable ^{67}Zn . La suspension de NP a été stabilisée par du diéthylène glycol (DEG) qui permet la dispersion des particules et évite la formation d'agglomérats afin de conserver les propriétés nanométriques pour la majorité des NP. Une évaluation de la toxicité du DEG a donc été menée indépendamment de celle des NP.

Les problématiques abordées dans ce chapitre sont les suivantes:

- Quel est le comportement des ZnO NP dans le sédiment ? Est-ce que l'activité bioturbatrice des organismes influence la répartition verticale des NP dans les sédiments ?
- Est-ce que la toxicité est influencée par la solution de stabilisation (DEG) ?
- La contamination par les ZnO NP dans le sédiment a-t-elle une influence sur l'accumulation et les effets de ces NP sur les organismes ?

**Publication 5 : Fate of isotopically labeled zinc
oxide nanoparticles in sediment and effects on
two endobenthic species, the clam
Scrobicularia plana and the ragworm *Hediste
diversicolor*.**

ARTICLE IN PRESS

Ecotoxicology and Environmental Safety ■■■■■



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*

Pierre-Emmanuel Buffet^{a,b}, Claude Amiard-Triquet^a, Agnieszka Dybowska^c, Christine Risso-de Faverney^d, Marielle Guibbolini^d, Eugénia Valsami-Jones^c, Catherine Mouneyrac^{b,*}

^a LUNAM Université, MMS, EA2160, Faculté de pharmacie, 9, rue Bias BP53508, 44035 Nantes Cedex 1, France

^b LUNAM Université, MMS, EA2160, Université Catholique de l'Ouest, 3, Place André Leroy, 49000 Angers Cedex 01, France

^c Department of Mineralogy, Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK

^d Université de Nice-Sophia Antipolis, EA 4228 ECOMERS, Faculté des Sciences, Parc Valrose, BP 71, 06108 Nice Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 April 2012
Received in revised form
29 June 2012
Accepted 9 July 2012

Keywords:
⁶⁷Zn nanoparticles
Behaviour
Biomarkers
Scrobicularia plana
Hediste diversicolor

ABSTRACT

Although it is reported that metal and metal oxide nanoparticles, which are among the most rapidly commercialized materials, can cause toxicity to organisms, their fate in the environment and toxicity to marine organisms are not well understood. In this study, we used a stable isotope labelling approach to trace the fate of nanoparticles (NPs) in sediments and also investigated bio-uptake in two estuarine intra-sedimentary invertebrates *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor*. We selected exposure to 3 mg kg⁻¹ sediment ZnO NPs since this level is a realistic prediction of the environmental concentration in sediments. ⁶⁷ZnO NPs (DLS: 21–34 nm, positively charged: 31.3 mV) suspensions were synthesised in diethylene glycol (DEG). We explored the fate of ⁶⁷ZnO NPs in sediment, ⁶⁷Zn bioaccumulation and the biochemical (biomarkers of defence and damage) and behavioural (burrowing kinetics and feeding rates) biomarkers in both species to ⁶⁷ZnO NPs and DEG on its own during a 16 d laboratory exposure. After exposure, ⁶⁷Zn concentrations in sediment showed higher levels in the upper section (1 cm: 2.59 mg kg⁻¹) decreasing progressively (2 cm: 1.63 mg kg⁻¹, 3 cm: 0.90 mg kg⁻¹, 4 cm: 0.67 mg kg⁻¹) to a minimum value at the bottom (5 cm: 0.31 mg kg⁻¹). ⁶⁷Zn bioaccumulation was observed in both organisms exposed to ⁶⁷ZnO NPs in DEG but no major inter-species differences were found. At the biochemical level, ⁶⁷ZnO NPs exposure significantly induced increased glutathione-S-transferase activity in worms and catalase activity in clams whereas superoxide dismutase activity and thiobarbituric acid reactive substance levels were not affected in any species. Exposure to DEG on its own leads to a significant increase of metallothionein-like protein levels in clams compared with those exposed to ⁶⁷ZnO NPs or controls. Burrowing behaviour as well as feeding rate were significantly impaired in both species exposed to ⁶⁷ZnO NPs. Concerning exposure to DEG on its own, burrowing behaviour impairments were also shown in both species and feeding rate was impaired in bivalves. At environmentally realistic concentration of ⁶⁷ZnO NPs in sediment, there is no strong evidence for a severe nanoparticle effect since most effects were also observed in the presence of DEG alone.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The field of nanotechnology has shown a huge expansion during the last decade. With an increasing range of nanomaterials under production, questions arise concerning environmental and human health (Auffan et al., 2009; Klaine et al., 2008). Since aquatic environments are the final destination of contaminants,

ecotoxicological studies on coastal and marine environment are required.

ZnO is one of the most commonly used types of metal-based nanoparticles in fields like electronics, personal care and UV protection (Kool et al., 2011) using their specific optic and photonic properties. ZnO nanoparticles (ZnO NPs) are also used as antimicrobial agents in paints, plastics and toothpastes (Hooper et al., 2011). At the present time, there are many papers concerning ZnO NPs but no consensus about the role of nanosize property on their toxicity. Some recent works suggest that risk assessments do not need to go beyond considering the metal component of ZnO NPs in soils (Hooper et al., 2011) or that

* Corresponding author. Fax: +33 241 816 674.
E-mail address: catherine.mouneyrac@univ-angers.fr (C. Mouneyrac).

toxicity is associated with the solubilized Zn in aqueous systems (Auffan et al., 2009; Heinlaan et al., 2008; Mortimer et al., 2010). On the other hand, other scientists showed that the toxicity of nanosized metal oxides is at least partly due to the size effect and not explained by dissolution of the particles alone (Wang et al., 2009).

According to Studart et al. (2007), suspensions with a high concentration of nanoparticles (> 40 vol%) can be very advantageous, in many technologies for device fabrication but need to be stabilized. In most cases, the toxicity of the stabilizing agent is not investigated. Despite a lot of work on toxicity of nanoparticles on seawater and freshwater species, there is a little number of studies dealing with sediment (Mühling et al., 2009; Pang et al., 2012). Several authors underline the need to carry out experiment using soil matrix (Hooper et al., 2011; Kool et al., 2011) or sediments (Keller et al., 2010) to well understand complex mechanisms which can modify NPs bioavailability in this particular compartment. In the environment, metals naturally present are associated with sediment and biota at relatively high concentrations. Techniques using isotopes are recommended to follow the uptake of metals added in experiments and their bioavailability (Croteau et al., 2011; Rodgers et al., 2011). In addition, in seawater, nanoparticles become rapidly agglomerated favouring deposition onto the sediment surface; thus benthic organisms may be at higher risk of exposure (Keller et al., 2010).

With the main objective of investigating putative ecological impairments caused by engineered nanoparticles (ENPs), it is needed to select species which have a key role in the structure and functioning of ecosystems. In this way, marine invertebrates such as the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* (Berthet et al., 2011; Solé et al., 2009) are recognized as good models for biomonitoring purposes.

Biomarkers of defence are part of the very first mechanisms of protection against pollutants in the environment. Metallothionein (MT) is a core biomarker involved in the regulation and detoxification of metals in organisms (Amiard et al., 2006) and may be involved in the defence against oxidative stress (Buico et al., 2008). Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) are also able to cope with oxidative processes (Regoli et al., 2011). These enzymes are of great interest since oxidative stress is recognized as a main effect of NPs on biota (Klaire et al., 2008; Moore, 2006).

Defence capacities of animals are limited because of the energy cost of protection against pollutants. LDH activity is particularly important when a considerable amount of energy is rapidly required (Diamantino et al., 2001; Moreira et al., 2006) under adverse conditions. When defences are not sufficient to cope with toxicity, damages can appear. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) can reveal the state of peroxidation of lipids from membranes (Knight et al., 1988). Cholinesterases (ChE) are commonly used in environmental assessment and are core biomarkers promising for future implementations into the OSPAR coordinated environmental monitoring program (CEMP) as neurotoxicity marker (Burgeot et al., 2010). In addition, behavioural biomarkers are sensitive tools to assess the impact of contaminants at concentrations far below lethal effects (Amiard-Triquet, 2009) particularly in *S. plana* (Byrne and O'Halloran, 2001) and *H. diversicolor* (Moreira et al., 2006).

The aims of the present study were: (i) to evaluate the fate of ZnO NPs in sediment and bioaccumulation in endobenthic species (*S. plana*, *H. diversicolor*) using purpose-made and well characterised isotopically modified nanoparticles (^{67}ZnO NPs); (ii) to investigate ZnO NPs toxicity using a set of biochemical and behavioural biomarkers taking into account the role of the stabilizing solution (diethylene glycol, DEG) in the toxicity of ZnO suspension.

2. Material and methods

2.1. Chemicals used and particle characterization

Due to the high levels of Zn present in natural sediment, it is appropriate to use a labelling technique, such as stable isotope labeling, to separate Zn derived from ZnO NPs from pre-existing Zn. Reference values used in the OSPAR strategy are indicated as follows in mg kg^{-1} (Zn:90.0; Cu:20.0; Cd: 0.20; Ni: 45.0). Measurements of metal concentrations in sediments of our site were previously determined (in mg kg^{-1}) for Zn (134), Cu (11.8), Cd (0.16) by Amiard et al. (2007) and Ni (15) (Amiard, personal communication). Our results are in the same range than values pre-recognized as a reference in the OSPAR strategy. In this case, it is appropriate to work with isotope to separate Zn from NPs from natural Zn. ZnO NPs isotopically enriched (89.6%) with a rare isotope of Zn (^{67}Zn , natural abundance of 4.1%) were synthesized at the Natural History Museum, London, according to the protocol outlined in Dybowska et al. (2011). Briefly, isotopically enriched zinc metal (purchased from Isotec, Russia) was transformed to zinc acetate precursor which subsequently was transformed into the final product i.e. ZnO by forced hydrolysis in DEG at 170 °C. The suspension of ^{67}ZnO NPs was stored in the dark at 20 °C and for no longer than 2 months. Dilutions were prepared directly just before use to obtain a final concentration of 3 $\text{mg } ^{67}\text{ZnO kg}^{-1}$ sediment, considering the environmentally realistic doses predicted by Tiede et al. (2009).

Diluted suspension of the ZnO NPs was deposited on carbon coated copper grid for TEM imaging (Hitachi 7100 operating at 100 kV). The hydrodynamic size (in DEG and in DIW, 25 °C) and surface charge (DIW, 25 °C, pH=6.4) of the NPs were measured using Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd). X-ray diffraction was performed on the NPs using Enraf-Nonius diffractometer coupled to INEL CPS 120 position-sensitive detector with Co-K α radiation and the phase identification was performed using STOE software.

Dynamic light scattering (DLS) technique (Malvern Zetasizer Nano, Malvern Instruments Ltd) was used to study the stability of the NPs suspension in the exposure medium i.e. natural seawater filtered at 0.45 μm . For this experiment NPs suspension was diluted directly in seawater, mixed thoroughly and particle size measured immediately and every hour for 15 h. The suspension was not mixed during this experiment to allow for detecting kinetics of particle sedimentation.

2.2. Animal collection and acclimation

Bivalves (*Scrobicularia plana*) and ragworms (*Hediste diversicolor*) were collected by hand from an intertidal mudflat in the Bay of Bourgneuf (1° 58' 04.80" W, 47° 01' 50.35" N), located on the West Atlantic coast (France), in October 2010. The chemical and ecological status of this site is considered "good" according to the criteria of the European Water Framework Directive (AELB, 2004). Animals of the similar size (*S. plana*: 2.5 ± 0.2 cm, 1.75 ± 0.6 g; *Hediste diversicolor*: 0.3 ± 0.1 g) were selected to avoid a potential influence of this biological factor (Fossi Tankoua et al., 2011; Kalman et al., 2010). The collected individuals were transported to the laboratory in a cool box. The animals were then allowed to eliminate their gut content and acclimated, in a temperature controlled room (15 °C, temperature measured in the sediment at the time of collection), for 48 h in aerated filtered (0.45 μm) natural seawater.

2.3. Exposure protocol

Animals were placed into 2.2 L polypropylene aquaria (12 individuals/tank) filled with 2 kg of sediment from their site of origin and topped with 0.2 L of aerated seawater in which contaminants were added. Three treatments: (i) natural seawater only; (ii) DEG alone, at the same concentration as added with NPs; (iii) ^{67}ZnO NPs (3 mg kg^{-1} sediment) in DEG, were carried out in a triplicate design in the dark at 15 °C. The experimental media were aerated using bubblers in perforated PVC tubes inside sediment. Sediment cores (26 mm diameter) were sampled from each aquarium (three cores per treatment) at the beginning ($T=0$) and at the end of the experiment ($T=16$ d). Cores were cut every centimeter to examine the distribution of ^{67}Zn in the five first centimeters of sediment. The same procedure was carried out in tanks without animals added in order to determine how endobenthic species can affect ^{67}ZnO dispersion depending on the depth.

2.4. Metal quantification

To minimize inadvertent metal contamination, labware, vials, and Teflon sheeting were soaked for at least 24 h in 10% hydrochloric acid, rinsed three times in deionised water prior to use. Whole soft tissues from animals were carefully washed and weighed before digestion. Animal tissues (separated in the case of clams as described below in subsection 2.7) and sediment slides were heated with concentrated nitric acid and concentrated hydrochloric acid as

ARTICLE IN PRESS

P.-E. Buffet et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 111 (2012) 111–121

3

recommended by Croteau and Luoma (2009) at 75 °C during, respectively, 48 h (tissues) and 5–7 d (sediments). Hydrogen peroxide was added prior to final dilution with ultrapure water (5–10% HNO₃).

Metal in tissues was analysed by ICP-MS (Varian Instruments) only, while sediments were first analysed by ICP-OES (Varian Instruments) to check the total solid content before subjecting the samples to ICP-MS analysis. For ICP-OES multi-element and for ICP-MS single element, calibration standards were freshly prepared. For ICP-MS analysis, samples and standards were spiked with 1 ppb Rh/In to be used as an internal standard to account for instrument drift and changes in sensitivity. The detection limits for ICP-MS were: 0.02 ppb for ⁶⁶Zn and ⁶⁴Zn, 0.05 ppb for ⁶⁷Zn, 0.19 ppb for ⁶⁸Zn and 1.93 ppb for ⁷⁰Zn.

2.5. Quality control

Appropriate blanks and reference materials (MESS-2 and IAEA 356 both sediments) were included in the analysis. To control the instrument drift, laboratory control samples were used in both ICP-OES and ICP-MS runs (every 10 samples).

Calibration standards were freshly prepared before each run and care was taken not to introduce additional contamination from Zn while handling samples (dilutions were prepared with ultra clean 2% nitric acid).

2.6. Calculation of newly accumulated ⁶⁷Zn

An isotope tracing technique that allows tracking newly accumulated tracers, independently from the background levels as described by Croteau et al. (2004) and Croteau et al. (2011), was used. Briefly, the relative abundance of ⁶⁷Zn tracer (i.e. p^{67}) is determined using the signal intensities of each isotope in the calibration standards i.e.

$$p^{67} = \text{Intensity} \left(\frac{{}^{67}\text{Zn}}{{}^{66}\text{Zn} + {}^{67}\text{Zn} + {}^{68}\text{Zn} + {}^{70}\text{Zn}} \right) \quad (1)$$

Concentrations of tracer in the experimental solutions ($[{}^{67}\text{Zn}]_e$) are calculated as the product of p^{67} and the total metal concentrations inferred by the ICP-MS software from tracer intensity ($[{}^{67}\text{Zn}]_i$) i.e.

$$[{}^{67}\text{Zn}]_e = p^{67} \times [{}^{67}\text{Zn}]_i \quad (2)$$

The original load of tracer ($[{}^{67}\text{Zn}]_0$) that occurred in each sample in the absence of a spike is calculated as the product of p^{67} and the total metal concentrations inferred from the intensity of the most abundant isotope that is minimally affected by isobaric and polyatomic interferences (e.g., ⁶⁶Zn) i.e.

$$[{}^{67}\text{Zn}]_0 = p^{67} \times [{}^{66}\text{Zn}]_i \quad (3)$$

The net tracer uptake ($\Delta[{}^{67}\text{Zn}]_e$) is then derived from the total experimental metal concentration ($[{}^{67}\text{Zn}]_e$, Eq. (2)) minus the pre-existing concentration of tracer ($[{}^{67}\text{Zn}]_0$, Eq. (3)).

$$\Delta[{}^{67}\text{Zn}]_e = p^{67} \times ([{}^{67}\text{Zn}]_i - [{}^{66}\text{Zn}]_i) \quad (4)$$

2.7. Biochemical markers

After removal of the shells, the soft tissues were carefully wiped with absorbent paper and stored at −80 °C until biochemical analysis. For LDH and

MT, measurements were carried out individually (n=10 per treatment). For GST, CAT, SOD, TBARS, CSP (CSP 3-like) and AChE, determinations were carried out in five pools of three individuals per treatment. GST, CAT, SOD, TBARS, LDH and AChE activities were estimated spectrophotometrically as described previously in Buffet et al. (2011). Since AChE has not been characterized in *S. plana*, it is not clear if only AChE or also pseudocholinesterases are able to hydrolyze the substrate used. However, in the whole paper, we will use the most common abbreviation AChE for cholinesterases.

CSP 3-like activity was determined by measuring the release of aminotri-fluoromethylcoumarin (AFC) from the caspase tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). After homogenization of the pooled soft tissues, the supernatant (S9) fraction was mixed with buffer B (312.5 mM HEPES, pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3% CHAPS, 50 μM AM of DEVD-AFC). The fluorescence of free AFC was measured in a fluorometer (Safas FLX Xenius, Monaco) at an excitation/emission wavelength of 390/530 nm every 3 min for 45 min. CSP 3-like activities were expressed in picomoles of AFC released per minute per mg of protein (pmoles AFC min^{−1}mg^{−1}protein), according to a standard curve obtained from AFC.

Because previous studies revealed that metallothionein (MT) determination was not a relevant biomarker of metal exposure in *H. diversicolor* (Poirier et al., 2006), MT analyses were performed only in bivalves (*S. plana*). The whole soft tissues of *S. plana* were homogenized, then the cytosolic (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by centrifugation at 30,000 g for 30 min at 4 °C. An aliquot of the soluble fraction (S1) was heated at 75 °C for 15 min. Then MTs were isolated by centrifugation (15,000 g for 10 min at 4 °C) and determined by differential pulse polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al., 2002).

2.8. Behavioural experiments

Bivalves (*S. plana*) and worms (*H. diversicolor*) were submitted to burrowing tests as described by Bonnard et al. (2009), after being previously exposed in the laboratory for respectively 7 and 8 d to seawater only, DEG only or ⁶⁷ZnO NPs in DEG. For bivalves (n=20), burrowing experiments were carried out in plastic containers filled with 3 cm of natural sediment (collected from the site of origin of invertebrates) and topped up with 2 L of seawater. Natural sediment was homogenised by hand 1 d before experimentation. Burrowing behaviour was studied by placing individuals on the surface of the sediment and observing the number which had burrowed at frequent intervals; every 5 min in the first hour, every 10 min in the second hour, every 20 min in the third and fourth hour, then every hour until 6 or 7 h of test. Twenty ragworms were tested individually for each studied condition. Briefly, we used plastic clean containers of 100 ml, filled with 5 cm of wet sediment from the site of origin. Ragworms were placed on sediment and their positions were recorded every 2 min during 30 min.

The feeding rate was estimated for bivalves and worms previously exposed for 10 or 11 d, respectively, to seawater only, DEG only or ZnO NPs in DEG. The feeding rate of *S. plana* was quantified according to the methodology described by Worrall and Widdows (1983) and adapted to our conditions. Algae *Tetraselmis suecica* were used as food at a concentration of 10,000 cell ml^{−1} in each tank (three tanks per exposure treatment, 12 clams per tank). The concentration of algae not ingested by bivalves was measured after 1 h. The feeding rate of *H. diversicolor* was quantified according to the methodology described by Moreira et al. (2005). Twenty worms were fed 100 *Artemia salina* larvae into their individual plastic beakers containing 50 ml of seawater. They were left undisturbed for 1 h, then the remaining larvae were collected and counted and results were expressed as the number of larvae ingested per hour per individual.

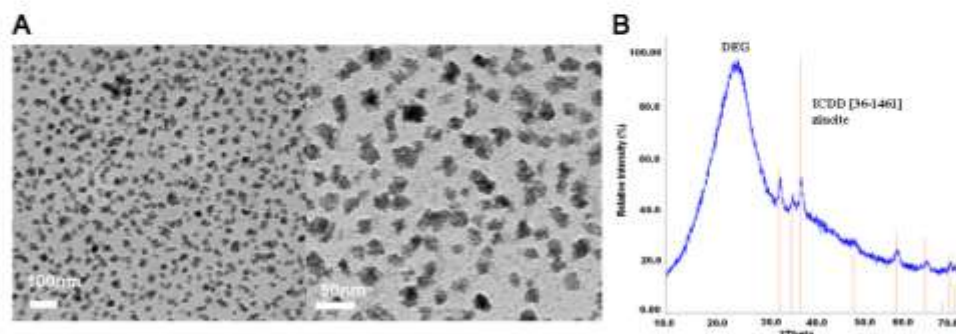


Fig. 1. Transmission electron microscopy (TEM) images of synthesised ⁶⁷ZnO nanoparticles (A) and X-ray diffraction (XRD) pattern (B) confirming presence of ZnO phase in the DEG suspension.

Please cite this article as: Buffet, P.-E., et al., Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the... Ecotoxicol. Environ. Saf. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

ARTICLE IN PRESS

4

P.-E. Buffet et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 111 (2012) 100–110

2.9. Statistical analysis

Percentages of unburrowed individuals were first ln-transformed for linearization, then the regression coefficients of the least-square regression lines were compared using analysis of covariance (ANCOVA). Otherwise, results are presented as mean $\pm$ SD. Significant differences were established by using one-way analysis of variance (ANOVA) (Underwood, 1981) or non-parametric Mann and Whitney comparison tests (Mann and Whitney, 1947) when normality was not verified and the variances of groups were different. The level of significance was established at $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed by using XLSTAT[®]v7.5.

3. Results

3.1. Particle characterization and behaviour in the test media

Fig. 1 shows the transmission electron microscopy (TEM) micrographs of the particles (A) as well as their X-ray diffraction (XRD) (B) pattern which indicate the presence of pure ZnO with

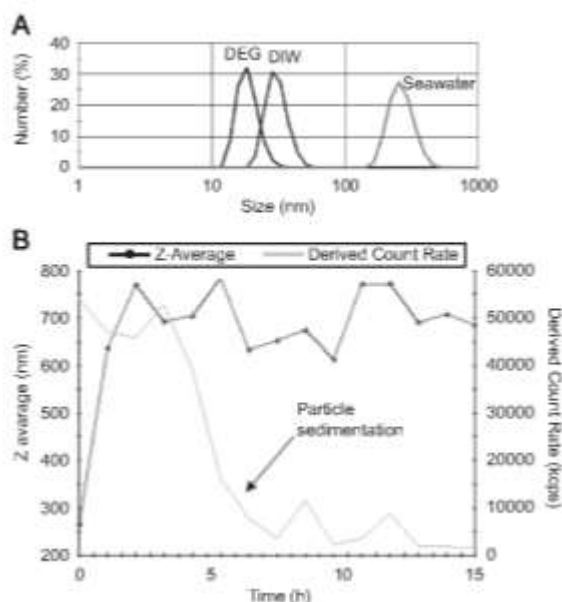


Fig. 2. (A) DLS size measurement of ZnO NPs in DEG, DIW and after dilution in seawater, (B) stability of the suspension in seawater over 15 h.

sample pattern matching well with the standard pattern for ZnO (zincite).

The particle size was measured in DEG suspension and after diluting the suspensions in water (DIW). The DLS hydrodynamic size was found to be 20–34 nm in DEG suspension. TEM investigation indicated the presence of much smaller sized (sub 10 nm) primary particles within the 20–30 nm entities. Upon sample dilution in water, particles agglomerated and hydrodynamic size increased to about 40 nm while upon dilution in seawater, agglomeration was immediately evident followed by particle sedimentation within a few hours (see Fig. 2).

The surface charge of the particles was measured in suspensions diluted in water and was found to be +31.3 mV.

3.2. ^{67}Zn distribution in Sediment

Distributions of ^{67}Zn in sediment at the beginning ($t=0$) and at the end of experiments are shown in Fig. 3. At $t=0$, ^{67}Zn concentration was higher in the first cm of sediment (1 cm: 0.57 mg kg^{-1}) compared to other sections (2 cm: 0.18 mg kg^{-1} , 3 cm: 0.16 mg kg^{-1} , 4 cm: 0.08 mg kg^{-1} , 5 cm: 0.07 mg kg^{-1}). The total ^{67}Zn concentration ($\Sigma 1, 2, 3, 4, 5 \text{ cm}$) was nearing from 1 mg kg^{-1} . After 16 d of exposure, ^{67}Zn concentrations were increased in the five sections compared to $t=0$. Higher concentration was in the upper section (1 cm: 2.59 mg kg^{-1} sediment) and decreased progressively (2 cm: 1.63 mg kg^{-1} , 3 cm: 0.90 mg kg^{-1} , 4 cm: 0.67 mg kg^{-1}) to the minimum value in the bottom (5 cm: 0.31 mg kg^{-1}).

3.3. ^{67}Zn bioaccumulation

Concentrations of natural Zn and isotopic ^{67}Zn accumulated in clams (A) and ragworm tissues (B) are depicted in Fig. 4. Concentrations of total Zn were significantly higher in both species exposed to ^{67}ZnO NPs in DEG compared to seawater and DEG only. The difference is mainly due to accumulated ^{67}Zn ($5.4 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ww in clams and $3.7 \pm 1.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ww in ragworms). In addition, in *S. plana*, Zn concentration was determined separately in the cytosolic fraction and in the insoluble fraction of tissues. For animals exposed to ZnO NPs, isotopic ^{67}Zn was distributed between these fractions at $2 \pm 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ in the cytosol and at $3 \pm 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ in the insoluble fraction.

3.4. Biomarkers

Enzyme activities in the whole soft tissues of invertebrates are shown in Table 1. In clams, activities were significantly increased for CAT, CSP-3 like and LDH in animals exposed to ^{67}ZnO NPs in

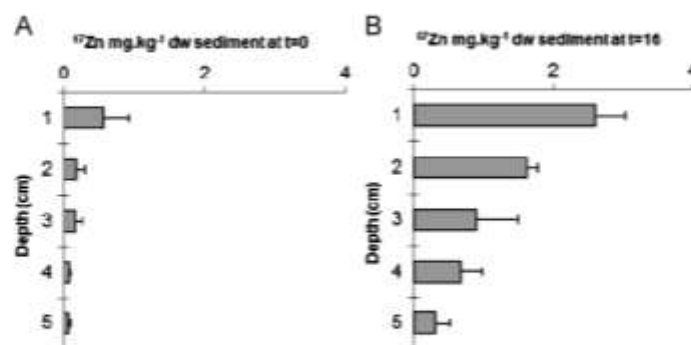


Fig. 3. Distribution of isotopic ^{67}Zn accumulated in sediment (5 first cm) at $t=0$ (A) and after 16 d (B) of exposure ($t=16 \text{ d}$) to ZnO NPs labeled with ^{67}Zn .

Please cite this article as: Buffet, P.-E., et al., Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the... Ecotoxicol. Environ. Saf. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

ARTICLE IN PRESS

P.-E. Buffet et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 111 (2012) 111–121

5

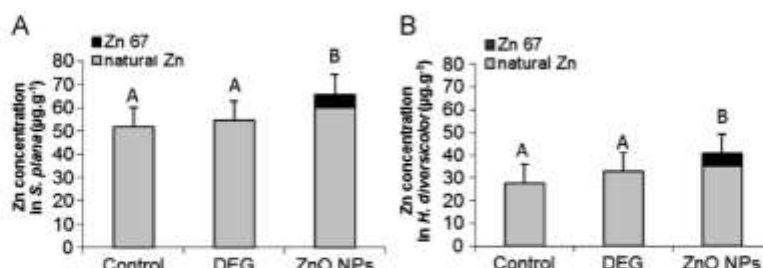


Fig. 4. Natural Zn and isotopic ⁶⁷Zn accumulated in *S. plana* (A) and *H. diversicolor* (B) exposed during 16 d to ZnO NP in DEG, DEG only and seawater only.

Table 1

Feeding rates and enzyme activities in the whole soft tissues of *S. plana* and *H. diversicolor* after exposure to seawater only, DEG only and ZnO NPs in DEG. Values with different superscripts correspond to significant differences ($p < 0.05$).

Biomarkers		<i>S. plana</i>			<i>H. diversicolor</i>		
		Control (n=5)	DEG (n=5)	ZnO NPs (n=5)	Control (n=5)	DEG (n=5)	ZnO NPs (n=5)
Behaviour	Feeding rate	2507 (510) ^a	240 (106) ^b	1420 (69) ^c	88 (9) ^a	84 (11) ^a	80 (7) ^a
Defence	CAT (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	71 (13) ^a	86 (11) ^a	137 (35) ^b	61 (9) ^a	97 (26) ^b	76 (11) ^a
	GST (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	237 (52) ^a	323 (72) ^a	264 (52) ^a	84 (20) ^a	119 (26) ^a	158 (50) ^b
	SOD (U SOD mg ⁻¹ protein)	45 (7) ^a	35 (6) ^a	49 (16) ^a	81 (13) ^a	59 (17) ^a	67 (12) ^a
	MT (µg g ⁻¹ tissues)	1505 (227) ^a	1904 (195) ^b	1618 (283) ^a			
Damage	LDH (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	42 (12) ^a	41 (9) ^a	59 (14) ^b	683 (216) ^a	652 (289) ^a	578 (272) ^a
	TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein)	0.64 (0.11) ^a	0.63 (0.14) ^a	0.93 (0.27) ^b	0.66 (0.15) ^a	0.59 (0.19) ^a	0.43 (0.05) ^b
	AChE (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	22 (6) ^a	21 (5) ^a	29 (7) ^a	66 (15) ^a	70 (15) ^a	61 (27) ^a
	CSP-3 like (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	1.86 (0.47) ^a	2.83 (0.63) ^b	3.90 (2.17) ^b	1.17 (0.21) ^a	1.08 (0.28) ^a	0.67 (0.19) ^b

DEG compared to seawater and seawater with DEG only. MT levels were significantly increased in animals exposed to DEG only compared to the other treatments (⁶⁷ZnO NPs in DEG and seawater only). In ragworms, GST activity was increased in animals exposed to ⁶⁷ZnO NPs in DEG compared to DEG only and seawater only. CSP-3 like activity and TBARS levels were significantly decreased in worms exposed to ⁶⁷ZnO NPs in DEG compared to DEG only and seawater only. No significant changes were observed for SOD and AChE in both species and both treatments compared to controls.

Burrowing kinetics of clams and ragworms are depicted respectively in Fig. 5A and B. For both species, significant reductions of burrowing speed were shown in animals exposed to ⁶⁷ZnO NPs in DEG and DEG only compared to controls.

Feeding rates of clams and ragworms are shown in Table 1. For both species, significant reductions of feeding rates were shown in animals exposed to ⁶⁷ZnO NPs in DEG compared to controls. For animals exposed to DEG only, a significant reduction was shown only in bivalves.

4. Discussion

4.1. Fate of NPs

In many reviews about nanotoxicology, authors underlined the need to investigate the fate of nanoparticles in exposure media (Aufan et al., 2009; Fabrega et al., 2011; Klaine et al., 2008). In that way, efforts were first focusing on the fate of ZnO NPs in our experimental medium. Diethylene glycol (DEG) was used in the synthesis to aid dispersion and arrest particle growth, to preserve the nanosize properties for the majority of ZnO NPs. However, after dilution in water, agglomeration occurred as the stabilising agent was being removed (see Fig. 2). Agglomeration was more

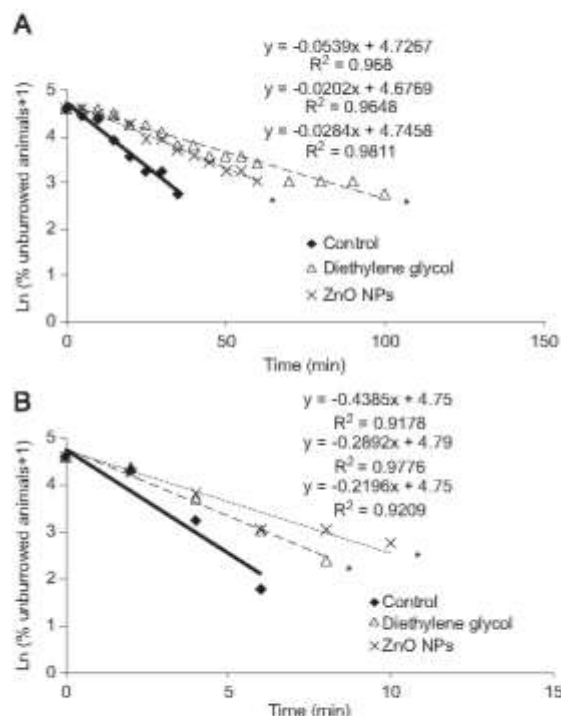


Fig. 5. Burrowing kinetics (Ln (% unburrowed animals + 1)) of *S. plana* (A) and *H. diversicolor* (B) previously exposed, respectively, for 7 and 8 d to seawater only, DEG only and ZnO NPs in DEG. Asterisks indicate significant differences compared to controls.

Please cite this article as: Buffet, P.-E., et al., Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the..., Ecotoxicol. Environ. Saf. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

evident when particles were dispersed in higher ionic strength media i.e. seawater, with particle sizes increasing to several hundred nm and agglomerates sedimenting out after a few hours (see Fig. 2). Particle agglomeration induced by media of high ionic strength has been extensively documented for many types of metal oxides nanoparticles. In addition to agglomeration, the particles likely underwent at least a partial dissolution in the seawater exposure medium. Working with similar type of material and in the same exposure media Larner et al. (in preparation) reported that 60% of ZnO particles dissolved. This is in agreement with other studies where high solubility of nanoparticulate ZnO was reported (e.g. Fairbairn et al., 2011; Fabrega et al., 2012; Miller et al., 2010).

The fast agglomeration and sedimentation of nanoparticles in seawater is the mechanism by which the particles can be transferred from the water column to the sediments as described previously in the literature (Klaine et al., 2008). This process results in significant metal accumulation in sediments, which become the main exposure route for sediment dwelling organisms. In the literature, many questions remain unanswered concerning the fate of nanoparticulate metals and metal oxides in soils and sediments because NPs are in most cases associated with soil matrix which shows high concentrations of metals. Concentrations of Zn in sediments and soils usually do not exceed 200 mg kg^{-1} but can range between 3 and 118 g kg^{-1} as a result of human activities (Eisler, 2007). In estuarine and coastal areas, sediments are the major compartments for metal storage. In this case, it is very difficult to distinguish between metals associated with ENPs and naturally present metals. As highlighted by Dybowska et al. (2011) in the first study using isotopically unique nanoparticles, the stable isotope tracing approach has applications not only in studying bio-uptake but also in tracing the fate and transport of labelled nanomaterials in soils or sediments.

In the present study, isotopically labelled Zn was used to follow the distribution of metal associated with ZnO NPs and/or in dissolved form (from particle dissolution) after application of NPs to the water overlying the sediment. For that purpose, labelled Zn was measured in sediment at different depths and different times. A part of ZnO NPs added in superficial water was immediately deposited onto the sediment surface as indicated by increased metal concentrations in the surface sediment layer as early as the start of the experiment (Fig. 3). Even after 16 d, a major part of the added ZnO NPs was still present in superficial sediment as indicated again by high Zn concentrations in this compartment—see Fig. 3 (1 cm depth). With time, particles initially deposited on sediment surface entered progressively in the deeper sediment layers till 5 cm depth. Bioturbation processes operated by benthic species could contribute to this migration. This situation is in agreement with the fate of NPs described in the review by Klaine et al. (2008) underlining that endobenthic species are at higher risk of exposure to NPs.

4.2. Bioaccumulation

Zn is a ubiquitous metal in living species since it is an essential trace element needed in metabolism. Labelled NPs are an interesting tool to distinguish between ZnO newly incorporated from/with NPs and background Zn concentrations. In the present study, animals from the same sampling site contained Zn levels which varied from 10 to $50 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ in *H. diversicolor* (Kalman et al., 2009) and from 40 to $70 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ in *S. plana* (Fossi-Tankoua, personal communication). With an environmentally realistic exposure concentration of $3 \text{ mg Zn (as } ^{67}\text{ZnO NPs) kg}^{-1}$ sediment, the Zn concentration was significantly increased in exposed animal tissues by comparison with controls and exposure to the stabilizing solution (DEG) only. The difference was due to the accumulation of newly

incorporated ^{67}Zn . This could not have been established easily if labelled particles were not used. Many authors have shown that ZnO NPs are prone to solubilize (e.g. Fairbairn et al., 2011; Fabrega et al., 2012; Miller et al., 2010) thus increasing their bioavailability. As already mentioned for the endobenthic amphipod *Corophium volutator*, it is not possible to determine if ^{67}Zn detected in insoluble fraction of tissues of *S. plana* resulted from the uptake and sequestration of soluble Zn dissolved from the NPs, ZnO NPs themselves or a combination of both (Fabrega et al., 2012).

Background levels of metals are generally higher in the bivalves *S. plana* compared to *H. diversicolor*, particularly for Zn as also Cu (Buffet et al., 2011; Solé et al., 2009). In previous experiments with clams and ragworms exposed in seawater to CuO NPs, it was observed that uptake was more important in the clam than in the polychaete (Buffet et al., 2011). Waterborne exposure to identical levels of Au NPs also resulted in higher uptake of Au in the bivalve than in the polychaete (Pan et al., 2012). In the present study, the background levels of Zn were also higher in *S. plana* than in *H. diversicolor* in agreement with Solé et al. (2009), but it must be noted that the concentration of newly incorporated ^{67}Zn were very similar in both species. Previous and current studies have shown that *S. plana* can incorporate large amount of NPs using both exposure routes (water and sediment). Thus *S. plana* appears as an excellent model being able to take up contaminant from both compartments: water column and sediments. It exhibits the biological traits which make bivalve molluscs “a unique target group for NP toxicity” according to Canesi et al. (2012). But in addition, because it is mainly a deposit feeder (Hughes, 1969), it is also very convenient to examine toxicity of deposited NPs.

4.3. Biomarkers

Behaviour in terms of burrowing was significantly impaired in both clams and ragworms exposed to ZnO NPs in DEG compared to control but not more than in specimens exposed to DEG alone. Feeding behaviour of clams was also disturbed in the presence of ZnO NPs in DEG and DEG alone. On the other hand, feeding rate of ragworms was not so strongly impaired in the presence of ZnO NPs and no differences were shown between controls and ragworms exposed to DEG alone. As commonly accepted, behaviour appears as a sensitive biomarker in ecotoxicology test. Feeding impairments were observed in gastropods *Potamopyrgus antipodarum* (Pang et al., 2012) and bivalves *S. plana* (Buffet et al., 2011) exposed to CuO NPs. Burrowing of *S. plana* were also impaired after exposure to CuO NPs (Buffet et al., 2011) and Au NPs (Pan et al., 2012). In the present study behavioural biomarkers did not reveal consistent nanotoxicity at an environmentally realistic dose of ZnO NPs, in addition to the toxicity of the stabilizing solution (DEG).

None of the biomarkers belonging to the set tested in both species was modified in specimens exposed to the stabilizing solution with the exception of MT concentration in clams. In exposed sea bass *Dicentrarchus labrax* to DEG up to 5000 mg l^{-1} did not reveal to cause any evident effect on a wide battery of analysed biomarkers (Corbi et al., 2009). When ZnO NPs in DEG were added, a number of significant differences were observed but they were not consistent when comparing the two studied biological models despite similar Zn uptake revealed by measuring ^{67}Zn in animal tissues. Since oxidative stress is recognized as a main effect of NPs on biota (Klaine et al., 2008; Moore, 2006), an induction of defences was expected. However, CAT activity was significantly induced only in clams, GST activity only in ragworms whereas SOD activity was not affected in any species. When defences are not efficient it may be revealed by and increase of

ARTICLE IN PRESS

P.-E. Buffet et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 77 (2012) 1016–1024

7

TBARS which was not the case in clams and ragworms exposed to ZnO NPs in the present study.

4.4. Conclusion

This study underlines the need of using labelled ZnO NPs to distinguish Zn from contaminant from natural Zn background, and establishes new interesting data concerning the fate of metal containing engineered nanoparticles in marine sediment and in two endobenthic species important in the structure and functioning of estuarine ecosystems. At environmentally realistic exposure concentration of ZnO NPs, no consistent changes of biochemical biomarkers were observed. Defence mechanisms were probably not sufficient to prevent behavioural impairments and reinforce the suitability of behavioural biomarkers as very sensitive tools to assess the impact of the contaminants at concentrations far below the lethal effect (Amiard-Triquet, 2009). As shown in the literature toxicity of ZnO NPs is generally attributed to Zn^{2+} release from NPs by dissolution in the media. However, because Zn is an essential metal, animals have strategies which allow them to tolerate its presence in their environment at least at low doses (Luoma and Rainbow, 2008).

Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant agreement no. [214478], project name NanoReTox, Jens Najorka and Stanislav Strekopytov are thanked for support with XRD and ICP-MS work, respectively.

References

- AELB (Agence de l'Eau Loire Bretagne), 2004. Mise en place d'un diagnostic de surveillance du milieu littoral conforme à la directive cadre.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Amiard, J.-C., Gelland, A., Amiard-Triquet, C., Crouzet, C., 2007. Relationship between the lability of sediment-bound metals (Cd, Cu, Zn) and their bioaccumulation in benthic invertebrates. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 72, 511–521.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between suborganismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87–110.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut.* 157, 1127–1133.
- Berthet, B., Leung, K.M.Y., Amiard-Triquet, C., 2011. Inter- and intra-specific variability of tolerance: implications for bioassays and biomonitoring. In: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 49–84. (Chapter 3).
- Bonnard, M., Romieu, 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.* 15, 11–26.
- Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Rizzo, C., Guibolini, 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.
- Buico, A., Cassino, C., Dondero, F., Vergani, L., Osella, D., 2008. Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: an ESR study. *J. Inorg. Biochem.* 102, 921–927.
- Burgeot, T., Gagné, F., Forget-Leray, J., Bocquené, G., 2010. Acetylcholinesterase: methodology development of a biomarker and challenges of its application for biomonitoring. ICES CM Code: F-25. In: Intern Council for the Exploration of the Sea, Annual Science Conference, 20–24 September 2010, Nantes, France. E-paper: <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2010/F2510.pdf>.
- Byrne, P.A., O'Halloran, J.O., 2001. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia* 465, 209–217.
- Canesi, L., Gacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as an unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21.

- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., 2009. Predicting diethorine metal toxicity from metal fluxes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4915–4921.
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Topping, B.R., Lopez, C.B., 2004. Stable isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve *Corbicula*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5002–5009.
- Croteau, M.-N., Dybowska, A., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5, 79–90.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* 45, 553–560.
- Dybowska, A.D., Croteau, M.-N., Misra, S.K., Berhanu, D., Luoma, S.N., Christian, P., O'Brien, P., Valsami-Jones, E., 2011. Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environ. Pollut.* 159, 266–273.
- Eisler, R., 2007. *Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals*. Elsevier Science Ltd, Oxford.
- Fabrega, J., Luoma, S., Tyler, C., Galloway, T., Lead, J., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517–531.
- Fabrega, J., Tantra, R., Asmer, A., Stolpe, B., Tomkins, J., Fry, T., Lead, J.R., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2012. Sequestration of zinc from zinc oxide nanoparticles and life cycle effects in the sediment dweller amphipod *Corophium volutator*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1128–1135.
- Fairbairn, E.A., Keller, A.A., Madler, L., Zhou, D., Pekbel, S., Cherr, G.N., 2011. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *J. Hard. Mater.* 192, 1565–1571.
- 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. Int.* 18, 1253–1263.
- Gorbi, S., Benedetti, M., Virno Lamberti, C., Pisanelli, B., Moltedo, G., Regoli, F., 2009. Biological effects of diethylene glycol (DEG) and produced waters (PWs) released from offshore activities: a multi-biomarker approach with the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Pollut.* 157, 3166–3173.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316.
- Hooper, H.L., Jurkschat, K., Morgan, A.J., Bailey, J., Lawlor, A.J., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., 2011. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environ. Int.* 37, 1111–1117.
- Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 49, 805–823.
- Kalman, J., Palais, F., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., Muniz, A., Blasco, J., Riba, I., Amiard-Triquet, C., 2009. Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organisation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 393, 35–67.
- Kalman, J., Buffet, P.-E., Amiard, J.-C., Denis, F., Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., 2010. Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Biomarkers* 15, 461–469.
- Keller, A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H., Cherr, G., Cardinale, B., Miller, B., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1962–1967.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.H., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825–1851.
- Knight, J., Pieper, R., McClellan, L., 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem.* 34, 2433–2438.
- Kool, P.L., Ortiz, M.D., van Gestel, C.A.M., 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl2 to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Pollut.* 159, 2713–2719.
- Larner, F., Dogra, Y., Dybowska, A., Fabrega, J., Stolpe, B., Bridgestock, L.J., Goodhead, R., Weiss, D.J., Moger, J., Lead, J.R., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Rehkämper, M., 2011. Tracing bioavailability of ZnO nanoparticles using stable isotope labelling. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1000–1007.
- Luoma, S., Rainbow, P.S., 2008. *Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mann, H.B., Whitney, D.R., 1947. On a test whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.* 18, 50–60.
- Müller, R.J., Lenihan, H.S., Müller, E.B., Tseng, N., Hanna, S.K., Keller, A.A., 2010. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7329–7334.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32, 967–976.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2005. A short-term sublethal *in situ* toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2010–2018.
- Moreira, S.M., Lima, I., Ribeiro, R., Guilhermino, L., 2006. Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: laboratory and *in situ* assays. *Aquat. Toxicol.* 78, 186–201.

Please cite this article as: Buffet, P.-E., et al., Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the.... *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

ARTICLE IN PRESS

8

P.-E. Buffet et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 8 (2012) 1–11

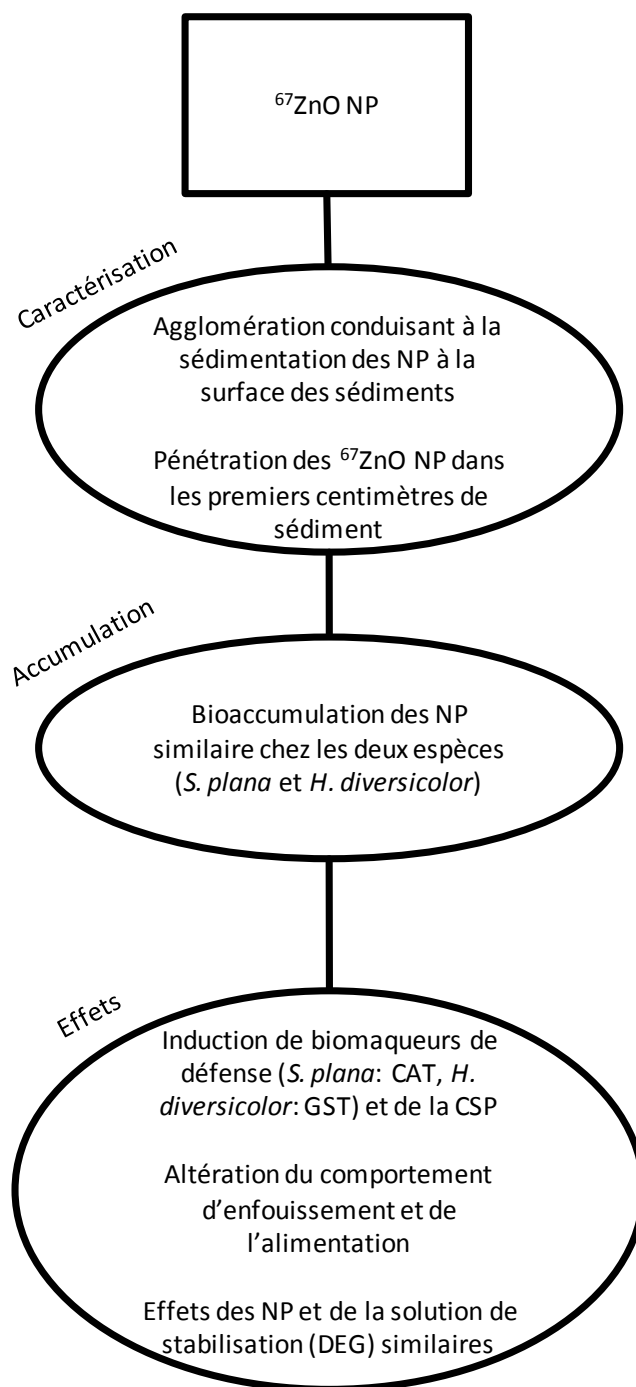
- Mortimer, M., Karamets, K., Kabu, A., 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269, 182–189.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestoidea gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Mühling, M., Bradford, A., Readman, J.W., Somerfield, P.J., Handy, R.D., 2009. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.* 68, 278–283.
- Pan, J.-F., Buffet, P.-E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Guibolini, M., Rizzo de Faverney, C., Romeo 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.
- Pang, C., Selck, H., Mitra, S.K., Berhane, D., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., Forbes, V., 2012. Effects of sediment-associated copper on the deposit-feeding snail, *Potamopyrgis antipodarum*: a comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 114–122.
- Poirier, L., Berthet, B., Amiard, J.-C., Joandet, A.Y., Amiard-Triquet, C., 2006. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 86, 71–82.
- Regoli, F., Benedetti, M., Giuliani, M.E., 2011. Antioxidant defences and acquisition of tolerance to chemical stress. In: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Romeo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 153–173. (Chapter 7).
- Rodgers, D.W., Lev, S.M., Snodgrass, J.W., Ownby, D.R., Prince, L.M., Casey, R.E., 2011. An enriched stable isotope technique to estimate the availability of soil Zinc to *Lumbricus terrestris* (L.) across a salinization gradient. *Environ. Toxicol.* 30, 607–615.
- Solé, M., Kopecka-Pilaszczuk, 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.
- Stuart, A.R., Amstad, E., Gauckler, L.J., 2007. Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir* 23, 1081–1090.
- Tiede, K., Hasselöv, M., Breitbarth, E., Chaudhry, Q., Boxall, A.B.A., 2009. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 1216, 503–509.
- Underwood, A.J., 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 19, 513–605.
- Wang, H., Wick, R.L., Xing, B., 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollut.* 157, 1171–1177.
- Worrall, C.M., Widdows, J., 1983. Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 12, 281–287.

2. Conclusion et perspectives

Cette expérience montre que les ZnO NP s'agglomèrent dans l'eau de mer et se déposent rapidement à la surface des sédiments. Sur une période de temps relativement courte (16 jours), elles pénètrent dans le premier centimètre de sédiment. Nos résultats soulignent que les ZnO NPs sont biodisponibles pour les deux espèces qui accumulent des concentrations similaires. L'exposition aux ^{67}ZnO NP a induit l'activité de la CAT chez *S. plana* et l'activité GST chez *H. diversicolor*. L'activité de la CSP-3 a été modifiée chez les deux espèces exposées à des ^{67}ZnO NP. Le comportement des deux espèces a été altéré après exposition aux ^{67}ZnO NP. Puisque les réponses des organismes exposés au DEG seul sont très similaires à celles des animaux exposés au ^{67}ZnO NP, il est difficile d'établir si la toxicité est due à un "effet nanoparticule".

Les techniques de marquage de NP avec des isotopes semblent constituer des outils de choix pour surmonter la difficulté de suivi de certains types de NP dans les matrices complexes. Ils sont particulièrement intéressants pour l'étude du Cu ou du Zn qui sont naturellement présents dans les tissus biologiques puisque ce sont des métaux essentiels (Misra et al. 2011) et dans les sédiments (Dybowska et al. 2011). Ces techniques offrent également un avantage certain pour travailler avec des doses faibles "réalistes" sur le plan environnemental (Croteau et al. 2004) et pour mesurer la bioaccumulation sur des périodes d'expositions assez courtes.

Synthèse du chapitre 6



**Chapitre 7 : Réponses comportementales et
biochimiques de deux invertébrés marins
Scrobicularia plana et *Hediste diversicolor*
exposés à des nanoparticules d'oxyde de cuivre:
Comparaison d'une expérience en laboratoire et
d'une expérience en mésocosme**

1. Contexte de l'étude

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en avant le rôle de différents compartiments (eau, voie alimentaire, sédiment) dans le comportement et les effets des NP. L'étape ultime pour approcher la réalité environnementale consiste à relier tous ces compartiments afin d'étudier le risque potentiel des NP pour les organismes dans leur environnement. En l'absence de moyens techniques fiables pour quantifier les NP dans l'environnement et donc dans l'impossibilité de réaliser des expériences *in situ*, une des solutions consiste à travailler avec des mésocosmes. Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats de l'étude des effets du CuO NP sur nos modèles biologiques en mésocosme. Le deuxième objectif sera de comparer les résultats sur l'écotoxicité des CuO NP, évaluée chez *S. plana* et *H. diversicolor* après une exposition par la colonne d'eau et après l'exposition des deux espèces sentinelles dans des mésocosmes en milieu naturel.

Les mésocosmes sont des écosystèmes expérimentaux qui permettent de reproduire les conditions du milieu tout en contrôlant les facteurs environnementaux afin d'évaluer les effets de contaminants à des niveaux d'organisation allant de l'individu à la population. Ces systèmes ont été utilisés depuis plus de 20 ans en révélant leur pertinence pour réaliser des expériences d'écotoxicologie. Les avantages de ces outils sont les suivants :

- Possibilité de simuler des conditions environnementales assez complexes et réalistes.
- Le niveau de complexité du système permet d'assurer le maintien des communautés sur le long terme ;
- Il est possible de réaliser un suivi important par des mesures répétées des facteurs physico-chimiques et biologiques ;
- L'acquisition et l'interprétation sont facilitées par rapport aux études *in situ*, dans lesquelles de nombreux paramètres non contrôlés peuvent intervenir.

Malgré les possibilités intéressantes que nous offrent les mésocosmes, la perception de cet outil par la communauté scientifique est contrastée. Les questions les plus souvent évoquées concernent plus particulièrement le réalisme et la répliquabilité des mésocosmes (Caquet, 2002). Ces problématiques peuvent être surmontées par l'instauration rigoureuse

d'un cadre d'étude. En effet, les mésocosmes ont pour but de nous permettre de comprendre, ou d'approcher les mécanismes principaux qui peuvent influencer les effets d'une contamination. Dans un premier temps, la taille du système doit être adaptée. Bien que traditionnellement la définition de la taille des systèmes ait permis de distinguer les microcosmes, mésocosmes et macrocosmes, la majorité des experts considèrent que c'est le fonctionnement sur le long terme de l'écosystème qui est le facteur le plus important (Caquet, 2002). Les écosystèmes de très grande taille sont généralement très difficiles à répliquer et à entretenir. La complexité et la représentativité écologique sont généralement augmentées quand la répliquabilité diminue. En d'autres termes, il est nécessaire de cibler et limiter les paramètres importants à intégrer au système. Le fait d'augmenter le nombre de paramètres entraînerait irrémédiablement une complexité de l'interprétation des résultats. Dans notre cas, nous avons choisi de travailler en extérieur, dans des mésocosmes de taille moyenne en intégrant le biofilm et les variations de marée qui sont les deux paramètres les plus importants dans le cycle de vie des invertébrés endobenthiques.

La dose de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu a été choisie nous permettant ainsi de comparer nos résultats avec l'exposition réalisée dans la colonne d'eau. Aux regards des deux expériences, nous pourrions donc estimer l'importance des paramètres environnementaux (sédiment, biofilm, cycle tidal) dans les réponses biochimiques et comportementales de nos deux modèles biologiques.

**Publication 6: Behavioural and biochemical
responses of two marine invertebrates
Scrobicularia plana and *Hediste diversicolor* to
copper oxide nanoparticles**



Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles

Pierre-Emmanuel Buffet^{a,b}, Olivia Fossi Tankoua^a, Jin-Fen Pan^{a,g}, Deborah Berhanu^c, Christine Herrenknecht^a, Laurence Poirier^a, Claude Amiard-Triquet^a, Jean-Claude Amiard^a, Jean-Baptiste Bérard^d, Christine Risso^e, Marielle Guibbolini^e, Michèle Roméo^e, Paul Reip^f, Eugenia Valsami-Jones^c, Catherine Mouneyrac^{a,b,*}

^a Université de Nantes, MMS, EA2160, Faculté de pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France

^b Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CERE, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 01, France

^c Department of Mineralogy, Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK

^d Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France

^e Université de Nice-Sophia Antipolis, EA ECOHIER, Faculté des Sciences, Parc Valrose, BP 71, 06108 Nice, Cedex 2, France

^f Intrinsic Materials Limited, Y25 Cody Technology Park, Farnborough, GU14 0LX, UK

^g College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2010

Received in revised form 28 January 2011

Accepted 2 February 2011

Available online 26 February 2011

Keywords:

Copper oxide nanoparticles

Behaviour

Biomarkers

Oxidative stress

Scrobicularia plana

Hediste diversicolor

ABSTRACT

Engineered nano-sized Cu oxide particles are extensively used in diverse applications. Because aquatic environments are the ultimate “sink” for all contaminants, it is expected that nanoparticles (NP) will follow the same fate. In this study, two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* were chosen as ecotoxicological models. The aim was to evaluate behavioural (burrowing kinetics, feeding rate) and biochemical (biomarkers) responses of *S. plana* and *H. diversicolor* exposed in the laboratory to Cu (10 µg L⁻¹) added in natural seawater either in the form of engineered nanoparticles (NPs) of CuO or as dissolved Cu in 2% HNO₃. Exposure was characterized by considering (i) the physico-chemical fate of NP (ii) the fraction of labile Cu in experimental media and (iii) Cu bioaccumulation. Results showed high aggregation of CuO NPs in seawater and no additional bioavailable Cu concentrations. Behavioural impairments were observed in *S. plana* exposed to CuO NPs or soluble Cu whereas in *H. diversicolor*, only the exposure to soluble Cu led to a burrowing decrease. No obvious neurotoxicity effects were revealed since in both species, no changes in cholinesterase activity occurred in response to both forms of Cu exposure. Biomarkers of oxidative stress catalase and glutathione-S-transferase were enhanced in both species whereas superoxide dismutase was increased only in *S. plana* exposed to CuO NPs. Metallothionein-like protein was increased in bivalves exposed to both forms of Cu. Since, no detectable release of soluble Cu from CuO NPs occurred during the time of experiment, ecotoxicity effects seem to be related to CuO NPs themselves.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Because the physicochemical properties of nanoparticles are distinct from their bulk counterparts, the fast growth of nanotechnologies has brought new industrial and business opportunities. For instance, engineered nano-sized copper oxide particles (CuO NP) are commonly used as bactericides and have the potential to replace noble metal catalysts for carbon monoxide oxidation (Zhou et al., 2006). CuO NP suspensions (nanofluids) have excellent

thermal conductivity and are used as a heat transfer fluid in machine tools (Chang et al., 2005). Health and environmental concerns on free engineered nanoparticles (ENPs) have been highlighted in several reports (Royal Commission on Environmental Pollution, 2008; European Commission, 2009). Because aquatic environments are the ultimate “sink” for all contaminants, it is expected that ENPs will follow the same fate (Kaegi et al., 2008). Environmental monitoring data of engineered NPs, arising from use in consumer products, are currently lacking, which could be due to the difficulty to detect and quantify ENPs in complex matrices, such as water, sediments, and soils, as well as in organisms and their susceptible tissues (Wiesner et al., 2006; Nowack and Bucheli, 2007). Most of the ecotoxicological studies published are conducted with high NP concentrations, probably unrealistic from

* Corresponding author at: Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CERE, Université Catholique de l'Ouest, 44, rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 01, France. Tel.: +33 241816645; fax: +33 241816674.

E-mail address: catherine.mouneyrac@univ-nantes.fr (C. Mouneyrac).

an environmental point of view as indicated by Predicted Environmental Concentrations of ENPs arising from use in consumer products (Tiede et al., 2009).

In order to investigate putative ecological impairments caused by ENPs, it is necessary to select species which have a key role in the structure and functioning of ecosystems and are recognized as good models for biomonitoring purposes. In this way, marine invertebrates such as the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* (Byrne and Halloran, 2001; Solé et al., 2009) represent good candidates. Soluble forms of copper are highly toxic to aquatic organisms (Eisler, 2007; Luoma and Rainbow, 2008). In the case of Cu-containing NPs, the release of Cu and its speciation may be a key factor in their ecotoxicity, besides that related to the nanoparticle itself. Biomarkers of defence metallothionein: MT, catalase: CAT, glutathione-S-transferase: GST, superoxide dismutase: SOD and damage thibarbutic acid reactive substances: TBARS, cholinesterase: ChE are commonly used in environmental assessment (Lagadic et al., 2000; Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Lactate dehydrogenase (LDH) activity, as the terminal enzyme of anaerobic glycolysis, plays an important function in anaerobic metabolism (Gagnon and Holdway, 1999; Diamantino et al., 2001). Clams (*S. plana*) are able to maintain a working anaerobic metabolism under anoxia and hydrogen sulphide exposure (Oeschger and Pedersen, 1994). Induction in LDH activity due to chemical stress has been reported in different species of bivalves such as *S. plana* (Baldina-Cosquerie et al., 2010), *Perna viridis* (Nicholson and Lam, 2005), *Donax trunculus* (Tlili et al., 2010) and polychaetes such as *H. diversicolor* (Moreira et al., 2006). In addition, behavioural biomarkers are sensitive tools to assess the impact of the contaminants at concentrations far below the lethal effect (Amiard-Triquet, 2009).

Nanoparticles of CuO were identified as being important in ecotoxicological assays due to their relatively low dissolution rate but their potentially high toxicity towards organisms (Stone et al., 2010). Thus, the aim of the present study was to evaluate biochemical and behavioural responses of two marine endobenthic invertebrates, *S. plana* and *H. diversicolor*. We selected an aqueous medium because it was difficult to distribute evenly and reliably NPs in a natural sediment medium and both intra-sedimentary species studied were able to freely contact with pollutants in the aqueous medium. Indeed, *H. diversicolor* is a hemisessile polychaete living in galleries aerated by water fluxes generated by body movement. It creates a burrowing environment that may be relatively independent of the surrounding sediment since the burrow is coated by the secretion of a mucus layer. In the case of *S. plana*, the cavity oxygenate water is flushed through the burrow from time to time and within the animal the soft tissues are bathed in pallial fluid with is primarily seawater. Both species were exposed in the laboratory to environmentally relevant Cu levels ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) added in natural filtered seawater either in the form of engineered CuO NP or as soluble Cu. This Cu level ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) was reported in marine environments highly contaminated by this metal (Bryan and Langston, 1992). Exposure was characterized by considering the fate of NP (size distribution and fraction of labile Cu in experimental media) and Cu bioaccumulation.

2. Material and methods

2.1. Chemicals used and particle characterization

CuO nanopowder was obtained from a commercial source (Intrinsiq Materials Limited) with the particle size specified by the manufacturer as 10–100 nm. A stock suspension of CuO nanoparticles (25 mg L^{-1}) was prepared in deionized water (DIW), stored at 20 °C and used for testing within 2 weeks. Before use, this

stock suspension was sonicated for 5 min (Ultrasonicator BRANSON B-1200 E2 HF 100 W). A stock solution of dissolved Cu as CuNO_3 (1 g Cu L^{-1} , in 2% HNO_3 w/w) was purchased from Fluka Analytical. All the other chemicals were purchased from Sigma Aldrich.

The stability of CuO NP in both DIW (stock solution used within 2 weeks after preparation) and in the experimental medium (natural seawater) in the absence ($t = 0$) and presence ($t = 2 \text{ d}$) of organisms was monitored by dynamic light scattering (DLS). A suspension of CuO nanoparticles (25 mg L^{-1}) in DIW was ultrasonicated for 10 s and the hydrodynamic diameter of the particles was measured using DLS (Malvern, Zetasizer Nano ZS). Then, 5 μL of this stock solution were spiked into natural seawater ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu final concentration), and subsequently the size distribution and zeta potential of CuO nanoparticles were measured.

2.2. Animal collection and acclimatization

Worms (*H. diversicolor*) and bivalves (*S. plana*) were collected by hand from an intertidal mudflat (upper 20 cm depth) in the Bay of Bourgneuf ($2^{\circ}04'40.60''\text{W}$, $46^{\circ}56'23.08''\text{N}$), located on the West Atlantic coast (France), in July 2009. This site is monitored by the French "Mussel Watch" Programme (Réseau National d'Observation, 2006) and is documented as relatively clean (Kalman et al., 2009). Only bivalves with shell length ranging from 15 to 20 mm were selected to avoid any potential influence of sexual maturity. Worms from the same size were selected to avoid a potential influence of weight ($0.40 \pm 0.13 \text{ g}$ mean wet weight) and they were collected in June which did not correspond to the period of sexual maturity (Mouneyrac et al., 2010). Then, *H. diversicolor* and *S. plana* were transported to the laboratory in cool boxes with sediment from the collection site. In the laboratory, animals were allowed to eliminate their gut contents and acclimatize for 48 h in aerated natural seawater, UV treated and filtered through $0.45 \mu\text{m}$. This acclimatization time period was chosen after Poirier et al. (2006) and Burlinson and Lawrence (2007).

2.3. Exposure protocol

Bivalves (*S. plana*) were placed into 2.2 L polypropylene aquaria (12 individuals/tank) filled with 2 L seawater and worms (*H. diversicolor*) were introduced individually in plastic beakers of 100 mL filled with 50 mL seawater. Three treatments: (i) natural seawater only; (ii) CuO NPs: $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$; and (iii) dissolved Cu: $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, were carried out in a triplicate design (three tanks per treatment for each species) during 16 d for *S. plana* and 7 d for *H. diversicolor*, using a semi-static exposure regime, in the dark at the temperature they experienced in their sediment of origin at this period of the year (21 °C). The experimental media (water and contaminant) were renewed every other day. In order to avoid interferences between food and the fate of NPs, invertebrates remained unfed during the whole experiment. Previous studies carried out in our laboratory have shown that fast did not induce any decrease of the condition index of clams or histopathological changes for both species.

2.4. Metal quantification in experimental medium

The estimation of dissolved fraction of Cu was determined during *S. plana* exposure in laboratory to seawater only (Controls), soluble Cu or CuO NP, by using DGT tools (diffusive gradients in thin films) (Davison and Zhang, 1994).

This technique, based on mass transport control of the chemical species of interest from water or sediment pores water, uses two hydrogel layers. A polyacrylamide gel is used as the diffusive layer, and is backed up with a second thin gel layer containing a Chelex

cation-exchange resin selective for trace metals. The diffusive layer of known thickness is placed in the DGT probe on top of the binding phase and covered with a filter used to avoid biofouling. Ions diffuse through the filter and diffusive layer to reach the Chelex resin. The mass of the diffused ion, M , can be obtained by direct measurement of the ion concentration (C_r) in the resin layer with total volume of resin V_r :

$$M = C_r V_r$$

The DGT disc units (2.5 cm diameter corresponding to a 3.14 cm² diffusive area) were purchased from DGT Research Ltd. A Chelex-100 resin beads and a diffusive gel with a pore size of about 5 nm were used (open pore diffusive gel) (Zhang and Davison, 1999). The thickness of gel was 0.82 mm. A filter of 0.14 mm thickness and 0.45 µm pores size covered the gel.

For each condition, 8 DGT units were deployed in the tanks containing *S. plana* individuals and placed in temperature controlled room (22 °C). In order to avoid a bias due to the presence of DGT units in the medium, these individuals were not employed for biological tests.

Measurement of metal accumulated by the DGT units was realised on day 0, 3, 7 and 16 (2 DGT per sampling day). After sampling, DGT units were washed with ultra-pure water (Milli-Q) and placed in 1.5 mL vials. One millilitre of 1 M HNO₃ was added and left for a day to elute copper from the Chelex resin. Copper determination was performed by graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectraAA 800) in either neat or diluted samples of the 1 M HNO₃ eluent. Mass of metal accumulated (M) by the DGT unit was calculated as follows:

$$M = C_e V_e = C_e (V_g + V_e) / f_e$$

where C_e is the Cu concentration in HNO₃ (µg L⁻¹), V_g and V_e , the volumes of the gel (0.15 L) and the eluent (1.10 L) respectively and f_e , the elution factor (0.8).

2.5. Biochemical markers

For each biomarker, 10 bivalves were collected from the three different tanks ($n = 3$ or $n = 4$ taken randomly from each tank) corresponding to each experimental condition. After exposure, the length and the total weight of bivalves were recorded. After removal of the shells, the soft tissues were carefully wiped with absorbent paper and stored at -80 °C until biochemical analysis. For worms, following exposure, they were carefully wiped with absorbent paper, weighed individually and stored at -80 °C until biochemical analysis. For MTLF and LDH, measurements were carried out individually ($n = 10$ for each biomarker). For GST, CAT, SOD, TBARS and ChE, determinations were carried out on 5 pools of 2 individuals per species (*H. diversicolor*, *S. plana*) per treatment.

Because previous studies revealed that metallothionein-like protein (MTLP) determination was not a relevant biomarker of metal exposure in *H. diversicolor* (Poirier et al., 2006), MTLP analyses were performed only in bivalves (*S. plana*). The whole soft tissues of *S. plana* were homogenised at 4 °C in 20 mM TRIS, 10⁻³ mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF), 150 mM NaCl adjusted to pH = 8.6 (4 mL g⁻¹ soft tissue). The soluble (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by centrifugation at 30 000g for 30 min at 4 °C. An aliquot of the soluble fraction (S1) was heated at 75 °C for 15 min. Then MTLFs (i.e. heat-stable thiolic compounds) were isolated by centrifugation (15 000g for 10 min at 4 °C) and determined by Differential Pulse Polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al., 2002). The standard addition method was used for calibration with rabbit liver MT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in the absence of a marine bivalve MT standard.

For GST, CAT, SOD, TBARS and ChE, pooled soft tissues were homogenised at 4 °C to prevent enzyme or tissue degradation in TRIS buffer (TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, antiprotease mixture (Sigma P8340, diluted in 1/1000) adjusted to pH 7.4 in a 1:3 ratio (w/v) using a motor-driven glass-Teflon homogenizer at 500 rpm. The homogenates were then centrifuged for 25 min at 9000g. Supernatants were immediately frozen at -80 °C as 50 µL aliquots until biomarker analysis. An aliquot of the homogenate was centrifuged (9000g for 30 min at 4 °C) and the resulting supernatant was used directly in the enzyme assay. GST activity was determined spectrophotometrically at 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) by monitoring the formation of 1-glutathion-2,4-dinitrobenzene, resulting from the conjugation of the substrate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), with glutathione reduced form (GSH), as described by Habig et al. (1974). Results were expressed as nmoles of glutathione conjugate produced per min and per mg protein (nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein). CAT activity was estimated spectrophotometrically as the decrease in absorbance at 240 nm ($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to dismutation of hydrogen peroxide (H₂O₂) according to Claiborne (1985). Results were expressed as µmoles of H₂O₂ transformed per min and per mg protein (µmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein). SOD activity was determined as the degree of inhibition of cytochrome C reduction by superoxide anion radicals generated by xanthine oxydase/xanthine reaction at 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). Results were expressed as SOD Unit per mg protein (SOD Unit mg⁻¹ protein). One unit of SOD activity was defined as the amount of sample producing 50% inhibition in 1 mL reaction system per mg protein. ChE activity was determined using the method of Ellman and Courtney (1961) adapted to a microplate reader by Galgani and Bocquene (1991). Results were expressed as nmoles of thiocholine produced per min and per mg protein (nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein). In the case of *H. diversicolor*, Scaps and Borot (2000) have characterized the presence of acetylcholinesterase whereas in *S. plana* it is not clear if only AChE or also pseudocholinesterases are able to hydrolyse the substrate used. Thus in the all paper, we will use the abbreviation ChE for cholinesterases. Lipid peroxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), quantified by reference to MDA absorbance ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 530 nm (Halliwell and Gutteridge, 1985). Results were expressed as nmoles of TBARS produced per mg protein (nmoles of TBARS mg⁻¹ protein).

For LDH determination, an aliquot of the homogenate prepared as described above for GST (but with individual specimens) was centrifuged at 3300g for 5 min at 4 °C. Measurement of LDH activity was realized with a microplate reader as described in Diamantino et al. (2001). Proteins were quantified in the supernatants according to Bradford (1976).

2.6. Metal quantification in animals

For bivalves, Cu was determined in the pellets and supernatants, the preparation of which has been described above for MTLF determination. Cu bioaccumulation was estimated in the whole soft tissues of worms (*H. diversicolor*, $n = 9$ per condition). Animal tissues were digested by heating (90 °C) with Aqua Regia (HCl/HNO₃:75/25) after preliminary tests showing that pure HNO₃ was not sufficient to insure a complete dissolution of Cu from CuO NP. Then, the quantification of Cu concentrations was performed by using Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS, Varian SpectraAA800 spectrophotometer) with deuterium lamp background correction. Standard addition analyses were performed in an isomedium and added concentrations of Cu were 125 ng mL⁻¹, 250 ng mL⁻¹, 500 ng mL⁻¹, 1000 ng mL⁻¹. All labware were cleaned in 10% hydrochloric-acid bath for 24 h and rinsed three times with DIW before being used. The accuracy of

the analyses was checked by digesting certified material (Mussel tissue, National Institute of Standards and Technology). In the case of bivalves, the total concentration was recalculated by adding concentrations of Cu in pellet and supernatant.

2.7. Behavioural experiments

For burrowing tests, 20 bivalves were collected from the three different tanks ($n = 6$ or $n = 7$ taken randomly from each tank) corresponding to each experimental condition. For feeding tests, all the bivalves were involved ($n = 36$ per condition distributed in three different tanks). Both burrowing and feeding tests were carried out with 20 ragworms per condition. At the end of the behavioural tests, animals were returned in their experimental medium of origin. This procedure is acceptable since Burlinson and Lawrence (2007) have shown that burrowing organisms were not affected by consecutive behavioural assays.

2.7.1. Burrowing tests

Bivalves (*S. plana*) and worms (*H. diversicolor*) were submitted to burrowing tests as described by Bonnard et al. (2009), after being previously exposed in the laboratory for 4 d to seawater only (controls), CuO NPs or dissolved Cu as described in exposure protocol sub-section (see above). For bivalves (*S. plana*), burrowing experiments were carried out in plastic containers filled with 3 cm of natural sediment (collected from sampling site) and

topped up with 2 L of seawater. Natural sediment was homogenised by hand 1 d before experimentation. Burrowing behaviour was studied by placing individuals on the surface of the sediment and observing the number which had burrowed at frequent intervals; every 5 min in the 1st hour, every 10 min in the 2nd hour, every 20 min in the 3rd and 4th hour, then every hour until 6 or 7 h of test. Twenty individuals of *H. diversicolor* were tested for each studied condition. Briefly, we used plastic clean containers of 100 mL filled with 5 cm of wet sediment from the site of origin. Twenty worms were placed individually on the sediment and their positions were recorded every two min during 30 min.

2.7.2. Feeding rate

The feeding rate was estimated for bivalves (*S. plana*) and worms (*H. diversicolor*) previously exposed for 11 or 7 d respectively, to seawater only (Controls), CuO NPs or soluble Cu. The feeding rate of *S. plana* was quantified according to the methodology described by Worrall and Widdows (1983) and adapted to our conditions. Algae *Tetraselmis suecica* supplied by IFREMER were used as food at a concentration of 10 000 cell mL⁻¹ in each tank. The concentration of algae not ingested by bivalves was measured after 1 h. The feeding rate of *H. diversicolor* was quantified according to the methodology described by Moreira et al. (2005). Twenty worms were fed 100 *Artemia salina* larvae into their individual plastic beakers containing 50 mL of seawater. They were left undisturbed for 1 h, then the remaining larvae were collected and

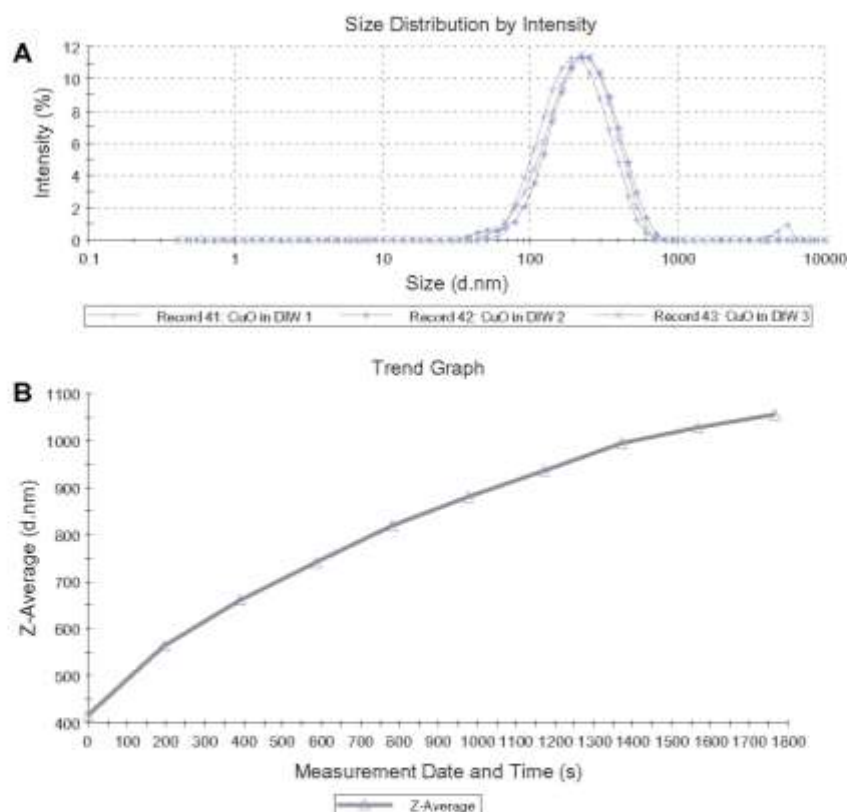


Fig. 1. Size distribution (A) of CuO nanoparticles in DW and evolution of the size of CuO nanoparticles when a drop of sea water ($t = 2$ d) is incorporated in the DW suspension (B).

counted and results were expressed as the number of larvae ingested per hour per individual.

2.8. Statistical analysis

The burrowing kinetic curves were ln-transformed in order to linearize these data and then, they were compared by using analysis of covariance (ANCOVA) between regression coefficients of the least-square best-fit regression lines. Otherwise, results are presented as mean $\pm$ SD. Significant differences were established by using one-way analysis of variance (ANOVA) or non-parametric Mann and Whitney comparison tests when variances of groups were different. Level of significance was established at $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed by using Xlstat pro 7.5.

3. Results

3.1. Fate of CuO nanoparticles in the experimental medium

Size distribution of CuO NP in DIW ranged from 40 nm to 500 nm with an average of 197 nm (Fig. 1A) and the prepared suspension was stable for approximately 1 month. When diluted in sea water (at both $t = 0$ and $t = 2$ d where animal stayed during 2 d), the NPs aggregate/agglomerate and the sample is not suitable for DLS measurements. Fig. 1B shows how rapidly the size of the particles increases when 5 μ L of sea water is added in the DIW suspension. Zeta potential measurements show that the particles are relatively highly positively charged (26.3 mV) in DIW, which corroborates the stability of the suspension, while the NPs appear slightly negatively charged in seawater collected at $t = 0$ and $t = 2$ (-8.69 and -7.72 mV respectively), an indication of poor stability.

3.2. Cu in the exposure medium

Fig. 2 shows the mass of copper accumulated by DGT units during the 16 d of laboratory exposure to seawater only (Controls), dissolved Cu or CuO NPs. The results obtained for DGT exposed to CuO nanoparticles, at a nominal concentration of $10 \mu\text{g}$ of Cu L^{-1} , demonstrated that the masses of copper accumulated were similar to those accumulated by DGT units deployed in control tanks and significantly lower than those obtained with DGT units exposed to soluble copper (respectively on day 16: $0.338 \pm 0.012 \mu\text{g}$; $0.383 \pm 0.055 \mu\text{g}$, $1.017 \pm 0.033 \mu\text{g}$). This result indicates that no detectable liberation of labile copper from NPs occurred in the medium during the time of experiment.

3.3. Cu bioaccumulation

Cu concentrations in the whole soft tissues of *S. plana*, exposed in the laboratory during 16 d and *H. diversicolor* exposed during 7 d to seawater only (Controls), CuO NPs ($10 \mu\text{g}$ Cu L^{-1}) and soluble Cu ($10 \mu\text{g}$ Cu L^{-1} in 1 M of HNO_3) are illustrated in Table 1. Bivalves (*S. plana*) and worms (*H. diversicolor*) exposed to both forms of copper (CuO NPs and soluble Cu) showed significantly higher concentrations compared to controls. In addition for both species, no significant differences were observed depending on the form of Cu in the exposure medium.

3.4. Biomarkers

Measurements of biomarkers of defences and damages in bivalves (*S. plana*) and worms (*H. diversicolor*) are illustrated in Table 2. In both species exposed to CuO NPs, catalase and GST activities increased significantly compared to controls. In *H. diversicolor*, catalase activity also increased significantly after soluble Cu

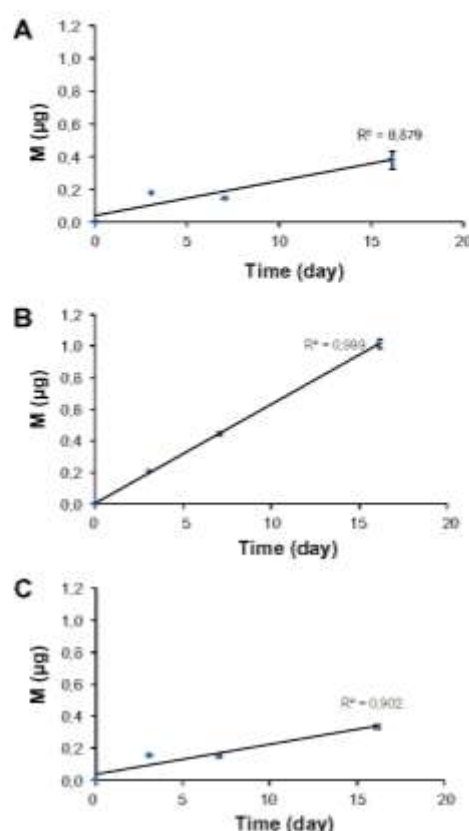


Fig. 2. Mean mass (and standard deviation) of copper accumulated (μg) by DGT units ($n = 8$) during the time of exposure. (A) Control; (B) Soluble Cu; (C) CuO NP.

Table 1

Mean (ng g^{-1} wet weight) copper concentrations (and SD between brackets) in *Scrobicularia plana* and in *Nereis diversicolor* (whole soft tissues) exposed in the laboratory to Cu ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) either in the form of CuO NP (CuO NPs), soluble Cu and seawater only (Controls). Concentrations with different superscripts differed significantly at the 95% level in each species.

	<i>S. plana</i>	<i>N. diversicolor</i>
Controls	3634 (1915) ^a	1006 (132) ^a
Soluble Cu	5998 (3023) ^b	1431 (583) ^b
CuO NP	7495 (2379) ^b	1570 (302) ^b

exposure treatments. In bivalves, SOD activity was significantly higher in animals exposed to CuO NP compared to controls or animals exposed to soluble Cu. MTLP concentrations increased in bivalves exposed to both forms of copper (soluble Cu, CuO NPs), but significantly only for soluble Cu. For both species, no damages were observed according to the results of TBARS, LDH and ChE.

3.5. Burrowing behaviour

The burrowing behaviour of *S. plana* and *H. diversicolor* (previously exposed for 4 d to soluble Cu, CuO NPs as well as controls) in sediment collected from their site of origin is shown in Fig. 3A and B. Slopes and regression coefficients of the best-fit regression

Table 2
Means (and SD between brackets) of biomarkers quantified in *Heris diversicolor* after 7 d and *Scrobicularia plana* after 16 d of exposure treatments (Controls, soluble Cu, CuO NP), for both species, biomarker levels with different superscripts differed significantly at the 95%.

Biomarkers	Scrobicularia plana			Heris diversicolor		
	Controls (n = 5)	Soluble Cu (10 µg L ⁻¹) (n = 5)	CuO NP (10 µg L ⁻¹) (n = 5)	Controls (n = 5)	Soluble Cu (10 µg L ⁻¹) (n = 5)	CuO NP (10 µg L ⁻¹) (n = 5)
Defences	CAT (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	80.98 (3.53) ^a	119.35 (17.70) ^b	53.27 (2.46) ^a	78.05 (9.35) ^b	96.51 (13.45) ^c
	GST (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	311.40 (31.15) ^a	423.18 (36.26) ^b	81.19 (27.54) ^a	94.60 (31.84) ^{ab}	130.99 (11.81) ^b
	SOD (U SOD mg ⁻¹ protein)	6.40 (1.25) ^a	6.47 (0.82) ^a	75.45 (9.5)	73.76 (28.00)	72.45 (3.8)
	MTIP (µg g ⁻¹ tissues)	876.12 (182.23) ^a	1060.02 (211.85) ^b			
	LDH (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	20.57 (5.49)	18.97 (7.14)	552.03 (89.91)	514.02 (86.43)	569.50 (208.90)
Damages	TBAHS (nmol MDA mg ⁻¹ protein)	0.52 (0.11)	0.50 (0.05)	0.76 (0.20)	0.77 (0.12)	0.90 (0.014)
	AcHE (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	22.36 (6.24)	26.37 (9.28)	71.33 (14.23)	70.26 (17.69)	70.14 (8.61)

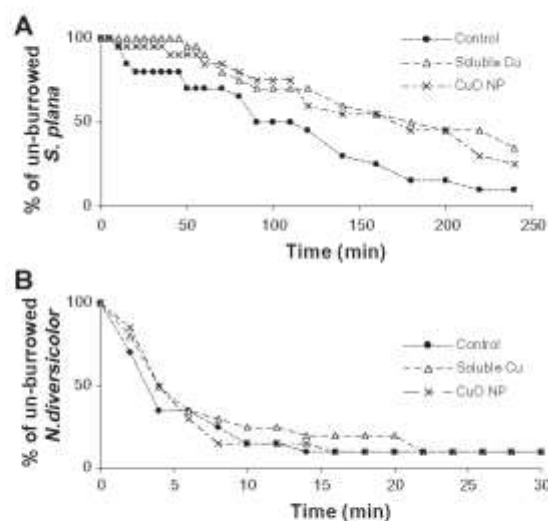


Fig. 3. Percentage of unburrowed clams (A) *Scrobicularia plana* (n = 20) and ragworms (B) *Hediste diversicolor* (n = 20) at different times (min). Animals were previously exposed to the different experimental conditions: sea water only (control ●), soluble copper Δ, CuO nanoparticles ×; and allowed to burrow in their sediment of origin (Bay of Bourgneuf).

lines obtained after ln transformation of the raw data are shown in Table 3. In *S. plana*, the burrowing behaviour was significantly impaired in bivalves exposed to CuO NP or to soluble form of Cu compared to controls. In the case of *H. diversicolor*, only the exposure to soluble Cu led to a significant decrease of burrowing kinetics compared to controls and CuO NP exposure.

3.6. Feeding rate

Feeding rates of *S. plana* and *H. diversicolor* were exposed (controls, soluble Cu, CuO NP) for 11 d or 7 d respectively. During the first hour of feeding, bivalves (*S. plana*) in control medium showed the highest feeding rates (6051 ± 1003 cells h⁻¹) while feeding rates were significantly impaired only for specimens from CuO NP exposure medium (3680 ± 1294 cells h⁻¹).

Concerning *H. diversicolor* feeding rates were not affected by experimental conditions (not shown).

4. Discussion

4.1. Exposure

The environmental fate and ecotoxicity of engineered NPs may be influenced by a number of properties, including particle size and

Table 3
Slopes and determination coefficients of the best-fit regression lines obtained after ln transformation of the raw data shown in Fig. 3. Slopes with different superscripts differed significantly at the 95% level.

Experimental conditions	Animals	Slope	Coefficient R ²
Control	<i>S. plana</i>	-0.0086 ^a	0.9604
Soluble Cu	<i>S. plana</i>	-0.0043 ^b	0.9664
CuO Nanoparticles	<i>S. plana</i>	-0.0051 ^b	0.9318
Control	<i>N. diversicolor</i>	-0.1433 ^a	0.9478
Soluble Cu	<i>N. diversicolor</i>	-0.0734 ^a	0.8545
CuO Nanoparticles	<i>N. diversicolor</i>	-0.132 ^a	0.8299

size distribution, state of aggregation, charge and solubility. Following release to the environmental systems, most engineered NPs are able to aggregate to some degree. The degree and kinetics of aggregation and the size range of the aggregates is dependent on the characteristics of the particles, the characteristics of the environmental system, and the concentration of the nanoparticles. As aggregation is likely to affect toxicity, characterization of NP in experimental media is essential for nanoecotoxicology (Tiede et al., 2009). In the present study, the particle size of CuO NP specified by the manufacturer ranged from 10 to 100 nm. However, actual characterization of CuO NP in DIW showed that particle size ranged from 40 nm to 500 nm with an average of 197 nm. In seawater, the CuO NP highly aggregated/agglomerated and the hydrodynamic size (or Z-average) increased rapidly to values of around 1000 nm within the duration of the test. According to Fabrega et al. (2011) aggregation enhances the rate at which NPs sink to the bottom, where their ingestion by animals that feed on sediments is possible. This mechanism is likely to occur in the case of *S. plana* which is "primarily a deposit-feeder [which] obtains only some of its food by filtering suspended matter from the sea" (Hughes (1969). *H. diversicolor*, as an opportunistic species, is considered able to fulfil its energy needs using different kinds of diet (Olivier et al., 1995). However, the aggregation/agglomeration of most NPs detected by DLS may not record the existence of some free NPs in the media, as previously expressed by Griffith et al. (2008).

In the case of metal-containing NPs such as CuO NPs, the release of metal ions and their speciation may also be a key factor in their (eco)toxicity. The presence of organisms can affect particle dissolution in exposure medium (Griffith et al., 2008). Thus, in this work, we studied the putative dissolution of Cu from CuO NP in real exposure (in the presence of animals) to estimate the contribution of dissolved Cu ions to overall cytotoxic effects. Solubility of copper oxide in water has been extensively studied under various pH and temperature conditions (Palmer et al., 2004). Models of bioavailability and of toxicity of copper ions have been proposed (Luoma and Rainbow, 2008). Since Zhang and Davison (1999) have described the DGT method, this has been widely used in environmental studies dealing with metal speciation in water (Pesavento et al., 2009). In the conditions of our experiment, DGT results indicated that no measurable release of labile Cu from CuO NPs occurred during the time of experiment (16 d). Griffith et al. (2008) showed similar results, with less than 1% by mass of the original dose present in dissolved form after 48 h for copper in a freshwater medium. In contrast, Blinova et al. (2010) found, also in freshwater, higher copper dissolution (12% of copper) from CuO NP using *Escherichia coli* Cu-sensor. This present work demonstrates the interest of using DGT techniques as a proxy to estimate the bioavailability of metals released from NP under soluble form in the aquatic environment.

4.2. Cu bioaccumulation

As documented earlier, both bivalves and worms exposed to soluble Cu in the experimental medium have incorporated Cu. Due to the limited period of exposure, the concentrations reached at the end of the experiment were orders of magnitude lower than those encountered in the most polluted estuaries (Bryan et al., 1980). Concentrations as high as $752 \mu\text{g g}^{-1}$ dw (about $150 \mu\text{g g}^{-1}$ ww) were determined in *S. plana* from the Erme estuary, UK and $1430 \mu\text{g g}^{-1}$ dw (about $286 \mu\text{g g}^{-1}$ ww) in *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor* from Restronguet Creek, UK. More interestingly, the concentrations reached in each species exposed to Cu as nanoparticles were identical to those due to soluble Cu, despite DGT results did not indicate any measurable release of labile Cu from CuO NPs occurring during the time of experiment. However, NP can also

be taken into the gut providing additional route for metal bioavailability. In a recent study, Galloway et al. (2010) using transmission electronic microscopy (TEM), observed that TiO_2 NPs were localized in the gut lumen in the marine polychaete *Arenicola marina*. Because we have seen that CuO NP was remarkably stable since pure HNO_3 was insufficient to solubilized them (see Section 2.6) it is less probable that they may be partially solubilized in the gut due to the moderate pH value in the gut of bivalves (pH: 4–5.2) and worms (pH: 5.5–6).

4.3. Ecotoxicity effects

The fate and ecotoxicity of particles of nanometric size in endobenthic organisms such as the bivalve mollusc *S. plana* and the ragworm *H. diversicolor* is very poorly known. Questions appeared since recent studies showed that NP can be more toxic than their bulk form (Blinova et al., 2010; Heinlaan et al., 2008) or micrometric particles (Karlsson et al., 2009). It was previously shown that the toxicity of bulk and CuO NPs was due to the solubilized bioavailable fraction, most likely Cu^{2+} ions (Heinlaan et al., 2008). Since no additional labile Cu in seawater exposure media (compared to controls) was registered during the time of experiment (16 d), we have to investigate about the specific toxicity from nanoparticulate copper.

Induction of MT, a cysteine-rich protein that binds metals and thus contributes to metal detoxification, has been reported in various aquatic species under *in situ* or laboratory metals exposure (Amiard et al., 2006). In addition, MTLP may be involved in the defence against oxidative stress (Viarengo et al., 1999). Several studies reported that nanoparticles contribute to oxidative stress (Unfried et al., 2007). Independently of any nanotoxicity, the Cu toxicity may be caused at least partly by the generation of reactive-oxygen species (Sun et al., 2009 and literature cited therein). In this work, an increase of MTLP was observed in bivalves exposed to Cu either as CuO NPs or soluble Cu. CAT, GST and SOD have been classified as antioxidant systems of defence in various aquatic species such as bivalves (Almeida et al., 2007). CAT and GST activities increased significantly in both species (*S. plana*, *H. diversicolor*) and SOD in *S. plana* exposed to CuO NP, suggesting an oxidative stress endured by animals. In *H. diversicolor* from a contaminated estuary, an enhancement of LDH activity (up to 1.5 fold) was interpreted as an increased rate of organisms' anaerobic metabolism, suggesting a rapid need of additional energy to ameliorate chemical stress (Moreira et al., 2006). In the present study, no changes in LDH activity were observed in both species in any cases of experimental exposure. However, during progressive or prolonged anoxia, many marine invertebrates rely on different metabolic pathways (e.g. the glucose-succinate pathway) to maintain a production of metabolic energy (for a review see Livingstone, 1991). For example, succinate is a sensitive indicator of anoxia in bivalves (Oeschger and Pedersen, 1994) or in marine polychaetes (Völkel and Grieshaber, 1992).

Concerning biomarkers of damages, no alteration of TBARS levels, and ChE activities were depicted in any cases and in both species, under the experimental conditions. It may be suggested that the antioxidant defences could play their role by preventing oxidative damage. However, defence mechanisms were probably not sufficient to prevent behavioural impairments. Burrowing kinetics were significantly impaired in *S. plana* exposed to both forms of Cu (CuO NP or soluble Cu) compared to controls whereas for feeding rate only in the case of CuO NP exposure. In the case of *H. diversicolor*, only the exposure to soluble Cu led to a significant decrease of the burrowing kinetic of worms and feeding rate seemed not to be affected by experimental conditions. In a similar way, Wallace et al. (2000) showed that saturation of Cd-MT in grass shrimp fed cadmium-contaminated preys was associated with decreased the prey capture.

In invertebrates, tolerance to environmental contaminants is based upon a large range of chemical handling strategies. So it is not surprising that responses differ between a bivalve and a polychaete. In the case of toxic metals but also essential metals in large excess, a first line of defence is based on MT as a detoxificatory ligand. Previous works have well-established that the way MT plays a protective role is different between these taxa. The concentration of this metalloprotein is generally increased in bivalves exposed to metal pollution, providing directly a detoxificatory ligand (Amiard et al., 2006) whereas in certain polychaete species, it is MT turnover which is substantially increased in response to metal exposure, probably allowing the transfer from cytosol to detoxificatory granules (Ng et al., 2008). In *H. diversicolor* originating from highly Cu contaminated site, Cu granules were observed as a major sink for bioaccumulated Cu (Mouneyrac et al., 2003).

Links between behavioural impairment and AChE inhibition is well-documented for aquatic biota (Amiard-Triquet, 2009). In the present study, behavioural impairments were not accompanied by an inhibition of ChE activity, but metabolic or physiological disturbances due to the “cost of tolerance” could be the cause of these impairments (Bonnard et al., 2009).

5. Conclusions

In conclusion, the Cu concentrations used in this study either in the form of CuO NPs or soluble Cu were able to induce biological effects. It must be highlighted that the chosen soluble Cu concentrations of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ may be encountered in polluted environments (since there is no available measured or predicted data on CuO NP concentrations). Several biomarkers of defence are activated in the presence of CuO NPs, namely GST, CAT and SOD in *S. plana* and CAT and GST in *Hediste diversicolor*. These defences may be relatively efficient since no significant effects were shown considering individually biochemical markers of neurotoxicity (ChE) or oxidative damage (TBARS). However, behavioural impairments were observed in the bivalve (*S. plana*), considering both the burrowing and feeding behaviours. For a number of biomarkers, it must be noted that biological responses are significantly more important in the presence of CuO NPs than in the presence of soluble Cu. Thus, these results suggest a specific nanoparticle effect. Finally, the use of both marine invertebrates (*S. plana*, *H. diversicolor*) and the set of biomarkers chosen in this work seem suitable to conduct ecotoxicity studies with ENPs. With a view to risk assessment it is necessary to improve the evaluation of exposure and the subsequent bioaccumulation. Future works (TEM) are in progress to localize cellular targets of CuO NPs in both species.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no. [214478], project name NanoReTox. This work was supported by a scholarship from the Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications (FFCSA) and the Région Pays de la Loire, France while the third author visiting the University of Nantes. Thanks are due to Emmanuelle Uher Cemagref Antony, Fr for her kind help for learning DGT techniques.

References

Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Machado Garcia, C.C., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Signolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., 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* 146, 588–600.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2008. Les Biomarqueurs dans l'Évaluation de l'État Écologique des Milieux Aquatiques, Lavoisier, Paris.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellenn, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.

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.* 15, 87–110.

Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environ. Pollut.* 158, 41–47.

Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Dedouge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B., Berthet, B., 2010. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1733–1741.

Bonnard, M., Romeo, 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.* 15, 11–26.

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

Bryan, G.W., Langston, W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76, 89–131.

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G., 1980. The use of biological indicators of heavy metal contamination in estuaries. *Mar. Biol. Ass. U.K.*, Occ. Publ. no. 1, 73 pp.

Burlinson, F.C., Lawrence, A.J., 2007. A comparison of acute and chronic toxicity tests used to examine the temporal stability of a gradient in copper tolerance of *Hediste diversicolor* from the Fal estuary, Cornwall, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 66–71.

Byrne, P.A., Halloran, J.O., 2001. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia* 465, 209–217.

Chang, H., Jwo, C., Lo, C., Tsung, Y., Kao, M., Lin, H., 2005. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by AASMS. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 10, 128–132.

Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton London New York, pp. 283–284.

Dawson, W., Zhang, H., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, 545–548.

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

Eisler, R., 2007. *Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals*. Elsevier Science Ltd., Oxford.

Ellman, G., Courtney, K., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–90.

European Commission, 2009. *Nanosciences and Nanotechnologies: An Action Plan for Europe 2005–2009. Second Implementation Report 2007–2009*. COM(2009)607 Final, Brussels, 29.10.2009.

Fabrega, J., Luoma, S., Tyler, C., Galloway, T., Lead, J., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517–531.

Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1989. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 92–99.

Galgani, F., Bocquene, G., 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Res.* 25, 147–150.

Galloway, T., Lewis, C., Dokkioti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environ. Pollut.* 158, 1748–1755.

Griffith, R.J., Luo, J., Gao, J., Borzongu, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1972–1978.

Habig, W., Babst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.

Halliwel, B., Gutteridge, J., 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Printed Resource, Oxford University Press, Oxford.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316.

Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 49, 805–823.

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., Bolter, M., 2008. Synthetic TiO2 nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 156, 233–239.

Kalman, J., Palais, F., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., Muntz, A., Blasco, J., Riha, I., Amiard-Triquet, C., 2009. Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organisation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 393, 55–67.

Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Möller, L., 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles: a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* 188, 112–118.

- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 2000. Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment, first ed. CRC Press, USA.
- Livingstone, D.R., 1991. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *Am. Zool.* 31, 522–534 (Mangum, C. & W. van Winkle, 1973).
- Loonen, S., Rainbow, P.S., 2008. Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management, Cambridge University Press, Cambridge.
- McCord, J., Fridovich, I., 1969. An enzymatic function for erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2005. A short-term sublethal *in situ* toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2010–2018.
- Moreira, S.M., Lima, L., Ribeiro, R., Guilhermino, L., 2006. Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: laboratory and *in situ* assays. *Aquat. Toxicol.* 78, 186–201.
- 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 *Orchestoidea gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Mouneyrac, C., Mastain, O., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Beaunier, P., Jeanet, A.Y., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2003. Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. *Mar. Biol.* 143, 73–744.
- Mouneyrac, C., Perrein-Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., 2010. Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.* 158, 121–128.
- Ng, T.Y.T., Rainbow, P.S., 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.
- Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Int.* 31, 121–132.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22.
- Oeschger, R., Pedersen, T.F., 1994. Influence of anoxia and hydrogen sulphide on the energy metabolism of *Scrobicularia plana* (da Costa) (Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184, 255–268.
- Olivier, M., Desrosiers, G., Caron, A., Réjean, C., Caillou, A., 1995. Réponses comportementales des polychètes *Nereis diversicolor* (D.F. Müller) et *Nereis virens* (Sars) aux stimuli d'ordre alimentaire: utilisation de la matière organique particulaire (algues et halophytes). *Can. J. Zool.* 73, 2307–2317.
- Palmer, D.A., Bénédicte, P., Simonson, J.M., 2004. Solubility of copper oxides in water and steam. In: Nakahara, M., Matsubayashi, N., Ueno, M., Yasuoka, K., Watanabe, K. (Eds.), Proceedings of the 14th International Conference in the Properties of Water and Steam, Kyoto, pp. 491–496.
- Pesavento, M., Alberti, G., Biesuz, R., 2009. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review. *Anal. Chim. Acta* 631, 129–141.
- Poirier, L., Berthet, B., Amiard, J.C., Jeanet, A.Y., Amiard-Triquet, C., 2006. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 86, 71–82.
- RNO, French National Mussel Watch Programme, Bremer, Bulletin 2006. <<http://www.ifremer.fr/ervic/documents/bulletins/rno>>.
- Royal Commission on Environmental Pollution, 2008. Novel Materials in the Environment: The Case of Nanotechnology. Twenty Ninth Report.
- Scaps, P., Borot, O., 2009. Acetylcholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor*: effects of temperature and salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 125, 377–383.
- 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.
- Stone, V., Nowack, B., Baun, A., van den Brink, N., Kammer, F., Domska, M., Handy, R., Hankin, S., Hasselöv, M., Jones, E., Fernandes, T.F., 2010. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterization. *Sci. Total Environ.* 408, 1745–1754.
- Sun, F., Zhou, Q., Wang, M., An, J., 2009. Joint stress of copper and petroleum hydrocarbons on the polychaete *Paranereis acutitensis* at biochemical levels. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 1887–1892.
- Tiede, K., Hasselöv, M., Breithardt, E., Chaudhry, Q., Boxall, A.B.A., 2009. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 1216, 503–508.
- Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere* 81, 692–700.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., Schanz, R.P.F., 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1, 52–71.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavalletto, M., Marchi, B., Pontano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Athyria galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 1612–1619.
- Völkel, S., Grieshaber, M.K., 1992. Mechanisms of sulphide tolerance in the peanut worm, *Sipunculus nudus* (Sipunculidae) and in the lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta). *J. Comp. Physiol. B* 162, 469–477.
- Wallace, W.G., Brouwer, T.M.H., Brouwer, M., Lopez, G.R., 2000. Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 962–971.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4336–4345.
- Worrall, C.M., Widdows, J., 1983. Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 12, 281–287.
- Zhang, H., Davison, W., 1999. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. *Anal. Chim. Acta* 398, 329–340.
- Zhou, K., Wang, R., Xu, B., Li, Y., 2006. Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. *Nanotechnology* 17, 3935–3943.

Publication 7 : A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*)

A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*)

PIERRE EMMANUEL BUFFET¹, MARION RICHARD^{2,3}, FANNY CAUPOS², AURORE VERGNOUX¹, HANANE PERREIN-ETTAJANI¹, ANDREA LUNA-ACOSTA², FARIDA AKCHA⁴, JEAN-CLAUDE AMIARD¹, CLAUDE AMIARD-TRIQUET¹, MARIELLE GUIBBOLINI⁵, CHRISTINE RISSO DE FAVERNEY⁵, HELENE THOMAS-GUYON², PAUL REIP⁶, DEBORAH BERHANU⁷, EUGENIA VALSAMI-JONES^{7,8}, AND CATHERINE MOUNEYRAC¹

¹ Groupe Mer, Molécules, Santé (MMS), Université de Nantes et Université Catholique de l'Ouest (Angers), France,

² Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), Université de La Rochelle, France,

³ UMR 5805 EPOC, Université de Bordeaux 1, Talence, France,

⁴ Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Rue de L'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03

⁵ ECOMERS, Université de Nice Sophia-Antipolis, France, ⁶ Intrinsiq Materials Ltd., Hants, UK,

⁷ Department of Earth Sciences, Natural History Museum London, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK

⁸ University of Birmingham, School of Geography, Earth & Environmental Sciences, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK

Abstract

The fate and effects of CuO nanoparticles (CuO NPs) were examined in endobenthic species (*S. plana*, *H. diversicolor*), under environmentally realistic conditions in outdoor mesocosms (exposure to Cu at $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ in particulate (CuO NPs) or soluble salt (CuNO_3) forms) for 21 days. Labile Cu was determined in water and sediment by using Diffusive Gradient in Thin film. No labile Cu being detected from CuO NPs at days 7, 14 and 21, the observed effects in invertebrates exposed to CuO NPs were mainly attributed to the toxicity of nanoparticulate rather than dissolved Cu toxicity. Bioaccumulation of CuO NPs was observed in the whole soft tissues of both species, whereas soluble Cu was only found in clams. Biomarkers were examined at different levels of biological organization: biochemical markers of defence and damage, biomarkers of genotoxicity (Comet assay) and behavioral biomarkers (feeding and burrowing). Behavioral biomarkers, antioxidant defences (catalase, glutathion S-transferase, metallothionein) and genotoxicity are the most sensitive tools to highlight the effect of soluble or nanoparticulate metal forms. Concerning other biomarkers of defense (superoxide dismutase, lactate dehydrogenase, Laccase) and damage (thiobarbituric acid reactive substances, acetylcholinesterase, acid phosphatase) no significant effects were detected. This experiment shows the suitability of mesocosms for studying the environmental effects of nanoparticles.

Introduction

Engineered nanoparticles of copper oxide (CuO NPs) are widely used (<http://www.us-nano.com/inc/sdetail/602>) increasing the risk of their introduction into the environment. Once in the aquatic medium, metal-bearing NPs can either be dissolved into the water column, or aggregated, favouring their deposition onto bottom sediment (Klaine et al. 2008). Thus endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* and polychaete *Hediste diversicolor* could be especially at risk. CuO NPs are poorly dissolved both in freshwater (Griffitt et al. 2008; Heinlaan et al. 2011; Manusadžianas et al. 2012), and seawater (Buffet et al. 2011; Gomes et al. 2011). In our previous paper (Buffet et al. 2011) dealing with fate and effects of CuO NPs from the same batch in seawater, we have shown that i) CuO NPs, with initial size ranging from 10 to 100 nm, highly aggregated/agglomerated and, ii) the hydrodynamic size (or Z-average) increased rapidly to values of around 1000 nm. These findings are in agreement with previous studies on CuO NPs indicating aggregation in seawater (Gomes et al. 2011). It is uncertain whether Cu in labile and nanoparticulate form is accumulated at the same level in biota and can induce the same stress in animal tissues. Buffet et al. (2011) and Gomes et al. (2011) have compared the biomarker responses in invertebrates exposed to the same environmentally realistic dose of Cu ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) as labile or nanoparticulate forms. In a freshwater gastropod, CuO NPs had greater effects than aqueous Cu on growth, feeding rate and reproduction (Pang et al. 2012). Recent studies have shown that CuO NPs have a distinct biological effect not caused entirely by the release of soluble metal ions (Griffitt et al. 2009; Heinlaan et al. 2011).

Oxidative stress is one of the most commonly recognized effects of NPs (Klaine et al. 2008; Canesi et al. 2012). CuO NPs have been shown to increase oxidative DNA lesions in human cells (Karlsson et al. 2008; Fahmy et Cormier 2009). *In vivo* studies in mussels *Mytilus galloprovincialis* have revealed that CuO NPs induced oxidative stress in the gills (Gomes et al. 2011). In *H. diversicolor* and *S. plana*, the activity of antioxidant defences (Catalase CAT in both species, superoxide dismutase SOD in clams) was increased with no oxidative damage when considering the levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS) (Buffet et al. 2011). Genotoxic effects of NPs were observed in *H. diversicolor* exposed to Ag NPs by using the Comet assay on coelomocytes (Cong et al. 2011). In *S. plana*, the Comet assay is also a relevant tool to examine genotoxicity in hemocytes (Petridis et al. 2009). Oxidative stress and apoptosis revealed by caspases as biomarkers are documented for different metal NPs, particularly CuO NPs (Ahamed et al. 2011). MT is involved in ionic/soluble Cu detoxification (Amiard et al. 2006) and also in the defence against oxidative stress (Buico et al. 2008). In mussels exposed to CuO NPs ($10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$), MT increased linearly with time of exposure (Gomes et al. 2011). At the same exposure concentration, a similar trend was observed in the clam *S. plana* (Buffet et al. 2011). Acetylcholinesterase (AChE) activity, a biomarker of neurotoxicity was significantly decreased in mussels exposed to NPs (Gomes et

al. 2011) whereas no significant differences were observed in clams (Buffet et al. 2011). Acid phosphatase (AP) and phenoloxidase (PO), two components of immunity, can provide important early warning signals of the sub-lethal effects of contaminants and the susceptibility of animals to infectious diseases (Gagnaire et al. 2007; Hannam et al. 2009; Luna-Acosta et al. 2010).

In parallel to molecular and biochemical biomarkers, behavioral biomarkers are sensitive tools to assess the impact of contaminants (Amiard-Triquet 2009). In the clam *S. plana*, exposure to waterborne CuO NPs affected both burrowing time and feeding rates (Buffet et al. 2011). In the ragworm *H. diversicolor*, burrowing time was significantly modified in Ag NP treatment (Cong et al. 2011). Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) is a method that improves behavioral analysis by registering online movements of the organisms in test chambers (Gerhardt et al. 2002) when they are already burrowed.

The cited studies were mainly carried out with organisms exposed to NPs directly in seawater in the absence of food and sediment, which could be important contamination vectors of NPs. To reach a more realistic assessment of fate, bioaccumulation and effects of CuO NPs on *S. plana* and *H. diversicolor*, the present study uses outdoor mesocosms equipped with a system of tidal cycle. A mesocosm refers to "an experimental system that simulates real-life conditions as closely as possible, whilst allowing the manipulation of environmental factors" (FAO 2009). This experimental strategy has been already used successfully to study the transfer of gold nanoparticles in an estuarine food web (Ferry et al. 2009).

Materials and Methods

Implementation of the mesocosm approach

Sediments were collected from an intertidal mudflat (Bay of Bourgneuf, France), which is documented as relatively clean (French "Mussel Watch" Programme, Réseau National d'Observation, 2006 <http://www.ifremer.fr/envlit/documents/bulletins/rno>). Worms (*H. diversicolor*) and clams (*S. plana*) were gently excluded from the sediment by hand and placed into water with air diffusers. Sediment was mixed before being introduced in experimental cores (Figure 1). Twenty individuals per species were placed in each core at a density (1000 individuals m⁻²) commonly determined in intertidal mudflats (Fossi Tankoua et al. 2010).

Experimental cores were composed of a PVC tube (H: 15 cm, 20 cm Ø) capped with foam for aquarium filter (1-2 mm Ø) and canvas. Four cores were deployed in each mesocosm device (Figure 1), composed of two tanks (H, W, L: 40 x 60 x 80 cm), two evacuation tubes, a hose (16 mm Ø), a pump (Eheim compact 1000 L.h⁻¹) and a mechanical timer (IDK PMTF 16A) allowing mimicking the tidal cycle (6 hours of low tide, 6 hours of high tide, two tides per day). Water was all the time aerated by an air diffuser (Figure 1).

Nine mesocosm devices (36 cores) were installed outside and filled with natural seawater (Saltmarsh of Lauzières, l'Houmeau, France). Three of the nine mesocosm devices were qualified as controls. Three other were contaminated with soluble Cu ($10 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ prepared by dilution of CuNO_3 in 2% HNO_3 , purchased from Fluka) and the latter three with CuO NPs (eq. $10 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$). Addition of Cu was carried out at the water surface during the high tide. Analytical CuO nanopowder was obtained from a commercial source (supplied by Intrinsic Materials Limited) with the particle primary size specified by manufacturer as 10-100 nm [5]. The hydrodynamic size and zeta potential of CuO NPs in deionized water and in seawater were determined by NHM and published in Buffet et al. (2011). One core per tank was randomly collected after 7 and 14 days of exposure (Figure 1). At 21 days, the remaining two cores were sampled per tank. Worms and bivalves were gently sorted by hand, stocked into aerated water before tests.

Every three days at 2 PM (local time UT + 2), temperature, salinity and dissolved oxygen were measured in control tanks, using probes (WTW 315i, OXI 3310). Nitrates and nitrites were controlled in each tank with NO_2^- - nitrites and NO_3^- - nitrates Tests sets JBL (JBL GmbH & Co.) sets. In addition, a Micrel probe was deployed into one of the three control tanks. It recorded temperature and salinity every 15 minutes during all the experiment. After 7, 14 and 21 days, sediment was collected using a cut off 60 mL disposable syringe to determine chlorophyll *a* (Chl *a*) and phaeophytin *a* (Phaeo *a*) concentrations in the top 1 cm of sediment cores.

Characterization of exposure

Characterization of NPs in sediment is not possible yet. Nevertheless, labile Cu was estimated in both water column and sediment by using DGT tools (diffusive gradients in thin films purchased from DGT Research Ltd (Lancaster, UK). DGT units were used for the water compartment (loaded solution deployment unit C-LSDU) and other DGT units were employed for sediments (loaded sediment probe for metals C-LSPM). Three water DGT and three sediment DGT units were deployed in each mesocosm (9 mesocosms: a total of 27 units). At day 7, 14 and 21, one water DGT unit and one sediment DGT unit were removed for each mesocosm device (3 DGT units per treatment: control, soluble Cu and CuO NPs).

After sampling, DGT units were washed with ultra-pure water (Milli-Q) as well as 3 water and sediment DGT units used as blanks. For the water DGT units, the totality of the resin was placed in 2 mL vials whereas for the sediment DGT units, the resin was cut every cm, then each piece was placed in a 2 mL vial. 1.5 mL of 1 M HNO_3 was added in vials and left for more than one day to dissolve Cu from the Chelex resin. Cu quantification of these neat or diluted solutions was performed by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (EAAS) (Varian SpectraAA 800).

Copper bioaccumulation

Copper was determined in the whole soft tissues of bivalves and worms which had been allowed to depurate in seawater for 48 h ($n = 10$ per condition, for each species). Animal tissues were digested by heating (90°C) with Aqua Regia ($\text{HCl}/\text{HNO}_3:75/25$). Then, the quantification of Cu concentrations was performed by using Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS, Varian SpectrAA55 spectrophotometer) in ragworms whereas analyses in clams were performed using EAAS. The accuracy of the analyses was checked by using internal quality control with standard reference material (Mussel tissue SRM 2976, National Institute of Standards and Technology).

Biochemical markers

For each biomarker, clams and ragworms were collected at day 21 from three cores, each of them selected at random in one of the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (Control, exposure to soluble Cu or CuO NPs). The total weight of clams was determined, then worms and soft tissues of clams weighed individually and stored at -80°C until biochemical analysis. Methodologies applied for the determination of biochemical markers (MT, GST, LDH, CAT, SOD, TBARS, AChE) have been described in details in our previous work (Buffet et al. 2011). MT analysis was performed only in *S. plana* since MT is not relevant as a biomarker in *H. diversicolor* (Poirier et al. 2006). Briefly, MTs were quantified by Differential Pulse Polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al. 2002) after partial purification in soft tissue homogenates. Lipid peroxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), quantified by reference to MDA absorbance at 530 nm (Halliwell et Gutteridge 1985). For GST, CAT, SOD, AChE and LDH activities, tissues were homogenised and enzyme activities were determined spectrophotometrically in the enzyme fraction (S9 fraction) as described by Habig et al. (1974) for GST, Claiborne (1985) for CAT, McCord and Fridovich (1969) for SOD, Galgani and Bocquene (1991) for AChE, Diamantino et al. (2001) for LDH.

CSP 3-like activity was determined by measuring the release of aminotrifluoromethylcoumarin (AFC) from the caspase tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AFC (N-acetyl-Ile-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). After homogenization of the pooled soft tissues, an aliquot of S9 was mixed with buffer B (312.5 mM HEPES pH 7.5, 31.25% sucrose, 0.3% CHAPS, 50 AM of DEVD-AFC). The fluorescence of free AFC was measured by using a fluorometer (Safas FLX Xenius, Monaco) at an excitation/emission wavelength of 390/530 nm every 3 min for 45 min. CSP 3-like activities were expressed in pmoles AFC $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$, according to a standard curve obtained from AFC. AP activity was determined according to the method of Bergmeyer et al. (1974), by using the Sigma Acid Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, France). Laccase-type PO activity was determined according to methodology described previously (Luna-Acosta et al. 2010), by using p-phenylenediamine

(PPD) as substrate. The protocol assay was adapted to *H. diversicolor* and *S. plana* samples (data not shown).

All the results were expressed with reference to protein concentrations determined according to Bradford (1976). For MT, LDH, AP and laccase-type PO, and digestive enzymes, determinations were carried out individually ($n = 10$ per species and per treatment, control and Cu either soluble or as CuO NPs). For GST, CAT, SOD, TBARS, AChE and CSP-3 like determinations were carried out on 5 pools of 3 individuals per species (*H. diversicolor*, *S. plana*) and per treatment.

Comet assay

After exposure *H. diversicolor* ($n=10$) and *S. plana* ($n=7$) were collected at day 21 from one core selected at random in the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (Control, exposure to soluble Cu or CuO NPs). Coelomocytes of worms were taken by carefully inserting a syringe into the posterior region of the worm. Using the same procedure, haemocytes of clams were taken from the adductor muscle. The blood cells were mixed with PBS then stored on ice briefly before use. Before the assay was performed, viability of cell was determined by a trypan-blue exclusion test. A rate of cellular viability above 85% validated the condition of the test limiting measurement of broken DNA from death cells.

The Comet assay is a modified version of that previously described by Singh et al. (1988). Positive controls consisting of cell exposed *in vitro* for 10 min to 100 μM hydrogen peroxide were carried out in parallel to ensure the validity of measurements. All steps described above were conducted under dim red light and performed at 4°C to prevent any DNA damage. The cell suspension was carefully mixed with 1% low melting point agarose and was transferred onto a conventional microscope slide precoated with 0.8% normal melting point agarose. The gel was solidified on ice for 10 min and the cover slip was removed. A third layer of 0.5% low melting point agarose was added. Slides were left on ice again for 10 min to solidify before the cover slip was removed. Then slides were immersed in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 1% N-laurylsarcosinate, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO added immediately before use) for 2 h. After lysis, slides were washed with an alkaline buffer (1 mM Na₂EDTA and 300 mM NaOH, pH>13) and placed in a horizontal electrophoresis tank filled with the same buffer for 45 min to unwind DNA. Electrophoresis was then performed for 21 min at 15 V, 300 mA. At the end of the electrophoresis, slides were washed twice (10 min) in a neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), dehydrated in absolute ethanol (5 min) and taken out to dry. Nuclear DNA was stained with 30 μL of ethidium bromide (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and observed using an optical fluorescence microscope (BX 60 Olympus) coupled to an Andor camera and an image analysis system (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd). For each animal, one slide was prepared. On each slide, 75 non-

overlapping comets were scored randomly on the all gel surface of the slide. DNA damages were expressed as the percentage of broken DNA in the comet tail.

Behavioral experiments

Behavioral tests were carried out with animals collected from three cores, each of them selected at random in one of the three replicated mesocosm devices corresponding to each experimental treatment (Control, exposure to soluble Cu or CuO NPs). Burrowing experiments were carried out with natural sediment collected from the sampling site.

Clams ($n = 20$ per treatment) were submitted to burrowing tests at day 21 as described by Bonnard et al. (2009). Burrowing behavior was studied by placing individuals at the sediment surface and observing the number which had burrowed at frequent intervals; every 5 min in the 1st hour, every 10 min in the 2nd hour, every 20 min in the 3rd and 4th hour, then every hour until 6 h of test.

Automated behavioral toxicity tests with ragworms *H. diversicolor* were primarily developed using 2 individuals. One end of each chamber of MFB was closed with mesh and the other open in order to visually identify the animal movements. The chambers were placed vertically in plastic tank with a shallow layer of sediment and topped up with 1 L seawater. The lower half of the chamber was filled with sediment and *H. diversicolor* was placed at the surface within each chamber and given 1 h to acclimate before MFB recording. The behavioral patterns were analysed visually by observing *H. diversicolor* movements in combination with the MFB oscilloscope signals. Polychaetes ($n=7$ per treatment) collected at day 7 and day 14 were added individually to each test chamber. One chamber without organisms was used as control for noise signals. The MFB recordings started after 1h acclimation and were made over 7 hours period.

Post exposure feeding tests were carried out at day 14 for both species ($n = 30$ clams per treatment, $n = 20$ ragworms per treatment). The feeding rate of *S. plana* ($n = 30$ per treatment) was quantified according to the methodology described by Worrall and Widdows (1983). Algae *Tetraselmis suecica* obtained from the Nantes Cultures Collection of MMS (Strain NCC62) were used as food ($10\,000\text{ cell mL}^{-1}$) in each of three replicated aquaria containing 2 L of seawater ($n = 10$ specimens per aquaria) for each treatment. The concentration of algae not ingested by bivalves was measured after 1 h.

The feeding rate of *H. diversicolor* was quantified as described by Moreira et al. (2005). Twenty worms were fed 100 *Artemia salina* larvae into individual plastic beakers. They were left undisturbed for 1 h, then the remaining larvae were counted.

Statistical treatment

The assumptions of normality and homoscedasticity of all results were evaluated using Shapiro-Wilk and Fisher tests to choose appropriate parametric or non parametric statistics and to compare treatments (controls, soluble Cu and CuO NPs). Thus, an ANCOVA with post hoc Tukey test was performed on burrowing kinetic data, a two-way ANOVA (treatments and species) was performed on comet assay data and Mann and Whitney tests were performed on data from other biomarkers. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

Results

Biotic and abiotic factors

At the end of the experiment (21 days), no mortality was observed. For each treatment, the condition index determined for 100 clams did not show any significant difference between treatments (controls: 26 ± 5 ; soluble Cu: 25 ± 6 ; CuO NPs: 25 ± 6).

Chlorophyll *a* ($27.7 \pm 2.05 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ dw}$) and Phaeophytin *a* ($25.3 \pm 1.7 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ dw}$) did not significantly vary according to treatment and time (7, 14, 21 days). Water temperature varied daily with maximal mean observed at 3 PM ($23.6 \pm 2.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and minimal mean recorded at 6.30 AM ($12.8 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). During the experiment, temperature varied between 18.5 and 25.5°C at 2 PM. Salinity was regularly adjusted with an addition of water purified by reverse osmosis (RO). Nitrate concentration did not significantly vary during the experiment ($< 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$). At the beginning of the experiment, nitrite concentration was above 0.1 mg.L^{-1} . It decreased after 7 days to become constant at $< 0.01 \text{ mg.L}^{-1}$. The mean of oxygen saturation was $97.1 \pm 0.6 \%$. The mean oxygen concentration was $8.5 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Fate of CuO NPs in the experimental medium

Figure S1 shows Cu masses accumulated by water DGT units and figure S2 Cu masses accumulated by the sediment DGT units during the 21 days of experiment for each treatments (control, soluble Cu, CuO NPs). Accumulated Cu by water DGT units was significantly higher in mesocosms exposed to soluble Cu than in control mesocosms whatever the experiment time (7, 14, 21 d : Fig. S1). Throughout the 21 days, Cu accumulated by water DGT units from mesocosms contaminated with CuO NPs were not significantly different from those accumulated by DGT units deployed in control. DGT units in sediments have shown that no more labile Cu was accumulated in sediment cores with Cu added as CuO NPs than in controls. These results indicate that no detectable release of labile Cu from NPs occurred. Some significant differences were observed deeper in the sediment at day 21, with peaks at -5cm in controls and at -10 cm in mesocosms contaminated with soluble Cu.

Copper bioaccumulation

The results are depicted in Figure S3. In clams *S. plana*, Cu concentrations in the whole soft tissues were significantly higher for both Cu treatments than in controls, the concentrations being significantly higher in those exposed to soluble Cu compared to those exposed to CuO NPs. For the ragworms *H. diversicolor*, body concentrations were significantly higher only in worms exposed to CuO NPs.

Biochemical markers

The results are shown in Table 1. In clams, MT concentration significantly higher in specimens exposed to both forms of Cu. For defence biomarkers, no significant differences were detected in either species concerning SOD and LDH activities (not shown). On the other hand, GST and CAT activities were higher in both species and both Cu treatments with the exception of GST activity in ragworms exposed to soluble Cu. GST activity in clams was significantly higher in the presence of Cu as CuO NPs than as soluble Cu.

Only few biomarkers of damage showed significant changes: in clams, CSP activity was increased in the presence of CuO NPs whereas this treatment led to a decrease of TBARS levels in ragworms. No significant differences on immune responses (AP and laccase-type PO) were detected in both species.

Comet assay

The cellular viabilities were comprised between 92-96% in clams and 86-91% in ragworms. Genotoxic damages in animals from controls and exposed to both Cu forms (soluble and nanoparticulate) were always lower than positive control (H_2O_2). Percentage of tail DNA in worms coelomocytes was significantly higher compared to clams hemocytes (Figure 2). In both species, percentages of tail DNA were enhanced for soluble Cu and CuO NP treatments. No significant difference was detected between the two Cu treatments in the two species after 21 days of exposure.

Behavioral tests

In clams *S. plana*, at day 21, the burrowing kinetics was significantly affected in clams exposed to both forms of Cu (soluble Cu and CuO NPs). Burrowing speed was significantly lower after exposure to soluble Cu than to Cu as CuO NPs (Table 1).

For the ragworm *H. diversicolor*, two different movements can be characterized: i) undulation associated with burrowing, occurring at 0.5 Hz frequency and ii) head movement associated with feeding, occurring at 1 to 2 Hz. The average time spent in burrowing/undulation and head movement/feeding behaviors are depicted in Figure 3 (A and B). No significant difference was observed after 7 days of exposure to both forms of Cu, whereas the two activities had significantly decreased for ragworms exposed during 14 days to soluble Cu and CuO NPs.

Results of feeding rates determined at day 14 are shown in table 1. In clams fed microalgae, the feeding rate was significantly lowered only in specimens exposed to CuO NPs. In ragworms, no effect of Cu contamination was shown on *Artemia* larvae consumption.

Discussion

In the course of the present experiments, ecological conditions remained favourable with good oxygenation, absence of increased levels of nitrites and conservation of a biofilm with chlorophyll *a* in the range of natural concentrations (Underwood et Kromkamp 1999). Survival of both studied species and individual fitness were not negatively affected. Condition index of clams were equal or even higher than encountered in field studies in the same geographical area (Fossi Tankoua et al. 2010).

The aggregation of CuO NPs from the same batch has been shown in seawater (Buffet et al. 2011), a behavior favoring their deposition onto bottom sediment. As observed previously in water alone (Buffet et al. 2011), no Cu release from the CuO NPs occurred in the water column and porewater. These findings are in agreement with many other studies indicating a poor dissolution of CuO NPs in sea water (Griffitt et al. 2008; Buffet et al. 2011; Gomes et al. 2011; Heinlaan et al. 2011; Manusadzianas et al. 2012).

Levels of labile Cu in the water column of both treatments (soluble Cu and CuO NPs) were lower in the present study than previously observed in waterborne contamination (Buffet et al. 2011); The labile Cu is probably adsorbing to the sediment present in the mesocosms.. While a decreased uptake was expected, an increase was observed probably due to the fact that Cu body burdens determined in the present study result from the uptake of both Cu forms, labile and particulate (labile Cu sourced either from CuO NPs or soluble Cu adsorbed to natural fine sediment particles). Bioaccumulation of CuO NPs has already been established in gastropods (Pang et al. 2012) and fish (Griffitt et al. 2009). As highlighted in mussel gills (Gomes et al. 2011), in ragworms *Hediste diversicolor* and clams *Scrobicularia plana* the rate of accumulated Cu depends on the form introduced in the experimental medium (CuO NPs or soluble Cu). Cu uptake was lower in ragworms than in clams as observed after waterborne exposure (Buffet et al. 2011) and in the field (Solé et al. 2009).

Due to their small size and high surface area, coupled to other physico-chemical features such as metal content and charged/capped surfaces, nanomaterials may well have unpredictable genotoxic properties (Xie et al. 2011). *In vitro* studies have shown that oxidative stress stimulated by different metal nanoparticles may be an important factor in their genotoxic effects in mammalian cells. *In vivo* studies in marine species showed DNA damage, in *Mytilus galloprovincialis* after exposure to nano iron (Kadar et al. 2011) or in ragworms *Nereis diversicolor* exposed to Ag NPs (Cong et al. 2011). CuO NPs were reported as a source of oxidatively induced DNA damage in human cells (Ahamed et al. 2010). The present study gives the first evidence for DNA damage as revealed by comet assay in marine bivalves and worms exposed to CuO NPs but also to soluble Cu. Indeed, Cu as a redox active metal, is an oxidative stress inducer (Regoli et al. 2011) promoting the formation of highly reactive oxygen species affecting DNA integrity (Ozawa et al. 1993). As shown by Park et al. (2008) in cultured cells exposed to TiO₂ NPs, the oxidative stress by CuO NPs triggered the activation of cytosolic CSP suggesting that NPs exert cytotoxicity by an apoptotic process. These effects were observed despite the fact that both species induce antioxidant defences (CAT activity in both species, increased MT concentration in clams) and enhanced GST activity, a phase II enzyme that catalyzes the GSH conjugation to endogenous aldehydic products of lipid peroxidation (Regoli et al. 2011). Antioxidant defences responded similarly when clams and ragworms were exposed to both forms of waterborne Cu (Buffet et al. 2011). For TBARS, the only significant difference was the decrease observed in ragworms exposed to CuO NPs in mesocosms. Surprisingly, TBARS concentrations resulting from lipid peroxidation were not increased in exposed invertebrates although genotoxicity was observed. Similar observations (Ramsden et al. 2009) in fish exposed to dietary TiO₂ NPs were explained as probably resulting from up-regulating of anti-oxidant defences. However, in mussels' gills exposed using the same protocol applied in the present study, oxidative damage due to CuO NPs was evidenced by a breakdown of the antioxidant defence system and lipid peroxidation, as well as MT induction (Gomes et al. 2011). Since no significant differences were detected in either species for the pollution-induced immunomodulation biomarkers determined in the present study, effects with longer times of exposure should be examined more closely.

Impairment of behavior is well documented in the case of both soluble Cu and CuO NPs in invertebrates (Bonnard et al. 2009, and literature cited therein; Townsend et al. 2009; Buffet et al. 2011; Pang et al. 2012). The behavior of ragworms (feeding and burrowing) was never affected by CuO NPs and burrowing was only affected after soluble Cu. In the present study, the MFB provided a better sensitivity of behavioral test since significant differences were observed between controls and Cu (both soluble Cu and CuO NPs). As observed with waterborne Cu contamination (Bonnard et al. 2009; Buffet et al. 2011), behavioral impairments were not accompanied by an inhibition of AChE activity, but physiological disturbances could be the cause. Slower burrowing by endofauna, could make it more vulnerable to predators in environments impacted by CuO NPs.

This is the first experiment with endobenthic species exposed to Cu as soluble and NP forms under environmentally realistic conditions: doses of Cu, presence of biofilm, tidal cycle effect, and natural weather fluctuations. The finding revealed effects at different levels of biological organization from biochemical to individual responses, including biomarkers of ecological relevance such as behavioral and genotoxic effects. Finally, in agreement with previous works, this study highlights again that CuO NPs are not easily dissolved in our experimental medium and consequently defence mechanisms and toxic effects may be the result of a specific NP effect.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 214478 (NanoReTox). Thanks are due to P. Bustamante, D. Vilday, M. Prineau, V. Huet (LIENSs, University of La Rochelle), M.L. Begout, D. Leguay, JM. Chabirand, B. Charrier (IFREMER, L'Houmeau), O. Fossi Tankoua, M. Bonnard, P. Gaudin, G. Meynard, S. Dupouey, G. Wielgosz-Collin, A. Couzinet-Mossion (MMS University of Nantes) for their valuable help in the implementation of the whole experiment.

References

1. 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., Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27*, (9), 1825-1851.
2. Griffitt, R. J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.-C.; Barber, D. S., Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27*, (9), 1972-1978.
3. Heinlaan, M.; Kahru, A.; Kasemets, K.; Arbeille, B.; Prensier, G.; Dubourguier, H.-C., Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. *Water Research* **2011**, *45*, (1), 179-190.
4. Manusadžianas, L.; Caillet, C.; Fachetti, L.; Gylytė, B.; Grigutytė, R.; Jurkonienė, S.; Karionas, R.; Sadauskas, K.; Thomas, F.; Vitkus, R.; Férard, J.-F., Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31*, (1), 108-114.
5. 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., Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* **2011**, *84*, (1), 166-174.
6. Gomes, T.; Pinheiro, J. P.; Cancio, I.; Pereira, C. G.; Cardoso, C.; Bebianno, M. J., Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (21), 9356-9362.
7. Pang, C.; Selck, H.; Misra, S. K.; Berhanu, D.; Dybowska, A.; Valsmai-Jones, E.; Forbes, V. E., Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquatic Toxicology* **2012**, *106-107*, (9), 114-122.
8. Griffitt, R. J.; Hyndman, K.; Denslow, N. D.; Barber, D. S., Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicological Sciences* **2009**, *107*, (2), 404-415.
9. Canesi, L.; Ciacchi, C.; Fabbri, R.; Marcomini, A.; Pojana, G.; Gallo, G., Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* **2012**, *76*, (0), 16-21.

10. Fahmy, B.; Cormier, S. A., Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro* **2009**, 23, (7), 1365-1371.
11. Iler, L., Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, 21, (9), 1726-1732.
12. Cong, Y.; Banta, G. T.; Selck, H.; Berhanu, D.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E., Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. *Aquatic Toxicology* **2011**, 105, (3–4), 403-411.
13. Petridis, P.; Jha, A. N.; Langston, W. J., Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology* **2009**, 94, (1), 8-15.
14. Ahamed, M.; Akhtar, M. J.; Siddiqui, M. A.; Ahmad, J.; Musarrat, J.; Al-Khedhairi, A. A.; AlSalhi, M. S.; Alrokayan, S. A., Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* **2011**, 283, (2–3), 101-108.
15. Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. S., Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **2006**, 76, (2), 160-202.
16. Buico, A.; Cassino, C.; Dondero, F.; Vergani, L.; Osella, D., Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: An ESR study. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, (4), 921-927.
17. Gagnaire, B.; Gay, M.; Huvet, A.; Daniel, J.-Y.; Saulnier, D.; Renault, T., Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* **2007**, 84, (1), 92-102.
18. Hannam, M. L.; Bamber, S. D.; Moody, J. A.; Galloway, T. S.; Jones, M. B., Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquatic Toxicology* **2009**, 92, (3), 187-194.
19. Luna-Acosta, A.; Bustamante, P.; Godefroy, J.; Fruitier-Arnaudin, I.; Thomas-Guyon, H., Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. *Environmental Science and Pollution Research* **2010**, 17, (4), 999-1008.
20. Amiard-Triquet, C., Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic

Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **2009**, 15, (1), 87-110.

21. Gerhardt, A.; Schmidt, S.; Höss, S., Measurement of movement patterns of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) with the Multispecies Freshwater Biomonitor® (MFB) - a potential new method to study a behavioral toxicity parameter of nematodes in sediments. . *Environmental Pollution* **2002**, 120, (3), 513-516.

22. FAO, *Biosafety of Genetically Modified Organisms: Basic concepts, methods and issues*. 2009.

23. Ferry, J. L.; Craig, P.; Hexel, C.; Sisco, P.; Frey, R.; Pennington, P. L.; Fulton, M. H.; Scott, I. G.; Decho, A. W.; Kashiwada, S.; Murphy, C. J.; Shaw, T. J., Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nat Nano* **2009**, 4, (7), 441-444.

24. Fossi Tankoua, O.; Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Berthet, B.; Mouneyrac, C.; Rainbow, P. S., Towards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine ecosystems. *ICES E-paper* **2010**.
<http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2010/F/F1510.pdf>

25. Poirier, L.; Berthet, B.; Amiard, J.-C.; Jeantet, A.-Y.; Amiard-Triquet, C., A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2006**, 86, (01), 71-82.

26. Mouneyrac, C.; Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Cottier, A.; Rainbow, P. S.; Smith, B. D., Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **2002**, 57, (4), 225-242.

27. Halliwell, B.; Gutteridge, J., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, 1985.

28. Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B., Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, 249, (22), 7130-7139.

29. Claiborne, A., *Catalase activity*. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton London New York, **1985**, pp. 283-284.

30. McCord, J. M.; Fridovich, I., Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244, (22), 6049-6055.

31. Galgani, F.; Bocquene, G., Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* **1991**, 25, (2), 147-150.

32. Diamantino, T. C.; Almeida, E.; Soares, A. M. V. M.; Guilhermino, L., Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* **2001**, 45, (4-5), 553-560.
33. Bergmeyer, H. U.; Gawehn, K.; Grassi, M., *Methods of Enzymatic Analysis*. Volume I, 2nd ed., Academic Press Inc., NY, **1974** pp. 495-496
34. Luna-Acosta, A.; Rosenfeld, E.; Amari, M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Bustamante, P.; Thomas-Guyon, H., First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **2010**, 28, (4), 719-726.
35. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248-254.
36. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **1988**, 175, (1), 184-191.
37. Bonnard, M.; Eom, I.-C.; Morel, J.-L.; Vasseur, P., Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2009**, 50, (1), 60-67.
38. Worall, C. M.; Widdows, J., Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. *Marine Ecology Progress Series* **1983**, 12, (281-287).
39. Moreira, S. M.; Moreira-Santos, M.; Guilhermino, L.; Ribeiro, R., A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, 24, (8), 2010-2018.
40. Underwood, G. J. C.; Kromkamp, J., Primary Production by Phytoplankton and Microphytobenthos in Estuaries. In *Advances in Ecological Research*, Nedwell, D. B.; Raffaelli, D. G., Eds. Academic Press: 1999; Vol. Volume 29, pp 93-153.
41. Solé, M.; Kopecka-Pilarczyk, J.; Blasco, J., Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environment International* **2009**, 35, (3), 523-531.
42. Xie, H.; Mason Michael, M.; Wise John, P., Genotoxicity of metal nanoparticles. In *Reviews on Environmental Health*, 2011; Vol. 26, p 251.

43. Kadar, E.; Tarran, G. A.; Jha, A. N.; Al-Subiai, S. N., Stabilization of Engineered Zero-Valent Nanoiron with Na-Acrylic Copolymer Enhances Spermotoxicity. *Environmental Science & Technology* **2011**, 45, (8), 3245-3251.
44. Ahamed, M.; Siddiqui, M. A.; Akhtar, M. J.; Ahmad, I.; Pant, A. B.; Alhadlaq, H. A., Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, 396, (2), 578-583.
45. Regoli, F.; Bocchetti, R.; Filho, D. W., Spectrophotometric Assays of Antioxidants. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, John Wiley & Sons, Ltd: 2011; pp 367-380.
46. Ozawa, T.; Ueda, J.; Shimazu, Y., DNA single strand breakage by copper(II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions. *biochemical and molecular biology international* **1993**, 31, 455-461.
47. Park, E.-J.; Yi, J.; Chung, K.-H.; Ryu, D.-Y.; Choi, J.; Park, K., Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters* **2008**, 180, (3), 222-229.
48. Ramsden, C.; Smith, T.; Shaw, B.; Handy, R., Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* **2009**, 18, (7), 939-951.
49. Pang, C.; Selck, H.; Misra, S. K.; Berhanu, D.; Dybowska, A.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E., Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquatic Toxicology* **2012**, 106–107, (0), 114-122.
50. Townsend, M.; Hewitt, J.; Philips, N.; Coco, G. Interactions between heavy metals, sediment and cockle feeding and movement. Auckland Regional Council Technical Report No.023 May **2010**.

Table 1 Means $\pm$ (Standard deviation SD) of biomarkers quantified in *Hediste diversicolor* and *Scrobicularia plana* exposed to the experimental conditions (Controls, soluble Cu, CuO NPs). For both species, biomarker levels with different superscripts differed significantly ($p < 0.05$)

Biomarkers	<i>S. plana</i>			<i>H. diversicolor</i>		
	Control	Soluble Cu	CuO NPs	Control	Soluble Cu	CuO NPs
MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ tissues)	1477 (250) ^a	2122 (242) ^b	1947 (285) ^b			
Defense						
GST (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	222 (10) ^a	266 (10) ^b	354 (27) ^c	72 (12) ^a	86 (3) ^a	113 (5) ^b
(21d exposure)						
CAT ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg ⁻¹ protein)	67 (13) ^a	93 (12) ^b	116 (18) ^b	69 (4) ^a	109 (16) ^b	124 (14) ^b
CSP-3 like (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	1.25 (0.05) ^a	1.27 (0.05) ^a	1.38 (0.06) ^b	1.17 (0.08) ^a	1.24 (0.04) ^a	1.26 (0.07) ^b
TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein)	0.47 (0.07) ^a	0.44 (0.06) ^a	0.52 (0.13) ^a	0.82 (0.05) ^a	0.70 (0.11) ^a	0.66 (0.06) ^b
Behavior						
Burrowing slope (21 exposure)	-0.0139 ^a	-0.0057 ^b	-0.0083 ^c			
Feeding rate (14d exposure)	3587 (1762) ^a	3963 (1766) ^a	1517 (1182) ^b	81 (11) ^a	82 (14) ^a	79 (19) ^a

Figures captions:

Figure 1. Experimental cores deployed in a mesocosm device equipped with tidal cycle system.

Figure 2. DNA damage in A) hemocytes of *Scrobicularia plana* and B) coelomocytes of *Hediste diversicolor* exposed to the experimental conditions (Control, soluble Cu, CuO NPs or positive control H₂O₂) expressed as percentage of DNA in the comet tail of blood cells. For both species, biomarker levels with different capital letters differed significantly ($p < 0.05$)

Figure 3. Average frequency (%) (+/- error) of burrowing/undulation (0.5 Hz) and head movements/feeding of *Hediste diversicolor* (n = 7) exposed to the experimental conditions (Control, Soluble Cu and CuO NPs) after A) 7 days and B) 14 days of exposure. Stars indicate significant differences with control treatment ($p < 0.05$).

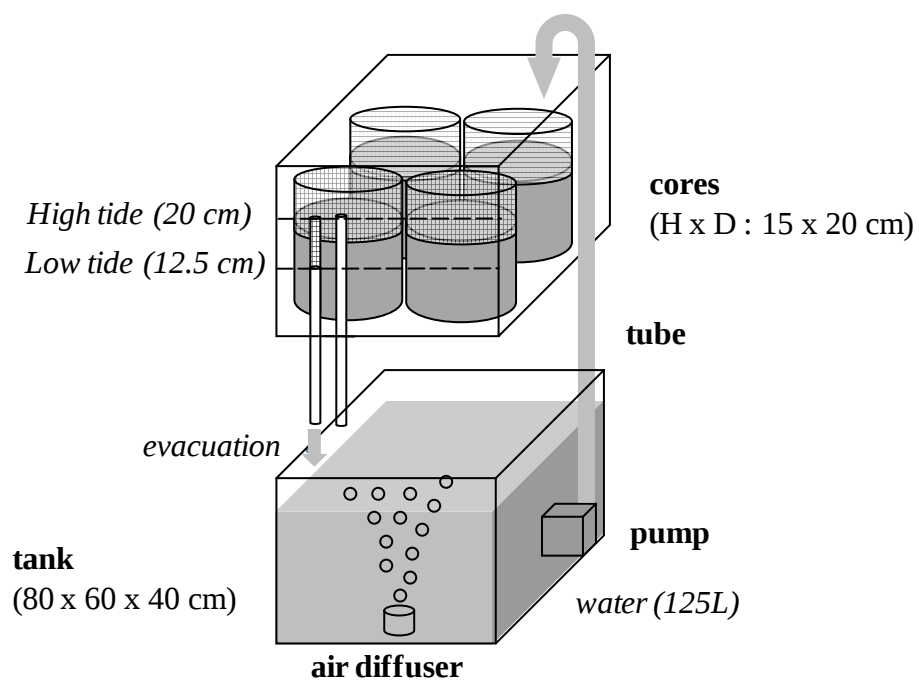


Figure 1.

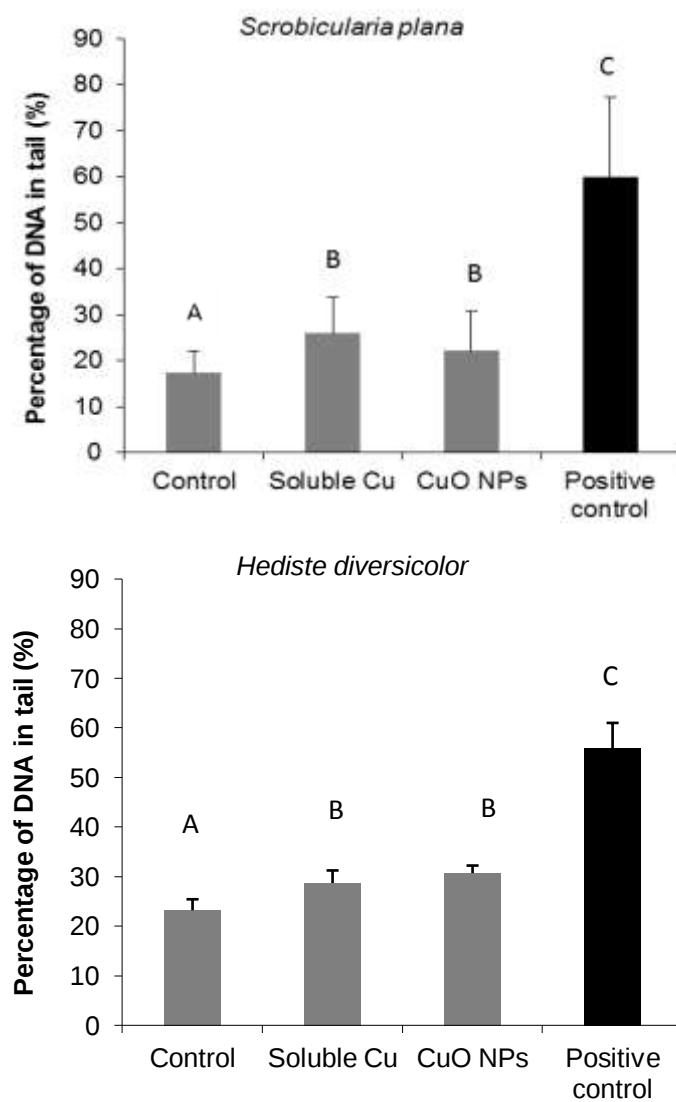


Figure 2.

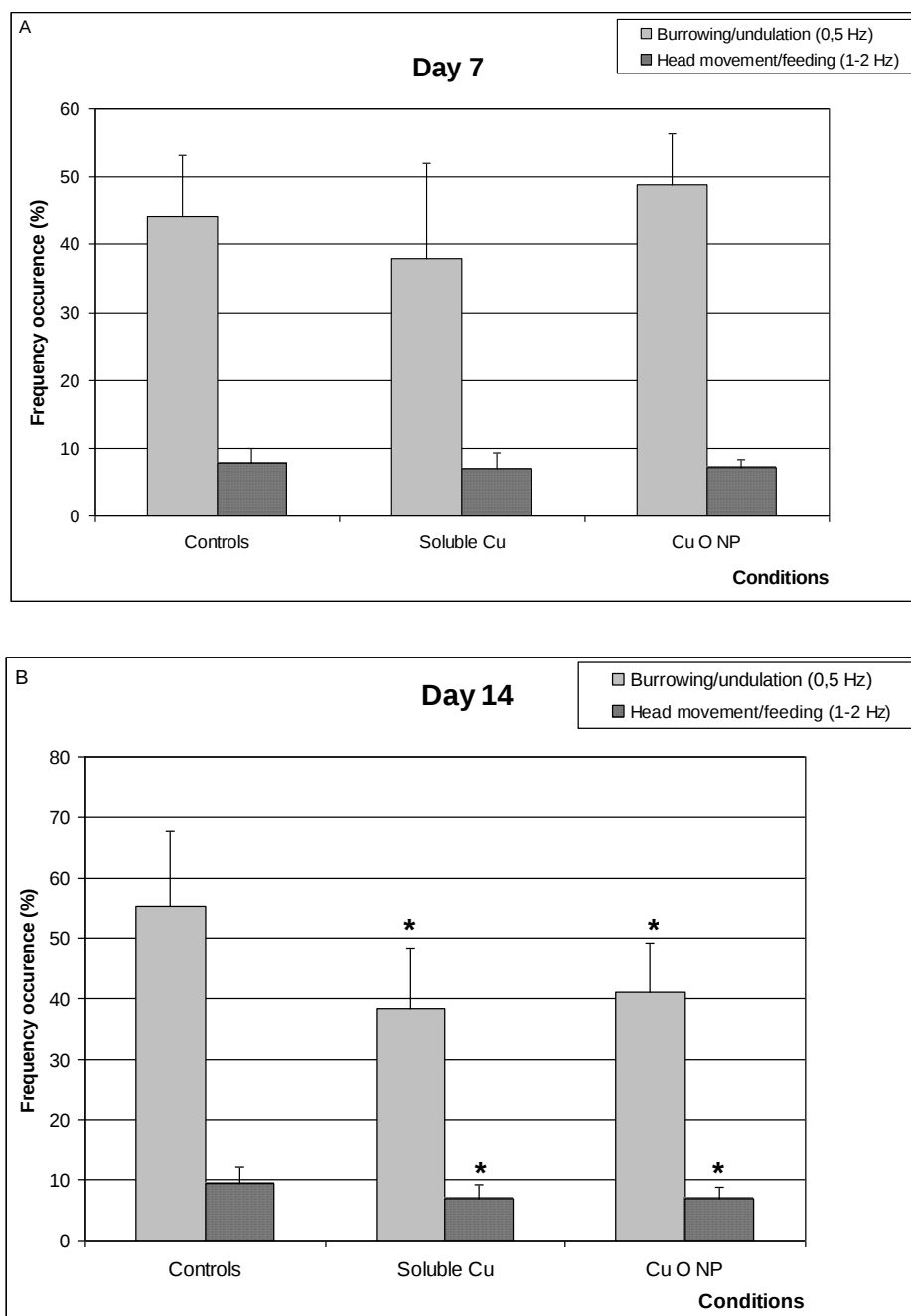


Figure 3.

Supplementary materials

Figure S1: Mean masses (and standard deviation SD, $n = 3$) of Cu accumulated by DGT units (ng) deployed in the water column of mesocosms, exposed to the experimental conditions (Control, Soluble Cu and CuO NPs) and at each time of exposure (0, 7, 14, 21 days).

Figure S2: Mean masses ($n = 3$) of Cu accumulated by DGT units (ng) at different sediment depths in mesocosms exposed to the experimental conditions (Control, Soluble Cu and CuO NPs) and after A) 7 days, B) 14 days and C) 21 days of exposure. . stars indicate significant differences with control treatment. Standard deviations were not drawn, to keep the figure readable.

Figure S3: Mean copper concentrations (and SD between brackets) in whole soft tissues of *Scrobicularia plana* (A) and *Hediste diversicolor* (B) exposed to the experimental conditions (Control, Soluble Cu and CuO NPs) after 21 days of exposure. Concentrations with different capital letters were significantly different ($p < 0.05$).

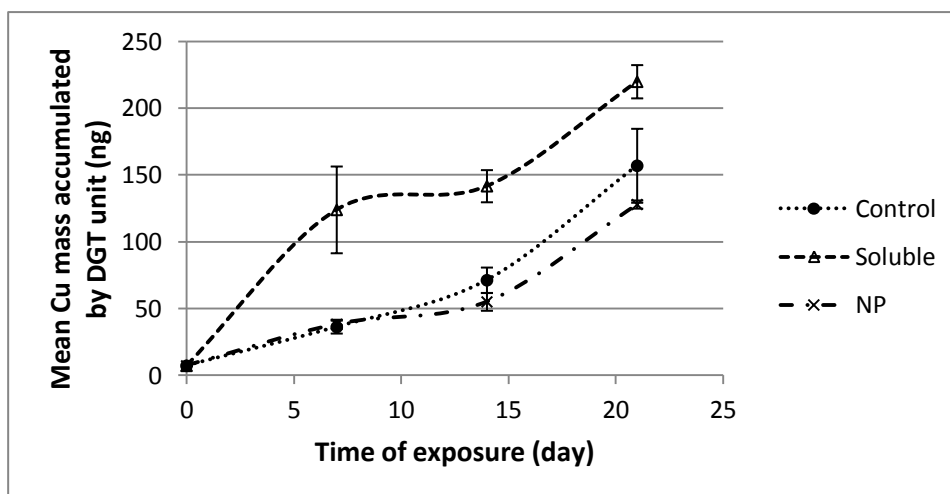


Figure S1.

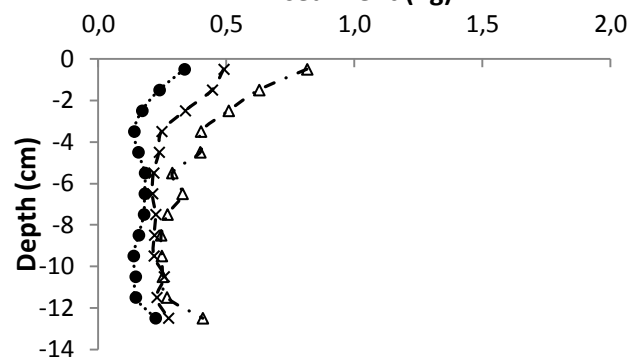
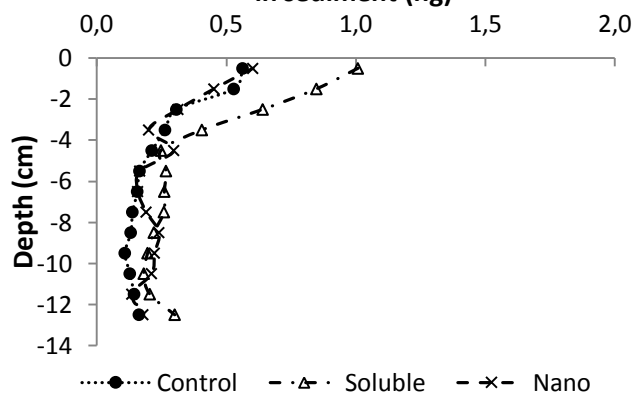
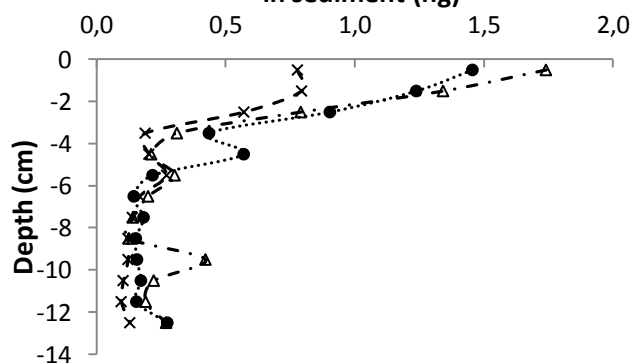
D7 Mean Cu mass accumulated by DGT units
in sediment (ng)**D14** Mean Cu mass accumulated by DGT units
in sediment (ng)**D21** Mean Cu mass accumulated by DGT units
in sediment (ng)

Figure S2.

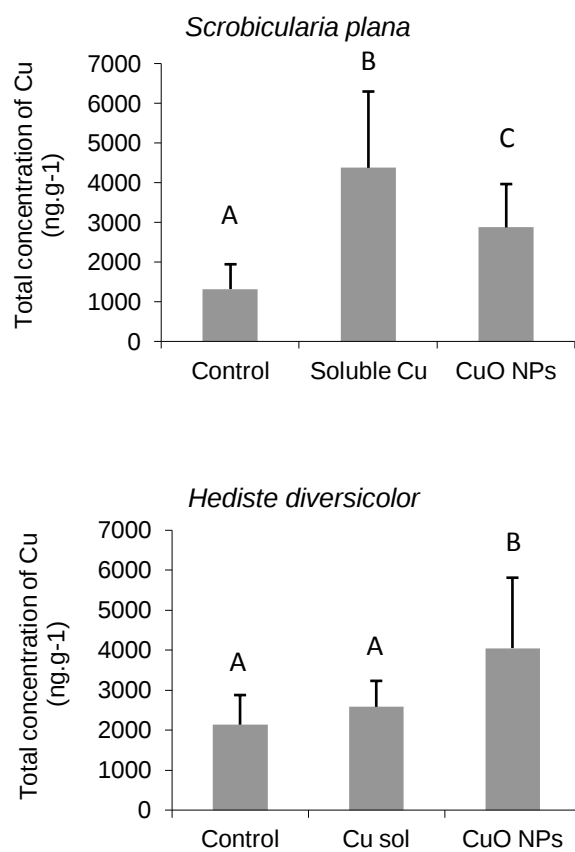


Figure S3.

2. Conclusion et perspectives

Deux nouvelles techniques ont été expérimentées et présentées dans la publication 7 afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de toxicité des NP sur nos deux espèces sentinelles *S. plana* et *H. diversicolor*. Les tests de comportement sont des biomarqueurs qui fournissent des indications précoces sur les effets des polluants sur les organismes. Les tests d'enfouissement et d'alimentation réalisés au laboratoire se sont montrés performants et sensibles pour évaluer les effets des NP sur *S. plana* et *H. diversicolor*. Cependant ces derniers ne nous donnaient pas d'informations concernant le comportement des deux invertébrés une fois enfouis. Le Multispecies Freshwater Biomonitor est un système permettant initialement d'évaluer le comportement des organismes dans l'eau (Gerhardt et Schmidt 2002). Par la suite, Kirkpatrick et al. (2006) ont montré que le MFB pouvait enregistrer des signaux comportementaux de l'amphipode *Corophium volutator* dans les sédiments avec une précision similaire à celle obtenue dans l'eau. Dans notre travail, nous avons montré que le MFB est également utilisable pour étudier le comportement de *S. plana* (résultats non présentés) et *H. diversicolor* dans le sédiment. Dans un premier temps, les observations préliminaires dans l'eau ont permis notamment d'étudier précisément les mouvements associés au déplacement (les ondulations du corps) et des mouvements associés à la recherche de nourriture (mouvement de la tête chez les annélides). Le MFB nous a ensuite permis de détecter des altérations de ces mouvements dans les sédiments. Ce système automatisé constitue donc un outil très sensible pour approfondir nos connaissances sur les effets des polluants sur le comportement des invertébrés benthiques.

Dans le chapitre 3 était évoquée la possibilité de dommages sur l'ADN comme effet potentiel des NP au niveau cellulaire. Ainsi nous avons aussi testé la génotoxicité au moyen des essais comète sur les organismes exposés à des CuO NP et du Cu soluble dans l'expérience en mésocosme. Les résultats obtenus montrent que des lésions sur l'ADN peuvent être provoquées par des Cu NP et également par du Cu soluble pour une dose réaliste sur le plan environnemental ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) dans les cellules isolées des fluides des deux invertébrés. Ce résultat montre que malgré les défenses mises en place pour lutter contre le stress oxydant (MT, CAT, GST) des effets génotoxiques peuvent être engendrés par les NP.

Les tests sur la génotoxicité semblent constituer des biomarqueurs d'intérêt pour les futurs travaux de notre laboratoire sur les NP.

Dans cette expérience en mésocosme, nous avons pu étudier les effets des CuO NP et du Cu soluble tout en incluant les différentes voies d'exposition présentées dans les différents chapitres de ce manuscrit (l'eau, la voie alimentaire et les sédiments). Ce travail en mésocosme figure en quelque sorte comme le point culminant de notre approche visant à travailler en considérant le réalisme environnemental lié aux interactions entre les compartiments et intégrant également les effets du climat et du cycle nyctéméral et tidal. L'écosystème expérimental que nous avons réalisé a comporté tous les éléments permettant son auto-entretien. D'une part, le développement algal à la surface des sédiments est resté stable durant l'ensemble des expériences (Figure 33). La densité de microalgues évaluée par la concentration en chlorophylle atteste de plus qu'elles n'ont pas été impactées par la présence de Cu soluble ou sous forme de NP.

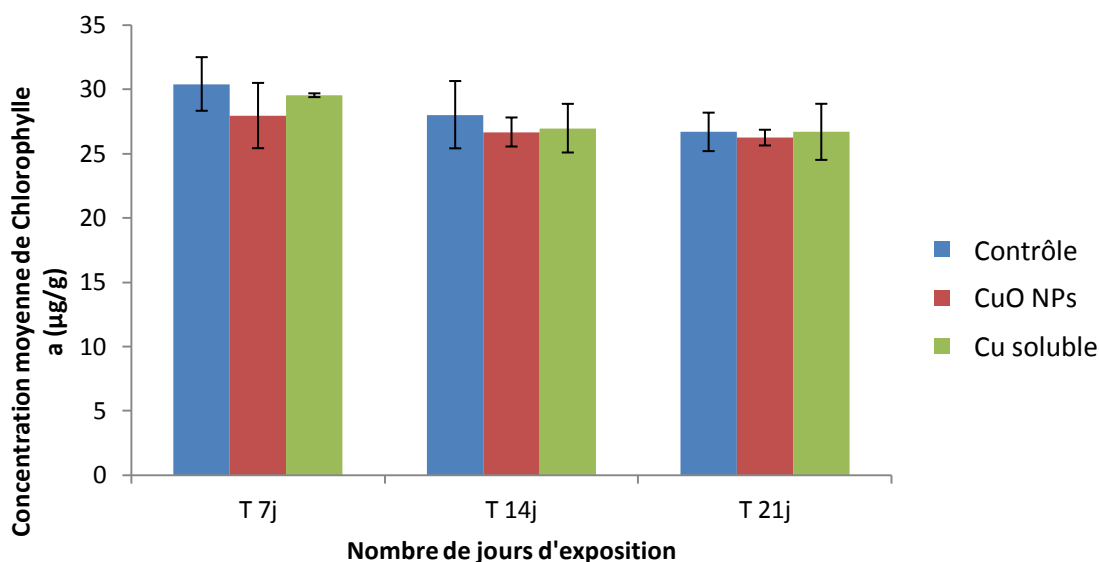


Figure 33 : Concentration moyenne de chlorophylle a dans le sédiment en fonction du temps d'exposition et du traitement.

La conception de l'écosystème expérimental et le système de marée ont permis le bon fonctionnement des deux espèces sentinelles (*S. plana* et *H. diversicolor*) dont les activités d'alimentation, la formation de galeries ont pu être observées tout au long de l'expérience

(Figure 34). Ces résultats semblent donc être prometteurs pour réaliser des expériences à long terme (dépassant plusieurs mois).



Figure 34 : Formation d'une galerie en U de *H. diversicolor* dans un mésocosme expérimental.

La comparaison des résultats obtenus après l'exposition par l'eau et celle en mésocosme est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 13).

Tableau 13 : Comparaison des réponses des biomarqueurs chez *S. plana* et *H. diversicolor* exposées aux CuO NP par l'eau ou dans les mésocosmes. Induction significative du biomarqueur ↗, inhibition significative du biomarqueur ↘, pas de variation significative =.

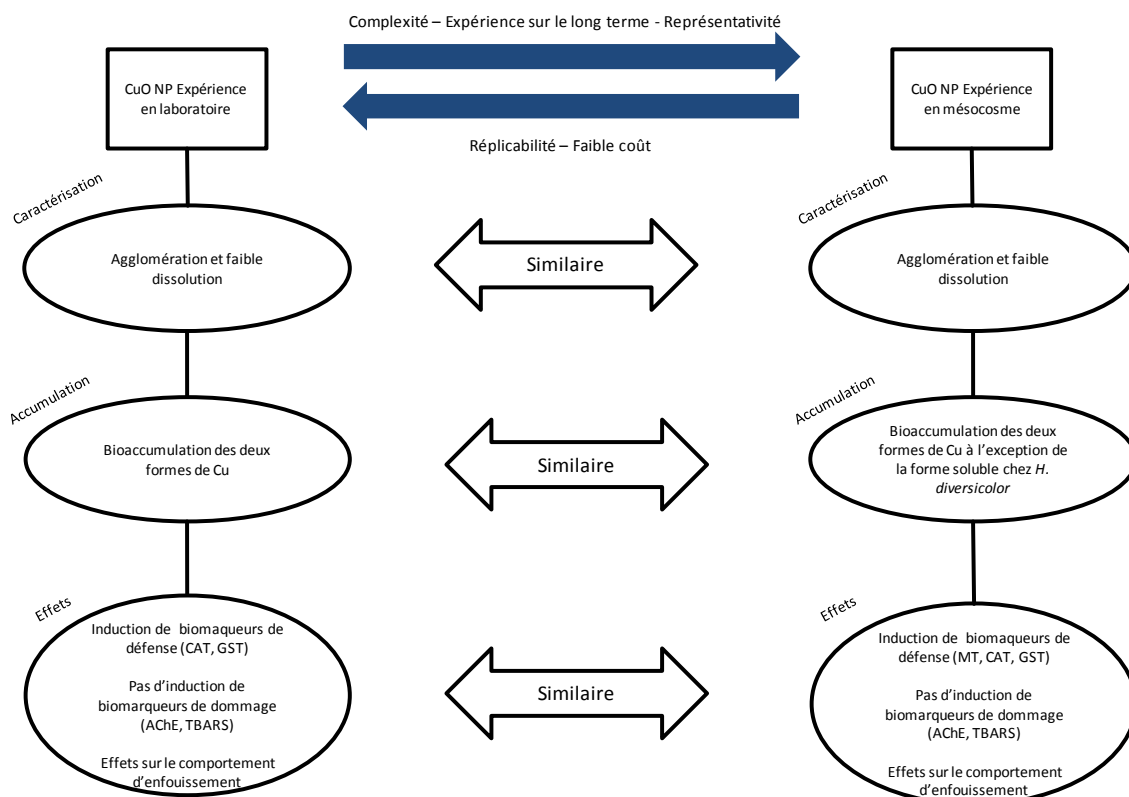
Cu (eau)	<i>Scrobicularia plana</i>		<i>Hediste diversicolor</i>	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement	↘	↘	↘	=
Alimentation	=	↘	=	=
MT	↗	=	Nd	Nd
CAT	=	↗	↗	↗
GST	=	↗	=	↗
SOD	=	↗	=	=
LDH	=	=	=	=
TBARS	=	=	=	=
ACHé	=	=	=	=
CSP	Nd	Nd	Nd	Nd

Cu (mésocosme)	<i>Scrobicularia plana</i>		<i>Hediste diversicolor</i>	
	Forme soluble	Forme NP	Forme soluble	Forme NP
Enfouissement	↘	↘	↘ (MFB)	↘ (MFB)
Alimentation	=	↘	=	=
MT	↗	↗	Nd	Nd
CAT	↗	↗	↗	↗
GST	↗	↗	=	↗
SOD	=	↗	=	=
LDH	=	=	=	=
TBARS	=	=	=	↘
ACHé	=	=	=	=
CSP	=	↗	=	↗

Les résultats concernant les effets des CuO NP sont très similaires pour les deux expériences (exposition par la voie aqueuse et expérience en mésocosmes dans le milieu naturel). En effet, les biomarqueurs les plus sensibles sont la vitesse d'enfouissement, la CAT et la GST (aucune mesure de CSP n'a été réalisée dans l'expérience dans l'eau). Ceci montre que pour le cas des CuO NP qui se dissolvent peu, malgré la pertinence écologique de l'utilisation des mésocosmes, les expériences en laboratoires peuvent constituer une alternative intéressante pour l'étude des effets des NP sur les organismes benthiques.

Néanmoins, les mésocosmes sont indispensables pour travailler sur les transferts de NP au sein des réseaux trophiques. Nos résultats confirment que l'utilisation de mésocosmes de taille adaptée à la réplique est efficace pour comprendre le comportement et les effets des NP dans l'environnement. Ces systèmes pourraient donc constituer un outil de base dans les programmes de recherche sur les nanomatériaux. Il serait également possible de réaliser des expériences de transfert trophique couplant l'utilisation des isotopes stables présentés dans le chapitre 6 avec des écosystèmes expérimentaux afin d'évaluer les transferts trophiques des biofilms vers les invertébrés endobenthiques jusqu'aux poissons.

Synthèse du chapitre 7



Conclusion générale et perspectives

Les nanoparticules constituant les nanomatériaux sont des outils inégalés pour dépasser les limites dans la conception de nouvelles technologies. Comme dans toutes les technologies, l'attraction vers les bénéfices indiscutables qu'elles pourront nous procurer ne doit pas masquer les éventuels risques qui pourraient advenir d'un usage inconsidéré de ces matériaux. Avec à l'heure actuelle déjà plus de 1 300 nano-produits sur le marché indiquant l'utilisation de NP dans leur conception, un besoin très important se fait ressentir concernant l'évaluation du risque associé à ces produits. Le groupe de travail NATO (Linkov et al. 2009) par exemple, a été créé pour évaluer les implications (bénéfices, risques, coûts...) de l'usage des NP sur la santé et l'environnement. Ainsi, les décisions et les législations qui apparaissent progressivement nécessitent d'améliorer les connaissances sur les mécanismes et les effets des nanomatériaux sur les organismes vivants. Ce manuscrit prend donc place dans cette démarche de l'acquisition des connaissances avec pour but ultime la détermination des premières informations pour la gestion du risque concernant les nanoparticules. Dans cette conclusion, les résultats acquis durant ces trois ans seront utilisés pour souligner les avancées notables réalisées dans le domaine et les difficultés à combler pour juger du risque associé à l'utilisation des NP.

1. Les nouveaux concepts pour les études de nanotoxicologie et de nanoécotoxicologie

Les propriétés physico-chimiques des NP transforment la manière de penser concernant la toxicité et l'écotoxicité des contaminants chimiques conventionnels. Le premier constat réalisé par les scientifiques travaillant sur le domaine des NP est que cette forme spécifique de polluant doit être considérée comme une substance à part entière. La nature des particules produites par l'industrie mais également les propriétés spécifiques (taille, forme, fonction de surface, "coating"...) sont extrêmement variables. Ainsi, le comportement et les effets décrits dans une étude sur une NP en particulier ne peuvent aboutir à la généralisation concernant les autres NP mais dépend de la nature de la particule et de ses caractéristiques. Les concepts mis en place en toxicologie et en écotoxicologie traditionnelles sont donc remis en question. Ceci souligne la tâche énorme à laquelle est confrontée la communauté scientifique avec les NP.

1.1. La concentration n'est plus suffisante pour décrire l'exposition

Pour de nombreuses substances toxiques, il apparaît une relation évidente entre les concentrations absorbées par les organismes et les effets qu'elles provoquent ; pour les NP, cette relation doit être tempérée. En effet, les propriétés de surface dominent à l'échelle nanoparticulaire (Cf Chapitre 1). Au-delà de la concentration, des paramètres aussi nombreux que la forme, la taille d'une particule primaire, la distribution des tailles, la structure, la composition, la surface spécifique, les fonctions de surface, la charge, et l'état d'agglomération ont un impact sur le comportement et les effets des NP. Un consensus est apparu concernant l'étape de caractérisation primordiale avant l'évaluation de la toxicité. D'une part, elle permet de vérifier les propriétés des NP présentes dans la solution initialement testée. Les caractéristiques les plus importantes sont : la forme, la taille d'une particule primaire, la distribution des tailles, la structure, la composition, la surface spécifique, les fonctions de surface, la charge, l'état d'agglomération et la concentration (Hassellöv et Kaegi 2009). La caractérisation est nécessaire car il apparaît que les résultats issus des mesures en laboratoire peuvent varier fortement par rapport aux données fournies par les producteurs de NP. D'autre part, les outils de caractérisation nous donnent les informations sur le devenir des NP dans le milieu d'exposition. Ce dernier élément met l'accent sur une autre difficulté inhérente aux NP : la problématique de stabilité et de dissolution des NP.

1.2. Stabilité et dissolution

Dans toutes nos expériences, nous avons montré que les NP s'agglomèrent dans les milieux aquatiques marins. De plus, l'agglomération augmente avec la présence de sels en solution (NaCl) qui semble être le facteur le plus important dans le comportement des NP en milieu marin. L'agglomération des particules a été observée pour l'ensemble des NP étudiées dans ce travail : les Au NP stabilisées par du citrate (Chapitre 3), les Ag NP stabilisées par le lactate (Chapitre 4), les ZnO NP stabilisées par du DEG (Chapitre 6), et les CuO NP (Chapitre 7) et CdS NP (Chapitre 5) mises en suspension sans stabilisant. Le concept suivant concerne

la dissolution des NP dans les milieux aqueux et dans l'environnement. Il constitue probablement un des éléments de réflexion des plus intéressants concernant la caractérisation et l'implication sur l'évaluation de la toxicité des NP métalliques. Les NP qui se solubilisent dans les fluides (milieux de vie et fluides biologiques) présentent des effets reliés principalement à la nature chimique de la particule. Pour les métaux, ces effets sont relativement bien connus et ne sont pas spécifiques à la dimension nanométrique. Concernant les NP qui se solubilisent peu dans les milieux, les propriétés des particules de taille nanométrique dominant. La situation est complètement différente puisque les données écotoxicologiques sont beaucoup moins nombreuses, nécessitant des investigations spécifiques. Le cas intermédiaire peut aussi être décrit avec des effets provenant d'une part des substances issues de la solubilisation des NP et d'autre part des NP qui restent sous leur forme initiale. Les mesures réalisées grâce aux capteurs passifs (DGT), et la microscopie électronique nous donnent un premier aperçu de la façon de considérer les NP étudiées et les effets écotoxicologiques associés dans ce manuscrit. La solubilisation des NP peut être présentée qualitativement de manière décroissante comme suit : les Ag NP stabilisées par le lactate > CdS NP > CuO NP > Au NP stabilisées par du citrate. L'étude sur les ZnO NP marquées par des isotopes ayant été menée dans un but différent, la solubilisation n'a pas été déterminée. Cependant, d'après la littérature de nombreux auteurs suggèrent que la solubilisation des ZnO NP est forte (Mortimer et al. 2009; Blinova et al. 2010; Pipan-Tkalec et al. 2010). Les Au NP et les CuO NP reflètent très bien l'effet « nano » alors que les effets provenant des Ag NP sont associés en grande partie à la libération d'Ag dissout. Concernant les ZnO NP, la dissolution semble assez importante alors que les Cd NP présentent une dissolution intermédiaire (environ 50% après 14 jours).

1.3. La bioaccumulation des NP dans les invertébrés aquatiques

Nos travaux démontrent que même lorsque *S. plana* et *H. diversicolor* sont exposées à des doses faibles de NP métalliques, ces espèces accumulent les NP soit directement sous forme particulaire, soit sous une forme labile issue de la dissolution des NP ou de la combinaison des deux formes. La bioaccumulation des NP a pu être mesurée lors des expositions directement dans l'eau, dans les sédiments ou dans les mésocosmes. Concernant l'exposition par l'alimentation, les résultats sont plus contrastés du fait des quantités faibles

accumulées d'une part dans les organismes vecteurs de contamination (microalgues, morceaux d'annélides) et par la suite dans les consommateurs. Les quantités accumulées sont masquées par la concentration en métal naturellement présente dans les animaux et également par la variabilité inter individuelle. Pour remédier à ce problème, des techniques de NP marquées avec des isotopes pourraient être envisagées à l'avenir. En effet, cette technique s'est montrée performante pour dissocier le Zn d'origine nanoparticulaire du Zn naturellement présent dans les sédiments et les tissus des organismes dans le chapitre 6. De plus, bien que les analyses de TEM nécessitent une grande expertise et beaucoup de temps, elles constituent un outil très performant pour obtenir des résultats plus fins. Elles permettent notamment de localiser les NP au niveau cellulaire lorsque ces dernières sont intactes ou peu altérées. Une étude multipliant les échantillonnages pourrait également être envisagée afin de comprendre l'évolution de la pénétration des NP dans l'organisme et donc mieux cerner les mécanismes de toxicité et les cibles cellulaires des NP.

1.4. Les biomarqueurs : des outils adaptés aux études d'écotoxicologie sur les NP

La concentration n'est pas adaptée pour traduire la toxicité des NP. Il semble donc difficile d'établir des limites classiquement utilisées en gestion des risques (PNEC...) et de définir les seuils de tolérance en fonction des mesures chimiques dans l'eau. Dans de telles circonstances, les biomarqueurs sont d'une aide précieuse puisqu'ils traduisent les effets des polluants par le biais des réponses mesurées directement dans les organismes exposés. Durant ce travail, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'utiliser les biomarqueurs pour mesurer les effets liés aux NP. D'après la littérature et nos expériences préliminaires, nous nous sommes orientés vers les biomarqueurs liés aux défenses et aux dommages provoqués par le stress oxydant. Nos résultats démontrent que ces biomarqueurs sont utilisables pour mesurer les réponses précoces des organismes face aux polluants pour des concentrations sublétales. Ainsi, les sensibilités des biomarqueurs utilisés peuvent être classées dans l'ordre décroissant : CSP (réponse dans 75% des cas), CAT (70%), enfouissement (70%), GST (65%), prise de nourriture (40%), LDH (30%), MT (30%), SOD (20%) pour les deux espèces confondues et quel que soit le mode d'exposition. Les niveaux de TBARS (péroxydation

lipidique) n'ont pas été augmentés par la présence de NP et l'activité AChE (neurotoxicité) n'a pas été inhibée. Dans certains cas, les TBARS ont été diminués et les activités AChE ont été augmentées par rapport aux valeurs des contrôles. Cet effet s'explique probablement par un phénomène de surcompensation grâce aux mécanismes de défense déployés par les organismes. L'étude des réponses comportementales réalisée avec le MFB montre que cet outil est prometteur et révèle en détails et de manière plus sensible (que les tests d'enfouissement classiques) les effets induits sur le comportement des animaux. De plus, ce système automatique pourrait permettre de normaliser les résultats puisqu'il supprime les appréciations subjectives liées aux expérimentateurs dans les études comportementales. L'expérience de génotoxicité s'est également avérée prometteuse et confirme les hypothèses présentes dans la littérature concernant les lésions de l'ADN que pourraient provoquer les NP directement en contact avec les acides nucléiques ou indirectement par l'intermédiaire du stress oxydant. Dans les expériences réalisées, la forme nanoparticulaire était plus toxique que la forme soluble dans 25% des cas testés chez *S. plana* et 21% des cas testés chez *H. diversicolor* en prenant en considération tous les biomarqueurs mesurés dans ces travaux (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison de l'écotoxicité des métaux sous forme soluble ou nanoparticulaire chez *S. plana* et *H. diversicolor* dans l'ensemble de ce travail.

	<i>S. plana</i>	<i>H. diversicolor</i>
NP plus toxique que le métal soluble	25%	21%
Métal soluble plus toxique que la forme NP	3%	8%
Toxicité identique pour la forme NP et soluble	20%	13%
Pas d'effet	51%	58%

2. La gestion du risque

Les ouvertures et perspectives de ce projet se tournent très naturellement vers la problématique de la gestion du risque des NP et plus généralement des nanomatériaux. L'évaluation du risque est le processus par lequel le risque est estimé ou calculé. Elle repose sur les notions bien dissociables de danger et de risque. Par définition, le danger représente les

effets néfastes que peuvent provoquer des substances sur des organismes, des populations ou des écosystèmes. Le risque intègre la probabilité pour que ces effets se produisent sur les organismes, les populations ou les écosystèmes. Pour connaître les risques associés aux NP, il faut donc mesurer leur toxicité en associant la probabilité d'exposition à ces substances (Figure 35).

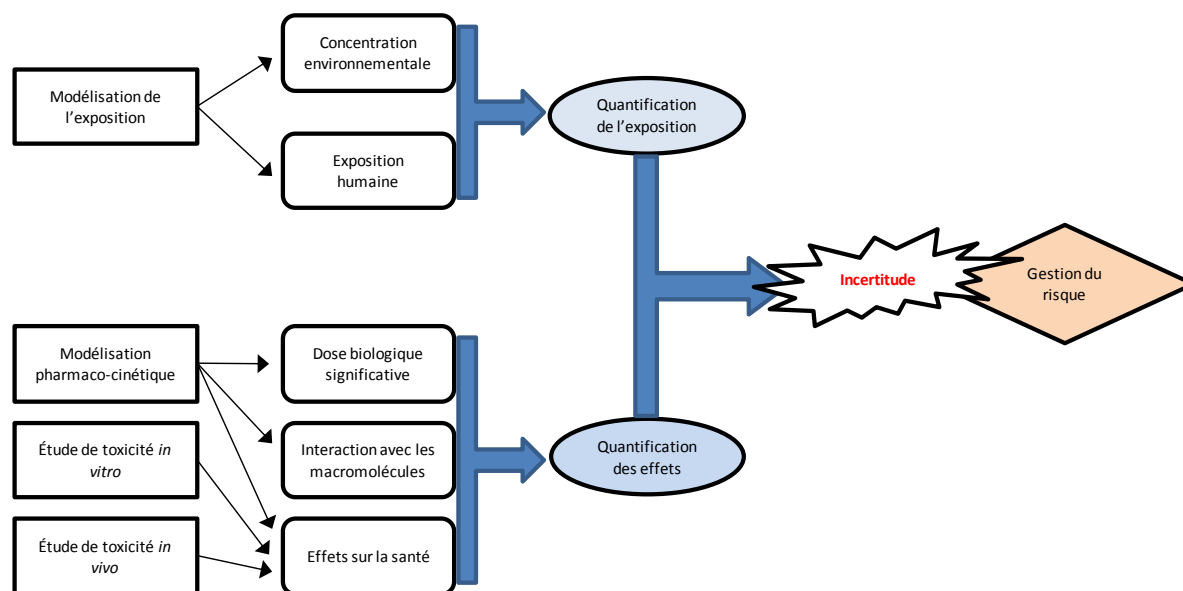


Figure 35 : Gestion du risque des nanoparticules adapté d'après Kandlikar *et al.* (2007).

Ainsi les informations existantes dans la littérature et dans ce travail nous offrent une première base dans la connaissance des mécanismes, des effets et présentent des outils puissants pour mesurer le risque lié aux NP. Cependant, à l'heure actuelle de très nombreuses incertitudes nous empêchent de déterminer totalement le risque lié aux NP (Figure 36). Dans ce cas, certains outils peuvent nous permettre de répondre en partie et provisoirement à l'incertitude en attendant l'acquisition du recul et des techniques nécessaires pour combler nos lacunes.

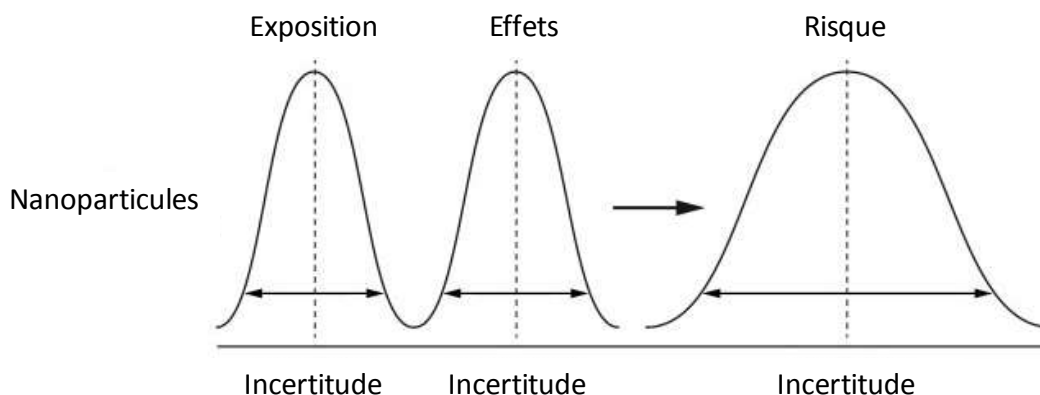


Figure 36 : Les incertitudes pour la gestion du risque des nanoparticules d'après Klaine et al. (2012).

2.1. LCA : un outil important

Le suivi du cycle de vie (Life Cycle Assessment : LCA) est généralement considéré comme devant couvrir la production, l'utilisation et l'élimination d'une substance ou d'un produit. Puisque les cycles de vie des NP sont déterminés par leur application au sein des nanoproducts, il devient clair que le scénario d'exposition et les effets indésirables potentiels, ainsi que les possibilités pour de nouvelles applications, sont fortement dépendantes du cycle de vie des nanoproducts qui contiennent des NP manufacturées (Som et al. 2010). Les méthodes basées sur le LCA sont des outils puissants pouvant permettre l'évaluation de la libération de NP dans l'environnement, en considérant donc la production, le transport, la commercialisation et le recyclage des produits. Linkov et al. (2009) soulignent que dans l'état actuel des connaissances sur les NP, l'identification des risques majeurs constitue un challenge de taille. Les lacunes concernant le cycle de vie des NP sont principalement:

- L'estimation des quantités libérées dans l'environnement selon les quantités de NP produites par l'industrie et commercialisées ;
- La compréhension de tous les mécanismes affectant le comportement et le transport des NP dans l'environnement ;
- La dégradation des nanoproducts dans l'environnement.

Les travaux importants des physico-chimistes ont contribué ces dernières années à mieux comprendre le devenir des NP dans l'environnement grâce aux nouvelles techniques de caractérisation (Cf Chapitre 1). Il est probable que dans un avenir proche, des techniques pourront permettre de quantifier les NP présentes dans l'environnement et également dans les matrices complexes (eau douce, eau marine, sédiment). Cependant, la problématique de la dégradation des NP dans l'environnement est pour le moment peu étudiée. Botta et al. (2011) soulignent qu'un grand nombre de données apparaissent dans la littérature concernant la toxicité des NP mises directement en contact avec les organismes, mais très peu sur les produits issus de la dégradation des nanomatériaux dans l'environnement. Ces auteurs ajoutent que les nanomatériaux sont soumis à de nombreux processus pouvant altérer leur forme (immersion, radiation UV, température, humidité, abrasion). Certains auteurs ont travaillé sur la dégradation des nanoproduits dans l'environnement. Benn et al. (2008) ont évalué la libération d'Ag NP issue du lavage de plusieurs types de chaussettes contenant des NP pour leurs propriétés antibactériennes. Botta et al. (2011) et Labille et al. (2010) ont montré que les crèmes solaires à base de TiO_2 NP libèrent des résidus dans l'environnement avec de potentiels risques écotoxicologiques. Kaegi et al. (2008) ont montré que la dégradation de peinture à base de TiO_2 NP peut contribuer à la libération de NP dans l'environnement via les eaux de ruissellement. Bigorgne et al. (2011) ont montré que les produits issus de la dégradation des TiO_2 NP peuvent engendrer des effets sur le ver *Eisenia fetida*. Ces travaux soulignent que la dégradation des NP dans l'environnement est un phénomène qui doit être étudié en détails. Bien que le LCA donne des informations globales sur les priorités concernant la gestion du risque, le modèle doit faire face à la variété des NP produites dont le comportement dans l'environnement est variable.

2.2. Control banding

Précédemment, nous avons souligné le manque d'informations sur la toxicité et les niveaux d'exposition concernant les nanomatériaux. Le problème des incertitudes qui entourent la présence d'un contaminant dans le milieu n'est pas réservé uniquement au domaine des nanomatériaux. Afin de mettre en œuvre des moyens sûrs mais réalistes de

gestion du risque, une nouvelle approche qualitative appelée « control banding » (CB) a été développée il y a une dizaine d'années au Royaume-Uni. Cette approche est de plus en plus plébiscitée puisqu'elle permet de combler en partie les manques concernant la gestion du risque des polluants. Cette approche a été appliquée pour étudier le risque lié aux NP par Paik et al. (2008). Ce modèle permet de développer des hypothèses logiques en incluant les données disponibles concernant la toxicité ou l'écotoxicité et les niveaux d'exposition malgré les informations manquantes. De plus, ce modèle qui intègre un nombre limité de paramètres permet de simplifier la problématique, ce qui est un avantage certain pour son applicabilité par les non-experts. Les bases de ce système sont constituées par une méthode de « scoring » des deux composantes de l'évaluation du risque : la sévérité des effets et la probabilité d'exposition (Figure 37).

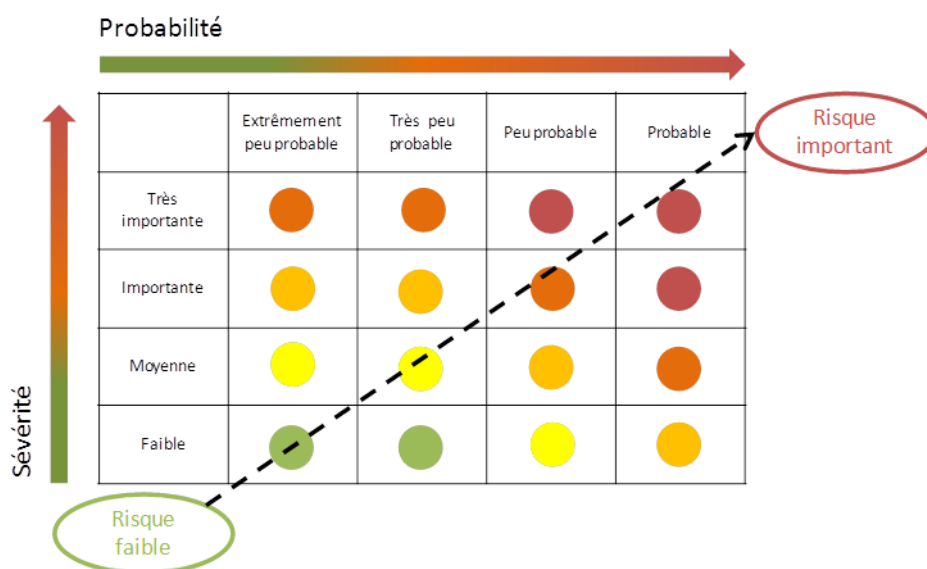


Figure 37 : Evaluation du risque par la méthode du "control banding" modifiée d'après Paik et al. (2008).

- Sévérité : Prenons le cas de notre étude en particulier, il pourrait être pertinent d'utiliser nos biomarqueurs pour établir un score indiquant la sévérité des effets chez nos espèces *S. plana* et *H. diversicolor*. Le système pourrait être amélioré en pondérant les scores en fonction du type de biomarqueurs sachant que les biomarqueurs de dommages traduisent un danger plus important que les biomarqueurs de défense.

- Probabilité : Dans notre étude, la probabilité pourrait être associée aux quantités de NP produites et mises sur le marché selon la nature du métal. Les modèles mathématiques prévoient des concentrations susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement et pourraient également constituer une base de données intéressante. Au regard de nos résultats, il serait judicieux d'insérer également la dissolution spécifique des NP qui réduit significativement l'effet spécifique aux NP. Enfin, puisque notre objectif était de s'approcher progressivement du réalisme environnemental, chaque expérience pourrait être pondérée par un score de réalisme prenant en compte les doses testées. Par exemple, la dose non réaliste utilisée pour l'exposition aux Au NP constitue un niveau faible de réalisme par rapport aux autres expériences. De plus, les compartiments étudiés présentent des pertinences écologiques variables, l'eau étant légèrement en retrait par rapport aux études dans les sédiments avec le niveau maximal de réalisme pour les mésocosmes.

Même si ce modèle néglige de nombreux paramètres dont les données sont difficiles à obtenir pour le moment, il pourrait constituer un outil simple de comparaison pour les différents types de NP utilisées. A notre connaissance, aucune publication ne présente de schéma normalisé pour appliquer cette méthode sur les NP dans l'environnement et peu d'informations sont accessibles pour définir la probabilité, la méthode n'a donc pas été appliquée de manière formelle dans ce manuscrit. Cependant, une démonstration fera l'objet de la soutenance orale complétant ce mémoire de thèse après la réunion finale du programme NanoReTox, enrichie des discussions avec le groupe de travail chargé de l'interprétation et des comparaisons de l'ensemble des données (réactivité, biodisponibilité et effets) obtenues (WP7) ainsi que celui en charge de la gestion du risque (WP8). Ainsi, l'évaluation concernant la toxicité et l'écotoxicité des NP et par la suite le risque associé à l'utilisation des NP n'est qu'à son commencement. A l'heure actuelle, beaucoup d'incertitudes subsistent concernant les effets et l'exposition aux NP. Ce sont donc les travaux menés en coopération entre des équipes pluridisciplinaires qui pourront permettre de parcourir le nanomonde avec toute la sécurité et la raison qui doivent lui être appliqués.

Bibliographie

Abu-Qare, A. W. and M. B. Abou-Donia (2001). Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of Caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 4(3): 313-332.

Adiyodi, K. G. and R. G. Adiyodi, Eds. (1983). *Reproductive Biology of Invertebrates*. Chichester, John Wiley & Sons. pp. 463.

Afsset (2006). *Les nanomatériaux. Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement*. Maison-Alfort. pp.248.

Afsset (2010). *Les nanomatériaux. Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement*. pp. 223.

Ahamed, M., M. J. Akhtar, M. A. Siddiqui, J. Ahmad, J. Musarrat, A. A. Al-Khedhairi, M. S. AlSalhi and S. A. Alrokayan (2011). Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* 283(2–3): 101-108.

Ahamed, M., M. A. Siddiqui, M. J. Akhtar, I. Ahmad, A. B. Pant and H. A. Alhadlaq (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396(2): 578-583.

Ahmad, J., M. Ahamed, M. J. Akhtar, S. A. Alrokayan, M. A. Siddiqui, J. Musarrat and A. A. Al-Khedhairi (2012). Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicology and Applied Pharmacology* 259(2): 160-168.

Allen, H. J., C. A. Impellitteri, D. A. Macke, J. L. Heckman, H. C. Poynton, J. M. Lazorchak, S. Govindaswamy, D. L. Roose and M. N. Nadagouda (2010). Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(12): 2742-2750.

Ambrosone, A., L. Mattera, V. Marchesano, A. Quarta, A. S. Susa, A. Tino, A. L. Rogach and C. Tortiglione (2012). Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials* 33(7): 1991-2000.

Amiard-Triquet, C. (2009). Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15(1).

Amiard-Triquet, C. and P. S. Rainbow, Eds. (2009). *Environmental Assessment of Estuarine Ecosystems*. FL, USA, CRC Press, Boca Raton. pp. 368.

Amiard-Triquet, C., P. S. Rainbow and M. Roméo, Eds. (2011). *Tolerance to Environmental Contaminants*, CRC Press, Boca Raton. pp. 446.

Amiard, J. C. and C. Amiard-Triquet, Eds. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris, Lavoisier Tec & Doc. pp. 372

Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin and P. S. Rainbow (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76(2): 160-202.

Amiard, J. C., A. Geffard and C. Amiard-Triquet (1998). La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organes. *Journal de Recherche Océanographique* 23: 25-30.

Amiard, J. C., A. Geffard, C. Amiard-Triquet and C. Crouzet (2007). Relationship between the lability of sediment-bound metals (Cd, Cu, Zn) and their bioaccumulation in benthic invertebrates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72(3): 511-521.

Amorim, M. J. B. and J. J. Scott-Fordsmand (2012). Toxicity of copper nanoparticles and CuCl₂ salt to *Enchytraeus albidus* worms: Survival, reproduction and avoidance responses. *Environmental Pollution* 164: 164-168.

Arora, S., J. Jain, J. M. Rajwade and K. M. Paknikar (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicology Letters* 179(2): 93-100.

Arora, S., J. M. Rajwade and K. M. Paknikar (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology* 258(2): 151-165.

Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets and A. Kahru (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment* 407(4): 1461-1468.

Auffan, M., J. Rose, M. R. Wiesner and J.-Y. Bottero (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro*. *Environmental Pollution* 157(4): 1127-1133.

Bai, W., Z. Zhang, W. Tian, X. He, Y. Ma, Y. Zhao and Z. Chai (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12(5): 1645-1654.

Banta, G. T., M. Holmer, M. H. Jensen and E. Kristensen (1999). Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in a sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 19(2): 189-204.

Barnes, M. and R. N. Gibson, Eds. (1990). Trophic relationships in the marine environment. Aberdeen, Aberdeen University Press. pp. 630.

Benn, T. M. and P. Westerhoff (2008). Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology* 42(11): 4133-4139.

Bergayou, H., C. Mouneyrac, J. Pellerin and A. Moukrim (2009). Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3): 765-769.

Bergmeyer, H. U., K. Gawehn and M. Grassi (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. NY, Academic Press Inc. pp. 2302.

Bhabra, G., A. Sood, B. Fisher, L. Cartwright, M. Saunders, W. H. Evans, A. Surprenant, G. Lopez-Castejon, S. Mann, S. A. Davis, L. A. Hails, E. Ingham, P. Verkade, J. Lane, K. Heesom, R. Newson and C. P. Case (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat Nano* 4(12): 876-883.

Bigorgne, E., L. Foucaud, E. Lapied, J. Labille, C. Botta, C. Sirguey, J. Falla, J. Rose, E. J. Joner, F. Rodius and J. Nahmani (2011). Ecotoxicological assessment of TiO₂ byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 159(10): 2698-2705.

Bilberg, K., H. Malte, T. Wang and E. Baatrup (2010). Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96(2): 159-165.

Biswas, A., I. S. Bayer, A. S. Biris, T. Wang, E. Dervishi and F. Faupel (2012). Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science* 170(1-2): 2-27.

Blackmore, G. and B. Morton (2002). The influence of diet on comparative trace metal cadmium, copper and zinc accumulation in *Thais clavigera* (Gastropoda: Muricidae) preying on intertidal barnacles or mussels. *Marine Pollution Bulletin* 44(9): 870-876.

Blaise, C., F. Gagné, J. F. Férard and P. Eullaffroy (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology* 23(5): 591-598.

Blinova, I., A. Ivask, M. Heinlaan, M. Mortimer and A. Kahru (2010). Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158(1): 41-47.

Bondarenko, O., A. Ivask, A. Kähkönen and A. Kahru (2012). Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environmental Pollution* 169: 81-89.

Bonnard, M., I.-C. Eom, J.-L. Morel and P. Vasseur (2009). Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50(1): 60-67.

Botta, C., J. Labille, M. Auffan, D. Borschneck, H. Miche, M. Cabié, A. Masion, J. Rose and J.-Y. Bottero (2011). TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. *Environmental Pollution* 159(6): 1543-1550.

Bottero, J.-Y., M. I. Auffan, J. r. m. Rose, C. Mouneyrac, C. I. Botta, J. r. m. Labille, A. Masion, A. Thill and C. Chaneac (2011). Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and

perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. *Comptes Rendus Geoscience* 343(2-3): 168-176.

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

Bryan, G. W. and P. E. Gibbs (1980). Metals in nereid polychaetes: the contribution of metals in the jaws to the total body burden. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60(3): 641-654.

Bryan, G. W. and P. E. Gibbs (1980). Metals in nereid polychaetes: the contribution of metals in the jaws to the total body burden. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 641-654.

Buffet, P.-E., O. F. Tankoua, J.-F. Pan, D. Berhanu, C. Herrenknecht, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, J.-B. Bérard, C. Risso, M. Guibbolini, M. I. Roméo, P. Reip, E. Valsami-Jones and C. Mouneyrac (2011). Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84(1): 166-174.

Buico, A., C. Cassino, F. Dondero, L. Vergani and D. Osella (2008). Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: An ESR study. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102(4): 921-927.

Burlinson, F. C. and A. J. Lawrence (2007). Development and validation of a behavioural assay to measure the tolerance of *Hediste diversicolor* to copper. *Environmental Pollution* 145(1): 274-278.

Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100(1-2): 3-6.

Canesi, L., C. Ciacci, M. Betti, R. Fabbri, B. Canonico, A. Fantinati, A. Marcomini and G. Pojana (2008). Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environment International* 34(8): 1114-1119.

Canesi, L., C. Ciacci, R. Fabbri, A. Marcomini, G. Pojana and G. Gallo (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* 76: 16-21.

Canesi, L., C. Ciacci, D. Vallotto, G. Gallo, A. Marcomini and G. Pojana (2010). In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology* 96(2): 151-158.

Canesi, L., R. Fabbri, G. Gallo, D. Vallotto, A. Marcomini and G. Pojana (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic Toxicology* 100(2): 168-177.

Caquet, T. (2002). Use of aquatic mesocosms in ecotoxicology: State of the art and perspectives. *Radioprotection* 37(C1): C1-173-C171-177.

- Cardoso, P. G., A. I. Lillebø, E. Pereira, A. C. Duarte and M. A. Pardal (2009). Different mercury bioaccumulation kinetics by two macrobenthic species: The bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Environmental Research* 68(1): 12-18.
- Casagrande, C. and C. F. Boudouresque (2005). Erratum: Abundance, Population Structure and Production of *Scrobicularia plana* and *Abra tenuis* (Bivalvia: Scrobicularidae) in a Mediterranean Brackish Lagoon, Lake Ichkeul, Tunisia. *International Review of Hydrobiology* 90(5-6): 638-638.
- Cattaneo, A., R. Gornati, M. Chiriva-Internati and G. Bernardini (2009). Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal* 6(1): 78-97.
- Chae, Y. J., C. H. Pham, J. Lee, E. Bae, J. Yi and M. B. Gu (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 94(4): 320-327.
- Chen, D., D. Zhang, J. C. Yu and K. M. Chan (2011). Effects of Cu₂O nanoparticle and CuCl₂ on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquatic Toxicology* 105(3-4): 344-354.
- Chen, M. and A. von Mikecz (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Experimental Cell Research* 305(1): 51-62.
- Chen, N., Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai and C. Fan (2012). The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33(5): 1238-1244.
- Chesman, B. S. and W. J. Langston (2006). Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biology letters* 2: 420-422.
- Cho, S. J., D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth and F. M. Winnik (2007). Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. *Langmuir* 23(4): 1974-1980.
- Choi, O., K. K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross Jr, R. Y. Surampalli and Z. Hu (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42(12): 3066-3074.
- Chung, H., Y. Son, T. K. Yoon, S. Kim and W. Kim (2011). The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 569-575.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R. A. (ed), *CRC Handbook of Methods of Oxygen Radicals Research*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 283-284
- Commission of the European Communities (2008). *Regulatory Aspects of Nanomaterials*. Brussels. pp 11.
- Cong, Y. (2011). Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and aqueous-Ag in the estuarine polychaete, *Nereis (Hediste) diversicolor*. PhD Thesis. pp. 166
- Cong, Y., G. T. Banta, H. Selck, D. Berhanu, E. Valsami-Jones and V. E. Forbes (2011). Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. *Aquatic Toxicology* 105(3-4): 403-411.

- Croteau, M.-N., A. D. Dybowska, S. N. Luoma and E. Valsami-Jones (2011). A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5(1): 79-90.
- Croteau, M. N., S. N. Luoma, B. R. Topping and C. B. Lopez (2004). Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve *Corbicula*. *Environmental Science & Technology* 38(19): 5002-5009.
- Dales, R. P. (1950). The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* O. F. Müller. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 29(2): 321-360.
- Dales, R. P. and G. Y. Kennedy (1954). On the diverse colours of *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 33(3): 699-708.
- Davison, W. and H. Zhang (1994). *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367: 546-548.
- Diamantino, T. C., E. Almeida, A. M. V. M. Soares and L. Guilhermino (2001). Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* 45(4-5): 553-560.
- Diegoli, S., A. L. Manciuola, S. Begum, I. P. Jones, J. R. Lead and J. A. Preece (2008). Interaction between manufactured gold nanoparticles and naturally occurring organic macromolecules. *Science of The Total Environment* 402(1): 51-61.
- Domingos, R. F., M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard and K. J. Wilkinson (2009). Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology* 43(19): 7277-7284.
- Domingos, R. F., D. F. Simon, C. Hauser and K. J. Wilkinson (2011). Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* – Nanoparticles or the Free Ions? *Environmental Science & Technology* 45(18): 7664-7669.
- Drobne, D., A. Jemec and Å. i. Pipan Tkalec (2009). In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂. *Environmental Pollution* 157(4): 1157-1164.
- Durou, C. (2006). Recherche d'indicateurs de l'état physiologique de l'annélide polychète endogée *Nereis diversicolor* en relation avec la qualité du milieu Nantes. Université de Nantes. pp. 201.
- Dybowska, A. D., M.-N. Croteau, S. K. Misra, D. Berhanu, S. N. Luoma, P. Christian, P. O'Brien and E. Valsami-Jones (2011). Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environmental Pollution* 159(1): 266-273.
- Eisler, R. (1985). Cadmium Hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review, Contaminant Hazard Reviews. Report 2. pp. 30.
- Eisler, R., Ed. (2007). *Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals*. Elsevier Science Ltd, Oxford. pp. 986.

Ellumalai, M., C. Antunes and L. Guilhermino (2002). Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water, air and soil pollution* 141: 273-280.

Esselink, P. and L. Zwarts (1989). Seasonal trend in burrow depth and tidal variation in feeding activity of *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress Series* 56: 243-254.

European Commission. (2009). *Nanotechnology for Sustainable Economy European and International Forum on Nanotechnology (EuroNanoForum 2009)*. Czech Republic. pp 14.

Fabrega, J. Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R. (2011). Silver nanoparticles Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 37(2): 517-531.

Fahmy, B. and S. A. Cormier (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 23(7): 1365-1371.

FAO, Ed. (2009). *Biosafety of Genetically Modified Organisms: Basic concepts, methods and issues*.

Farré, M., K. Gajda-Schranz, L. Kantiani and D. Barceló (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(1): 81-95.

Fauchald, K. and P. A. Jumars (1979). The diet of worms : a study of polychaete feeding guilds. *Oceanography and Marine Biology: Annual Review* 17: 193-284.

Federici, G., B. J. Shaw and R. D. Handy (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84(4): 415-430.

Ferry, J. L., P. Craig, C. Hexel, P. Sisco, R. Frey, P. L. Pennington, M. H. Fulton, I. G. Scott, A. W. Decho, S. Kashiwada, C. J. Murphy and T. J. Shaw (2009). Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nat Nano* 4(7): 441-444.

Fischer, W., M.-L. Bauchot and M. Shneider, Eds. (1987). *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37., FAO et la Commission des Communautés Européennes*.

Fossi Tankoua, O., J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, B. Berthet, C. Mouneyrac and P. S. Rainbow (2010). Towards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine ecosystems. *ICES E-paper*.

Fossi Tankoua, O., P. E. Buffet, J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, V. Méléder, P. Gillet, C. Mouneyrac and B. Berthet (2012). Intersite variations of a battery of biomarkers at different levels of biological organisation in the estuarine endobenthic worm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Aquatic Toxicology* 114–115: 96-103.

Frasco, M. F. and L. Guilhermino (2002). Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(2): 149-156.

- Freeman, R. F. H. and F. H. Rigler (1957). The responses of *Scrobicularia plana* (da Costa) to osmotic pressure changes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 36(03): 553-567.
- Frenkiel, L. and M. Mouëza (1979). Développement larvaire de deux Tellinacea, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Marine Biology* 55(3): 187-195.
- Fröhlich, E., C. Samberger, T. Kueznik, M. Absenger, E. Roblegg, A. Zimmer and T. R. Pieber (2009). Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *The Journal of toxicological sciences* 34(4): 363-375.
- Gagnaire, B., M. Gay, A. Huvet, J.-Y. Daniel, D. Saulnier and T. Renault (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84(1): 92-102.
- Gagné, F., J. Auclair, P. Turcotte, M. Fournier, C. Gagnon, S. Sauvé and C. Blaise (2008). Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* 86(3): 333-340.
- Gagné, F., M. Fortier, L. Yu, H. L. Osachoff, R. C. Skirrow, G. van Aggelen, C. Gagnon and M. Fournier (2010). Immunocompetence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots. *Journal of Environmental Monitoring* 12(8): 1556-1565.
- Gagneux-Moreaux, S., C. Moreau, J.-L. Gonzalez and R. Cosson (2007). Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 19(5): 549-556.
- Galgani, F. and G. Bocquene (1991). Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* 25(2): 147-150.
- Galloway, T., C. Lewis, I. Dolciotti, B. D. Johnston, J. Moger and F. Regoli (2010). Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158(5): 1748-1755.
- Gao, J., S. Youn, A. Hovsepyan, V. n. L. Llaneza, Y. Wang, G. Bitton and J.-C. J. Bonzongo (2009). Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. *Environmental Science & Technology* 43(9): 3322-3328.
- Gao, X., W. C. W. Chan and S. Nie (2002). Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *Journal of Biomedical Optics* 7(4): 532.
- Alonso, J., F. R. Khan, S. K. Misra, M. Turmaine, B. D. Smith, P. S. Rainbow, S. N. Luoma and E. Valsami-Jones (2011). Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Science & Technology* 45(10): 4630-4636.
- Gerhardt, A. and S. Schmidt (2002). The multispecies freshwater biomonitor a potential new tool for sediment biotests and biomonitoring. *Journal of Soils and Sediments* 2(2): 67-70.

- Gerhardt, A., S. Schmidt and S. Höss (2002). Measurement of movement patterns of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) with the Multispecies Freshwater Biomonitor® (MFB) - a potential new method to study a behavioral toxicity parameter of nematodes in sediments. . Environmental Pollution 120(3): 513-516.
- Gilbert, F., F. François, G. Stora and J.-C. Bertrand (1997). Inhibition de la dénitrification par les hydrocarbures dans les sédiments marins. Rôle de *Nereis diversicolor*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 320(10): 819-824.
- GIP Loire Estuaire (2003). Cahier indicateur n°1, La dynamique de la vie, les peuplements, le benthos., Loire Estuaire Cellule de Mesures et de Bilans.
- Goldberg, E. D. (1986). The Mussel Watch concept. Environmental Monitoring and Assessment 7(1): 91-103.
- Gomes, T., M. Gonzalez-Rey and M. Bebianno (2009). Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). Ecotoxicology 18(8): 1104-1109.
- Gomes, T., C. G. Pereira, C. Cardoso, J. P. Pinheiro, I. Cancio and M. J. Bebianno (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 118-119: 72-79.
- Gomes, T., J. P. Pinheiro, I. Cancio, C. G. Pereira, C. Cardoso and M. J. Bebianno (2011). Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environmental Science & Technology 45(21): 9356-9362.
- Gottschalk, F., T. Sonderer, R. W. Scholz and B. Nowack (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environmental Science & Technology 43(24): 9216-9222.
- Grassian, V. H., Ed. (2008). Nanoscience and Nanotechnology Environmental and Health Impacts, John Wiley & Sons. pp. 470
- Green, J. (1957). The growth of *Scrobicularia plana* (da costa) in the Gwendraeth estuary. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 36(1): 41-47.
- Grémare, A. and P. J. W. Olive (1986). A preliminary study of fecundity and reproductive effort in two polychaetous annelids with contrasting reproductive strategies. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development 9: 1-16.
- Griffitt, R. J., K. Hyndman, N. D. Denslow and D. S. Barber (2009). Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. Toxicological Sciences 107(2): 404-415.
- Griffitt, R. J., J. Luo, J. Gao, J.-C. Bonzongo and D. S. Barber (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry 27(9): 1972-1978.

- Griffitt, R. J., R. Weil, K. A. Hyndman, N. D. Denslow, K. Powers, D. Taylor and D. S. Barber (2007). Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 41(23): 8178-8186.
- Guerra-García, J., M. Maestre, A. González and J. García-Gómez (2006). Assessing a Quick Monitoring Method Using Rocky Intertidal Communities as a Bioindicator: A Multivariate Approach in Algeciras Bay. *Environmental Monitoring and Assessment* 116(1): 345-361.
- Guerreiro, J. (1998). Growth and production of the bivalve *Scrobicularia plana* in two southern European estuaries. *Vie et Milieu* 48: 121-131.
- Gulson, B. and H. Wong (2006). Stable isotopic tracing e a way forward for nanotechnology. *Environmental Health Perspectives* 114(10): 1486-1488.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.
- Halliwell, B. and J. Gutteridge, Eds. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford. pp 888.
- Handy, R., N. van den Brink, M. Chappell, M. Mühling, R. Behra, M. Dušinská, P. Simpson, J. Ahtiainen, A. Jha, J. Seiter, A. Bednar, A. Kennedy, T. Fernandes and M. Riediker (2012). Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology* 21(4): 933-972.
- Handy, R., F. von der Kammer, J. Lead, M. Hassellöv, R. Owen and M. Crane (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17(4): 287-314.
- Hannam, M. L., S. D. Bamber, J. A. Moody, T. S. Galloway and M. B. Jones (2009). Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquatic Toxicology* 92(3): 187-194.
- Hansen, K. and E. Kristensen (1998). The impact of the polychaete *Nereis diversicolor* and enrichment with macroalgal (*Chaetomorpha linum*) detritus on benthic metabolism and nutrient dynamics in organic-poor and organic-rich sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 231(2): 201-223.
- Hao, L., Z. Wang and B. Xing (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21(10): 1459-1466.
- Hardman, R. (2006). A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ health Perspect* 114(2): 165-172.
- Hassellöv, M. and R. Kaegi (2009). Analysis and Characterization of Manufactured Nanoparticles in Aquatic Environments. *Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Ltd. pp. 211-266.

- Hassler, C. S., V. I. Slaveykova and K. J. Wilkinson (2004). Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography-Methods* 2: 237-247.
- Heinlaan, M., A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier and A. Kahru (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71(7): 1308-1316.
- Heinlaan, M., A. Kahru, K. Kasemets, B. Arbeille, G. Prensier and H.-C. Dubourguier (2011). Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. *Water Research* 45(1): 179-190.
- Hester, R. E. and R. M. Harrison, Eds. (2007). *Nanotechnology Consequences for Human Health and the Environment*. Nanotechnology, RSC Publishing. pp. 134.
- Hooper, H. L., K. Jurkschat, A. J. Morgan, J. Bailey, A. J. Lawlor, D. J. Spurgeon and C. Svendsen (2011). Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment International* 37(6): 1111-1117.
- Hu, C. W., M. Li, Y. B. Cui, D. S. Li, J. Chen and L. Y. Yang (2010). Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42(4): 586-591.
- Hughes, R. N. (1969). A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49(3): 805-823.
- Hughes, R. N. (1971). Reproduction of *Scrobicularia plana* Da Costa (Pelecypoda: Semelidae) in North Wales. *Veliger* 14: 77-81.
- Hull, M. S., P. Chaurand, J. Rose, M. Auffan, J.-Y. Bottero, J. C. Jones, I. R. Schultz and P. J. Vikesland (2011). Filter-Feeding Bivalves Store and Biodeposit Colloidally Stable Gold Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 45(15): 6592-6599.
- Hullmann (2006). The economic development of nanotechnology-An indicators based analysis European Commission, DG Research. pp. 34.
- Hwang, D. and J. Bradley (2010) The recession's ripple effect on nanotech.
- Hyung, H., J. D. Fortner, J. B. Hughes and J.-H. Kim (2007). Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. *Environmental Science & Technology* 41(1): 179-184.
- Ispas, C., D. Andreescu, A. Patel, D. V. Goia, S. Andreescu and K. N. Wallace (2009). Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish. *Environmental Science & Technology* 43(16): 6349-6356.
- Jemec, A., D. Drobne, M. Remškar, K. Sepčić and T. Tišler (2008). Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1904-1914.

Johnston, B. D., T. M. Scown, J. Moger, S. A. Cumberland, M. Baalousha, K. Linge, R. van Aerle, K. Jarvis, J. R. Lead and C. R. Tyler (2010). Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environmental Science & Technology* 44(3): 1144-1151.

Ju-Nam, Y. and J. R. Lead (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment* 400(1–3): 396-414.

Judy, J. D., J. M. Unrine and P. M. Bertsch (2011). Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science & Technology* 45(2): 776-781.

Kadar, E., D. Lowe, M. Solé, A. Fisher, A. Jha, J. Readman and T. Hutchinson (2010). Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble FeCl₃ in excised mussel gills. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(2): 657-666.

Kadar, E., F. Simmance, O. Martin, N. Voulvoulis, S. Widdicombe, S. Mitov, J. R. Lead and J. W. Readman (2010). The influence of engineered Fe₂O₃ nanoparticles and soluble (FeCl₃) iron on the developmental toxicity caused by CO₂-induced seawater acidification. *Environmental Pollution* 158(12): 3490-3497.

Kadar, E., G. A. Tarran, A. N. Jha and S. N. Al-Subiai (2011). Stabilization of Engineered Zero-Valent Nanoiron with Na-Acrylic Copolymer Enhances Spermiotoxicity. *Environmental Science & Technology* 45(8): 3245-3251.

Kaegi, R., A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt and M. Boller (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* 156(2): 233-239.

Kandlikar, M., G. Ramachandran, A. Maynard, B. Murdock and W. A. Toscano (2007). Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment

Karlsson, H. (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(2): 651-666.

(2008). Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* 21(9): 1726-1732.

Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong and M.-H. Cho (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 3(1): 95-101.

Kim, K. T., S. J. Klaine, J. Cho, S.-H. Kim and S. D. Kim (2010). Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of The Total Environment* 408(10): 2268-2272.

Kirkpatrick, A. J., A. Gerhardt, J. T. A. Dick, M. McKenna and J. A. Berges (2006). Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas,

1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(3): 298-303.

Klabunde, K. J., Ed. (2001). *Nanoscale Materials in Chemistry*. New York, John Wiley & Sons. pp 304.

Klaine, S. J., P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin and J. R. Lead (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1825-1851.

Klaine, S. J., A. A. Koelmans, N. Horne, S. Carley, R. D. Handy, L. Kapustka, B. Nowack and F. von der Kammer (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1): 3-14.

Klaper, R., J. Crago, J. Barr, D. Arndt, K. Setyowati and J. Chen (2009). Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: Changes in toxicity with functionalization. *Environmental Pollution* 157(4): 1152-1156.

Koehler, A., U. Marx, K. Broeg, S. Bahns and J. Bressling (2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas A new threat to marine life? *Marine Environmental Research* 66(1): 12-14.

Kool, P. L., M. D. Ortiz and C. A. van Gestel (2011). Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* 159: 2713-2719.

Kuhn, T., M. Krudysz, Y. Zhu, P. M. Fine, W. C. Hinds, J. Froines and C. Sioutas (2005). Volatility of indoor and outdoor ultrafine particulate matter near a freeway. *Journal of Aerosol Science* 36(3): 291-302.

Labille, J., J. Feng, C. Botta, D. Borschneck, M. Sammut, M. Cabie, M. Auffan, J. Rose and J.-Y. Bottero (2010). Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution* 158(12): 3482-3489.

Lagadic, L., T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade, Eds. (1997). *Biomarqueurs en Ecotoxicologie, Aspects Fondamentaux*. Paris, Masson. pp. 420.

Langston, W. J., G. R. Burt and B. S. Chesman (2007). Feminisation of male clams *Scrobicularia plana* from estuaries in Southwest UK and its induction by endocrine-disrupting chemicals. *Marine Ecology Progress Series* 333: 173-184.

Lapied, E., J. Y. Nahmani, E. Moudilou, P. Chaurand, J. Labille, J. Rose, J.-M. Exbrayat, D. H. Oughton and E. J. Joner (2011). Ecotoxicological effects of an aged TiO₂ nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International* 37(6): 1105-1110.

Larner, F. and M. Rehkämper (2012). Evaluation of Stable Isotope Tracing for ZnO Nanomaterials—New Constraints from High Precision Isotope Analyses and Modeling. *Environmental Science & Technology* 46:4149-4158.

- Lead, J. R. and K. J. Wilkinson (2007). Environmental Colloids and Particles: Current Knowledge and Future Developments. Environmental Colloids and Particles, John Wiley & Sons, Ltd. pp. 702.
- Lee, S.-W., S.-M. Kim and J. Choi (2009). Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. Environmental Toxicology and Pharmacology 28(1): 86-91.
- Levard, C., E. M. Hotze, G. V. Lowry and G. E. Brown (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. Environmental Science & Technology 46(13): 6900-6914.
- Li, J. J., D. Hartono, C.-N. Ong, B.-H. Bay and L.-Y. L. Yung (2010). Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. Biomaterials 31(23): 5996-6003.
- Li, K. G., J. T. Chen, S. S. Bai, X. Wen, S. Y. Song, Q. Yu, J. Li and Y. Q. Wang (2009). Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. Toxicology in Vitro 23(6): 1007-1013.
- Li, Y., S. Yu, Q. Wu, M. Tang, Y. Pu and D. Wang (2012). Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. Journal of Hazardous Materials 219–220: 221-230.
- Licciano, M., L. Stabili, A. Giangrande and R. A. Cavallo (2007). Bacterial accumulation by *Branchiommia luctuosum* (Annelida: Polychaeta): A tool for biomonitoring marine systems and restoring polluted waters. Marine Environmental Research 63(3): 291-302.
- Limbach, L. K., Y. Li, R. N. Grass, T. J. Brunner, M. A. Hintermann, M. Muller, D. Gunther and W. J. Stark (2005). Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. Environmental Science & Technology 39(23): 9370-9376.
- Linkov, I., J. Steevens, G. Adlakha-Hutcheon, E. Bennett, M. Chappell, V. Colvin, J. Davis, T. Davis, A. Elder, S. Foss Hansen, P. Hakkinen, S. Hussain, D. Karkan, R. Korenstein, I. Lynch, C. Metcalfe, A. Ramadan and F. Satterstrom (2009). Emerging methods and tools for environmental risk assessment, decision-making, and policy for nanomaterials: summary of NATO Advanced Research Workshop. Journal of Nanoparticle Research 11(3): 513-527.
- Liu, J., A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T. T. Lee, D. T. Colbert and R. E. Smalley (1998). Fullerene Pipes. Science 280.
- Long, S. M., K. J. Ryder and D. A. Holdway (2003). The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis planulatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 55(3): 261-270.

- Louis, S., F. Gagne, J. Auclair, P. Turcotte, C. Gagnon and C. Emond (2010). The characterisation of the behaviour and gill toxicity of CdS CdTe quantum dots in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology* 1(1): 52-69.
- Lovern, S. B., J. R. Strickler and R. Klaper (2007). Behavioral and Physiological Changes in *Daphnia magna* when Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environmental Science & Technology* 41(12): 4465-4470.
- Lovrić, J., S. J. Cho, F. M. Winnik and D. Maysinger (2005). Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death. *Chemistry & Biology* 12(11): 1227-1234.
- Luna-Acosta, A., P. Bustamante, J. Godefroy, I. Fruitier-Arnaudin and H. Thomas-Guyon (2010). Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *environmental science and pollution research* 17(4): 999-1008.
- Luna-Acosta, A., E. Rosenfeld, M. Amari, I. Fruitier-Arnaudin, P. Bustamante and H. Thomas-Guyon (2010). First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* 28(4): 719-726.
- Luoma, S. and P. Rainbow (2008). *Metal Contamination in Aquatic Environments*. Cambridge. pp 588.
- Luoma, S. N., Y. B. Ho and G. W. Bryan (1995). Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Marine Pollution Bulletin* 31(1-3): 44-54.
- Lux Research. (2006). *The Nanotech Report*. 19 June 2006.
- Ma, R., C. Levard, S. M. Marinakos, Y. Cheng, J. Liu, F. M. Michel, G. E. Brown and G. V. Lowry (2011). Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 46(2): 752-759.
- Manusadžianas, L., C. Caillet, L. Fachetti, B. Gylytė, R. Grigutytė, S. Jurkonienė, R. Karitonas, K. Sadauskas, F. Thomas, R. Vitkus and J.-F. Férard (2012). Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1): 108-114.
- Marty, R. (1997). *Biologie de la reproduction et du développement de deux espèces d'annélides polychètes Nereis diversicolor (O.F. Müller) et Perinereis cultrifera (Grübe Dinard)*, Université de Rennes 1. pp. 208.
- Maynard, A. D. and Pui, D. Y. H. *Nanotechnology and Occupational Health*. Springer Netherlands. pp 186.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 244(22): 6049-6055.
- Merchant, B. (1998). Gold, the Noble Metal and the Paradoxes of its Toxicology. *Biologicals* 26(1): 49-59.

- Meyer, J.N., Lord, C.A., Yang, X.Y., Turner, E.A., Badireddy, A.R., Marinakos, S.M., Chilkoti, A. Wiesner, M.R., Auffan, M. (2010). Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology* 100: 140-150
- Misra, S. K., A. Dybowska, D. Berhanu, M. N. Croteau, S. N. Luoma, A. R. Boccaccini and E. Valsami-Jones (2011). Isotopically Modified Nanoparticles for Enhanced Detection in Bioaccumulation Studies. *Environmental Science & Technology* 46(2): 1216-1222.
- Monteiro-Riviere, Ed. (2007). *Nanotoxicology Characterization, Dosing and Health Effects*. North Carolina, USA, Informa Healthcare. pp 432.
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32(8): 967-976.
- Moreau, J.-L., M. Baudrimont, P. Carrier, G. Peltier and J.-P. Bourdineaud (2008). Metal binding and antioxidant properties of chimeric tri- and tetra-domained metallothioneins. *Biochimie* 90(5): 705-716.
- Moreira, S. M., M. Moreira-Santos, L. Guilhermino and R. Ribeiro (2005). A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hediste diversicolor* (polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(8): 2010-2018.
- Mortimer, M., K. Kasemets and A. Kahru (2009). Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269(2-3): 182-189.
- Mouneyrac, C., J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, A. Cottier, P. S. Rainbow and B. D. Smith (2002). Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 57(4): 225-242.
- Mouneyrac, C., S. Linot, J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, I. Métais, C. Durou, C. Minier and J. Pellerin (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. *General and Comparative Endocrinology* 157(2): 133-141.
- Musee, N., P. J. Oberholster, L. Sikhivihilu and A. M. Botha (2010). The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere* 81(10): 1196-1203.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23): 8959-8964.
- Ng, T. Y.-T., C. Amiard-Triquet, P. S. Rainbow, J. C. Amiard and W.-X. Wang (2005). Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 299: 179-191.

- Nogueira, V., I. Lopes, T. Rocha-Santos, A. L. Santos, G. M. Rasteiro, F. Antunes, F. Gonçalves, A. M. V. M. Soares, A. Cunha, A. Almeida, N. N. C. M. Gomes and R. Pereira (2012). Impact of organic and inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure. *Science of The Total Environment* 424: 344-350.
- Nott, J. A. and A. Nicolaidou (1990). Transfer of metal detoxification along marine food chains. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70(04): 905-912.
- Nowack, B. and T. D. Bucheli (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1): 5-22.
- Oberdörster, G., A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang and null (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology* 2: 8.
- Obolewski, K., A. Strzelczak and K. Bodo (2009). Quantitative structure of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) in estuary zones of the southern Baltic Sea (Polish central coastline). *Baltic Coastal Zone* 13: 147-161.
- Olive, P. J. W. and P. R. G. Garwood (1981). Gametogenic cycle and population structure of *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor* and *Nereis* (*Nereis*) *pelagica* from north-east England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 61: 193-213.
- Oukarroum, A., S. Bras, F. Perreault and R. Popovic (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 80-85.
- Ozawa, T., J. Ueda and Y. Shimazu (1993). DNA single strand breakage by copper(II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions. *biochemical and molecular biology international* 31: 455-461.
- Paik, S. Y., D. M. Zalk and P. Swuste (2008). Application of a Pilot Control Banding Tool for Risk Level Assessment and Control of Nanoparticle Exposures. *Annals of Occupational Hygiene* 52(6): 419-428.
- Pan, J.-F., P.-E. Buffet, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, D. Gilliland, Y. Joubert, P. Pilet, M. Guibbolini, C. Risso de Faverney, M. Roméo, E. Valsami-Jones and C. Mouneyrac (2012). Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environmental Pollution* 168: 37-43.
- Pang, C., H. Selck, S. K. Misra, D. Berhanu, A. Dybowska, E. Valsmai-Jones and V. E. Forbes (2012). Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Environmental Science & Technology* 106-107(9): 114-122.
- Park, E.-J., J. Yi, K.-H. Chung, D.-Y. Ryu, J. Choi and K. Park (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters* 180(3): 222-229.

Parveen, S., R. Misra and S. K. Sahoo (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8(2): 147-166.

Petridis, P., A. N. Jha and W. J. Langston (2009). Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology* 94(1): 8-15.

Peyrot, C., C. Gagnon, F. o. Gagné, K. J. Willkinson, P. Turcotte and S. b. Sauvé (2009). Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(2): 246-251.

Pipan-Tkalec, Å. i., D. Drobne, A. Jemec, T. Romih, P. Zidar and M. Bele (2010). Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology* 269(2-3): 198-203.

Pipan-Tkalec, Ž., D. Drobne, A. Jemec, T. Romih, P. Zidar and M. Bele (2010). Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology* 269(2-3): 198-203.

Poirier, L., B. Berthet, J.-C. Amiard, A.-Y. Jeantet and C. Amiard-Triquet (2006). A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(1): 71-82.

Powers, K. W., S. C. Brown, V. B. Krishna, S. C. Wasdo, B. M. Moudgil and S. M. Roberts (2006). Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicological Sciences* 90(2): 296-303.

Powers, K. W., M. Palazuelos, B. M. Moudgil and S. M. Roberts (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology* 1(1): 42-51.

Priester, J. H., P. K. Stoimenov, R. E. Mielke, S. M. Webb, C. Ehrhardt, J. P. Zhang, G. D. Stucky and P. A. Holden (2009). Effects of Soluble Cadmium Salts Versus CdSe Quantum Dots on the Growth of Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* 43(7): 2589-2594.

Rainbow, P. S., A. Geffard, A.-Y. Jeantet, B. D. Smith, J. C. Amiard and C. Amiard-Triquet (2004). Enhanced food-chain transfer of copper from a diet of copper-tolerant estuarine worms. *Marine Ecology Progress Series* 271: 183-191.

Rainbow, P. S., S. N. Luoma and W.-X. Wang (2011). Trophically available metal – A variable feast. *Environmental Pollution* 159(10): 2347-2349.

Rainbow, P. S., L. Poirier, B. D. Smith, K. V. Brix and S. N. Luoma (2006). Trophic transfer of trace metals from the polychaete worm *Nereis diversicolor* to polychaetes *Nereis virens* and the decapod crustacean *Palaemonetes varians*. *Marine Ecology Progress Series* 321: 167-181.

Raleigh, J. and B. F. Keegan (2006). The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (Mollusca: Bivalvia) in Mweeloon Bay (Galway, west coast of Ireland). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(5): 1157-1162.

Ramsden, C., T. Smith, B. Shaw and R. Handy (2009). Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18(7): 939-951.

Regoli, F., R. Bocchetti and D. W. Filho (2011). Spectrophotometric Assays of Antioxidants. in *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (eds D. Abele, J. P. Vázquez-Medina and T. Zenteno-Savín), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Rehkämper, M., F. Lerner, B. J. Coles and D. Weiss (2010). Stable Isotope Tracing of Engineered ZnO Nanomaterials. In *support of prospect: Ecotoxicology Test Protocols for Representative Nanomaterials in Support of the OECD Sponsorship Programme*. pp. 27.

Riisgard, H. U. (1991). Suspension feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Biology* 70: 29-37.

Ringwood, A. H., N. Levi-Polyachenko and D. L. Carroll (2009). Fullerene Exposures with Oysters: Embryonic, Adult, and Cellular Responses. *Environmental Science & Technology* 43(18): 7136-7141.

Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP and R. R. (2001). Toxic effects of wastewaters collected at upstream and downstream sites of a purification station in cultures of rainbow trout hepatocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 129-141.

-Rúa, A., M. A. Prado, Z. Romero and M. Bruzón (2003). The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir estuary (Cádiz, SW Spain). *Aquaculture* 217(1-4): 157-166.

Royal Commission on Environmental Pollution (2008). *Novel Materials in the Environment: The case of Nanotechnology*. UK, TSO (The stationery Office). pp. 205.

Santos, S., P. C. Luttikhuisen, J. Campos, C. H. R. Heip and H. W. van der Veer (2011). Spatial distribution patterns of the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along the European coast: A review. *Journal of Sea Research* 66(3): 238-247.

Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Muller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia* 470(1-3): 203-218.

SCENIHR (2010). *Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”*. pp. 43

Sellers, K., C. Mackay, L. L. Bergeson, S. R. Clough, M. Hoyt, J. Chen, K. Henry and J. Hamblen, Eds. (2009). *Nanotechnology and the Environment*, CRC Press. pp. 296.

Simeonova, P. P., N. Opopol and M. I. Luster, Eds. (2007). *Nanotechnology-Toxicological Issues and Environmental Safety*, Springer.

- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1): 184-191.
- Sizova, E., S. Miroshnikov, V. Polyakova, N. Gluschenko and A. Skalny (2012). Copper Nanoparticles as Modulators of Apoptosis and Structural Changes in Tissues. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3: 97-104.
- Sola, J. C. (1997). Reproduction, population dynamics, growth and production *Scrobicularia plana* da costa (pelecypoda) in the Bidasoa estuary, Spain. *Aquatic Ecology* 30(4): 283-296.
- Solé, M., J. Kopecka-Pilarczyk and J. Blasco (2009). Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environment International* 35(3): 523-531.
- Som, C., M. Berges, Q. Chaudhry, M. Dusinska, T. F. Fernandes, S. I. Olsen and B. Nowack (2010). The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology* 269(2-3): 160-169.
- Stone, V., B. Nowack, A. Baun, N. van den Brink, F. von der Kammer, M. Dusinska, R. Handy, S. Hankin, M. Hassellöv, E. Joner and T. F. Fernandes (2010). Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment* 408(7): 1745-1754.
- Su, Y., M. Hu, C. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L.-h. Wang, P. Shen and Q. Huang (2010). The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties. *Biomaterials* 31(18): 4829-4834.
- Suresh, A. K., D. A. Pelletier, W. Wang, J.-W. Moon, B. Gu, N. P. Mortensen, D. P. Allison, D. C. Joy, T. J. Phelps and M. J. Doktycz (2010). Silver Nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Environmental Science & Technology* 44(13): 5210-5215.
- Tankoua, O., P.-E. Buffet, J.-C. Amiard, C. Amiard-Triquet, C. Mouneyrac and B. Berthet (2011). Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *environmental science and pollution research* 18(8): 1253-1263.
- Tedesco, S., H. Doyle, J. Blasco, G. Redmond and D. Sheehan (2010). Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151(2): 167-174.
- Tedesco, S., H. Doyle, J. Blasco, G. Redmond and D. Sheehan (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 100(2): 178-186.
- Tedesco, S., H. Doyle, G. Redmond and D. Sheehan (2008). Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 66(1): 131-133.

- Thomas, T., K. Thomas, N. Sadrieh, N. Savage, P. Adair and R. Bronaugh (2006). Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part VII: Evaluating Consumer Exposure to Nanoscale Materials. *Toxicological Sciences* 91(1): 14-19.
- Tiede, K., M. Hassellöv, E. Breitbarth, Q. Chaudhry and A. B. A. Boxall (2009). Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1216(3): 503-509.
- Townsend, M., J. Hewitt, N. Philips and G. Coco (2009). Interactions between heavy metals, sediment and cockle feeding and movement. A. R. C. T. R. T. 2010/023.
- Trebbles, N. (1976) British bivalve seashells: a handbook for identification. pp. 212.
- Underwood, G. J. C. and J. Kromkamp (1999). Primary Production by Phytoplankton and Microphytobenthos in Estuaries. *Advances in Ecological Research*. D. B. Nedwell and D. G. Raffaelli, Academic Press. Volume 29: 93-153.
- Verdelhos, T., J. M. Neto, J. C. Marques and M. A. Pardal (2005). The effect of eutrophication abatement on the bivalve *Scrobicularia plana*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63(1-2): 261-268.
- Viarengo, A., B. Burlando, M. Cavaletto, B. Marchi, E. Ponzano and J. Blasco (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277(1612-1619).
- Wang, F., F. Costabile, H. Li, D. Fang and I. Alligrini (2010). Measurements of ultrafine particle size distribution near Rome. *Atmospheric Research* 98(1): 69-77.
- Wang, J., Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai and C. Chen (2008). Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 254(1-2): 82-90.
- Wang, J., X. Zhu, X. Zhang, Z. Zhao, H. Liu, R. George, J. Wilson-Rawls, Y. Chang and Y. Chen (2011). Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles. *Chemosphere* 83(4): 461-467.
- Wang, W.-X. and P. S. Rainbow (2005). Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61(2): 145-159.
- Wang, Z., J. Zhao, F. Li, D. Gao and B. Xing (2009). Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere* 77(1): 67-73.
- Warheit, D. B. (2008). How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicological Sciences* 101(2): 183-185.
- Weis, J. S., L. Bergey, J. Reichmuth and A. Candelmo (2011). Living in a Contaminated Estuary: Behavioral Changes and Ecological Consequences for Five Species. *BioScience* 61: 375-385.

- Wiesner, M. R., G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou and P. Biswas (2006). Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 40(14): 4336-4345.
- Wiesner, R. and J.-Y. Bottero, Eds. (2007). *Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials*. pp. 540.
- Wigginton, N. S., K. L. Haus and M. F. Hochella Jr (2007). Aquatic environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Monitoring* 9(12): 1306-1316.
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82-83: 969-974.
- Woodrow Wilson Institut. (2012). "The Project on Emerging Nanotechnology." from <http://www.nanotechproject.org>.
- Wood, C. M., M. D. McDonald, P. Walker, M. Grosell, J. F. Barimo, R. C. Playle and P. J. Walsh (2004). Bioavailability of silver and its relationship to ionoregulation and silver speciation across a range of salinities in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquatic Toxicology* 70(2): 137-157.
- Worall, C. M. and J. Widdows (1983). Physiological changes following transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* between three populations. *Marine Ecology Progress Series* 12(281-287).
- Wu, R. S. S. and P. K. S. Lam (1997). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): Possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research* 31(11): 2797-2801.
- Xia, T., N. Li and A. E. Nel (2009). Potential Health Impact of Nanoparticles. *Annual Review of Public Health* 30(1): 137-150.
- Xie, H., M. Mason Michael and P. Wise John (2011). Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health*. 26: 251-268.
- Xiong, D., T. Fang, L. Yu, X. Sima and W. Zhu (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of The Total Environment* 409(8): 1444-1452.
- Zhao, J., Z. Wang, X. Liu, X. Xie, K. Zhang and B. Xing (2011). Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *Journal of Hazardous Materials* 197(0): 304-310.
- Zhu, X., Y. Chang and Y. Chen (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78(3): 209-215.
- Zuykov, M., E. Pelletier and S. Demers (2011). Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 71(1): 17-21.

Annexe 1

Acquisition de compétences et contributions des différents collègues au sein de ce projet.

Cette thèse a été l'occasion de faire l'acquisition de très nombreuses connaissances et compétences dans des domaines variés en travaillant avec mes collègues. Ainsi, je me suis chargé de la conception des différents dispositifs expérimentaux utilisés durant cette thèse avec pour but d'approcher les conditions de l'environnement et d'assurer le maintien des deux modèles d'étude (*S. plana* et *H. diversicolor*) au laboratoire. De plus, la collaboration avec M. Richard m'a permis de mettre en place des mésocosmes pour l'étude de l'écotoxicité des NP.

D'un point de vue technique, j'ai bénéficié de formations pour le dosage des métaux (J.C. Amiard), les mesures de biomarqueurs (I. Métais et F. Gourdon), les tests comportementaux (O. Fossi Tanjoua, H. Perrein-Ettajani), et les tests comètes (F. Akcha) afin de travailler ensuite de manière autonome.

J'ai enfin été en charge de la gestion et du traitement statistique de l'ensemble des données. J'ai bénéficié d'une formation pour la rédaction d'articles scientifiques par mes directrices de thèse (C. Amiard-Triquet et C. Mouneyrac) m'ayant permis de publier mes résultats dans des journaux scientifiques internationaux. Enfin, la thèse m'a permis de développer mes compétences en communication scientifique en anglais grâce à la collaboration avec des scientifiques et étudiants venant d'autres pays (Chine, UK), mais également lors de congrès internationaux.

Gestion expérience	Caractérisation	Préparation des échantillons	Dosage de métaux			Histologie		Biomarqueurs				
Filtration eau, changement eau, culture d'algue, préparation nourriture, mise en place des systèmes expérimentaux	Distribution des tailles (DLS, TEM)	Dissection, pesée, stockage, transfert vers collaborateurs	Dosage DGT (M inéralisation, mesure AAS)	Dosage sédiments (isotope stable)	Bioaccumulation (M inéralisation, mesure AAS)	Dissection Inclusion	TEM	Test de comportement	Multiples Freshwater Biomonitor	MTLDH	Test des Comètes	Autres biomarqueurs
BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	BERHANU D. (NHM)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	POIRIER L. (MMS)	Dybowska A. (NHM) ICP-M S, ICP-OES	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	JOUBERT Y. (MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS)	GUIBOLINI M. (UNS)
PAN J.-F. (MMS) expérience Au NP	GILLILAND D. (JRC)		VERGNOUX A. (MMS)	BUFFET P.-E. (UCO, MMS) M inéralisation		PAN J.-F. (MMS)	PAN J.-F. (MMS)		PERREIN-ETTAJANI H. (MMS)			RISSO DE FAVERNEY C. (UNS)
	JOUBERT Y. (MMS)											
	PILET P. (CMA)											

Tableau de synthèse des valeurs de bioaccumulation et des biomarqueurs mesurées chez *Scrobicularia plana*.

Unités	ng g ⁻¹ ww	(slope)	algae (h ⁻¹) or CR (mL h ⁻¹)	μg g ⁻¹ ww	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	U SOD mg ⁻¹ protein	μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	nmol MDA mg ⁻¹ protein	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein
--------	-----------------------	---------	---	-----------------------	--	--	-----------------------------------	--	--------------------------------------	--	--

Annexe 3

Tableau de synthèse des valeurs de bioaccumulation et des biomarqueurs mesurées chez *Hediste diversicolor*.

Cuivre													
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	eau	Control	1006 (132)a	0,1433a	73 (27)	Nd	81,19 (27,54)a	552,03 (89,91)	75,45 (9,5)	53,27 (2,46)a	0,76 (0,20)	71,33 (14,23)	Nd
<i>H. diversicolor</i>	eau	Cu soluble	1431 (583)b	0,0734b	74 (21)	Nd	(31,84)ab	514,02 (96,43)	73,76 (28,00)	78,05 (9,35)b	0,77 (0,12)	70,26 (17,69)	Nd
<i>H. diversicolor</i>	eau	CuO NPs	1570 (302)b	0,132a	79 (18)	Nd	(11,81)b	569,50 (208,90)	72,45 (3,8)	96,51 (13,45)c	0,90 (0,014)	70,14 (8,61)	Nd
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	mésocosme	Control	2137 (740)a	m fb 55a	81 (11)a	Nd	72 (12)a	606 (323)a	61 (4)a	69 (4)a	0,82 (0,05)a	79 (10)a	1,17 (0,08)a
<i>H. diversicolor</i>	mésocosme	Cu soluble	2581 (649)a	m fb 38b	82 (14)a	Nd	86 (3)a	870 (848)a	64 (15)a	109 (16)b	0,70 (0,11)a	69 (10)a	1,24 (0,04)a
<i>H. diversicolor</i>	mésocosme	CuO NPs	4050 (1759)b	m fb 41b	79 (19)a	Nd	113 (5)b	687 (374)a	66 (8)a	124 (14)b	0,66 (0,06)b	74 (11)a	1,26 (0,07)b
Or													
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	eau	Control	0	0,7058a	86 (9)a	Nd	49 (5)a	286 (86)a	28 (3)a	33 (2)a	0,57 (0,08)a	24 (3)a	Nd
<i>H. diversicolor</i>	eau	nm	700 (370)a	0,247b	78 (13)b	Nd	51 (9)a	435 (78)b	27 (6)a	35 (3)a	0,33 (0,06)b	33 (3)b	Nd
<i>H. diversicolor</i>	eau	nm	2100 (1340)ab	0,3719b	77 (11)b	Nd	53 (8)a	404 (118)b	28 (4)a	38 (4)a	0,38 (0,03)b	20 (3)a	Nd
<i>H. diversicolor</i>	eau	nm	2890 (1570)b	0,3756b	85 (15)a	Nd	60 (3)a	418 (115)b	28 (5)a	48 (6)b	0,38 (0,08)b	32 (5)b	Nd
Argent													
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	eau	Control	51 (21)a	0,4606a	88 (14)a	Nd	11 (3)a	182 (55)a	819 (32)	776 (47)a	9,9 (0,9)ab	834 (84)	23 (3)a
<i>H. diversicolor</i>	eau	Ag soluble	387 (292)b	0,2595b	85 (48)a	Nd	14 (4)a	210 (51)a	853 (96)	1141 (123)b	11,8 (1)a	968 (72)	41 (3)b
<i>H. diversicolor</i>	eau	Ag NPs	279 (170)b	0,3029b	85 (14)a	Nd	15 (6)a	257 (65)b	976 (141)	1138 (74)b	7,4 (0,8)b	942 (108)	43 (3)b
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	n	Control	78 (39)a	0,6704a	79 (18)a	Nd	11 (4)a	176 (45)a	825 (37)	573 (39)	11,5 (1,7)	813 (172)	26 (2)a
<i>H. diversicolor</i>	n	Ag soluble	295 (233)b	0,238b	79 (24)a	Nd	16 (8)a	267 (85)b	505 (65)	733 (166)	11 (0,9)	511 (80)	72 (9)b
<i>H. diversicolor</i>	n	Ag NPs	227 (232)ab	0,2745b	83 (20)a	Nd	15 (4)a	276 (158)ab	786 (138)	619 (7)	8 (1,9)	1075 (249)	47 (8)a
Cadmium													
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	eau	Control	40 (20)a	0,214a	55 (26)a	Nd	65 (8)a	264 (54)a	60 (6)a	55 (4)a	0,50 (0,08)a	75 (27)a	1,24 (0,06)a
<i>H. diversicolor</i>	eau	Cd soluble	196 (71)b	0,203a	37 (29)a	Nd	88 (7)b	291 (77)a	38 (5)b	89 (6)b	0,49 (0,10)a	74 (29)a	2,10 (0,08)b
<i>H. diversicolor</i>	eau	Cd NPs	480 (248)b	0,325a	46 (29)a	Nd	127 (14)c	277 (82)a	55 (3)a	94 (1)b	0,50 (0,08)a	68 (20)a	2,27 (0,02)c
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	n	Control	62 (16)a	0,348a	72 (19)a	Nd	70 (24)a	243 (38)a	43 (5)a	59 (2)a	0,48 (0,06)a	92 (18)a	1,21 (0,04)a
<i>H. diversicolor</i>	n	Cd soluble	75 (42)a	0,469a	65 (15)a	Nd	80 (7)a	238 (118)a	45 (3)a	73 (3)b	0,50 (0,04)a	79 (18)a	1,62 (0,04)b
<i>H. diversicolor</i>	n	Cd NPs	71 (26)a	0,289a	64 (19)a	Nd	91 (15)b	196 (40)a	43 (12)a	97 (8)c	0,57 (0,11)a	114 (33)a	2,09 (0,09)c
Zinc													
Espèce	Exposition	Traitement	Bioaccumulation	Burrowing	Feeding	MT	GST	LDH	SOD	CAT	TBARS	ACHe	CSP
<i>H. diversicolor</i>	sédiment	Control	0	0,4385	88 (9)a	Nd	84 (20)a	683 (216)a	81 (13)a	61 (9)a	0,66 (0,15)a	66 (15)a	1,17 (0,21)a
<i>H. diversicolor</i>	sédiment	DEG	0	0,2892b	84 (11)a	Nd	119 (26)a	652 (289)a	59 (17)a	97 (26)a	0,59 (0,19)a	70 (15)a	1,08 (0,28)a
<i>H. diversicolor</i>	sédiment	ZnO NPs	3710 (150)	0,2196b	80 (7)a	Nd	158 (50)b	578 (272)a	67 (12)a	76 (11)a	0,43 (0,05)b	61 (27)a	0,67 (0,19)b
Unités													
			ng g ⁻¹ ww	(slope)	artemia (h ⁻¹)	μg g ⁻¹ ww	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	U SOD mg ⁻¹ protein	μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	nmol MDA mg ⁻¹ protein	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein

Résumé

L'avènement des nanotechnologies conduit à l'augmentation de la production de nanoparticules qui pourraient être libérées dans l'environnement. Les nanoparticules métalliques sont utilisées dans diverses applications commerciales (bactéricides, protection UV, imagerie médicale) et leur toxicité est une source de préoccupation. Le but de ce travail a été d'évaluer le devenir de nanoparticules métalliques (Ag, Au, CuO, Cd, ZnO) dans l'environnement marin ainsi que leurs effets sur deux invertébrés marins endobenthiques : le bivalve *Scrobicularia plana* et le ver *Hediste diversicolor* en utilisant un ensemble de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (comportement, réponses biochimiques et génotoxicité). Les effets ont été évalués après l'exposition à différentes sources environnementales (eau, nourriture, sédiments indépendamment ou en combinaison dans des mésocosmes). Dans un certain nombre de cas, ce travail révèle un effet toxique des nanoparticules qui n'est pas dû au métal constitutif mais directement aux propriétés nanoparticulaires. Les résultats montrent que les biomarqueurs sont des outils prometteurs pour évaluer l'écotoxicité des nanoparticules et pourrait être utilisés pour améliorer l'évaluation des risques.

Mots-clés: Nanoparticules métalliques, Ecotoxicité, Biomarqueurs, *Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*

The advent of nanotechnologies is leading to the increase production of nanoparticles which could be released in the environment. Metal nanoparticles are used in a variety of commercial applications (bactericides, UV protection, medical imaging) and their toxicity is a source of concern. The aim of this work was to evaluate the fate of metal-bearing nanoparticles (Ag, Au, CuO, Cd, ZnO) in the marine environment and their effects on two marine endobenthic species : the bivalve *Scrobicularia plana* and the worm *Hediste diversicolor* by using a set of biomarkers at different levels of biological organization (behaviour, biochemical responses and genotoxicity). Effects were evaluated after exposure to different environmental sources (water, food, sediment independently or combined in mesocosms). In a number of cases, our work revealed a toxic effect of nanoparticles which is not due to the constituent metal but directly to the nanoproperties. Results show that biomarkers are promising tools to evaluate the ecotoxicity of nanoparticles and could be used to improve risk assessment.

Keyword: Metallic Nanoparticles, Ecotoxicity, Biomarkers, *Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*