

Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosme

Agathe Bour

▶ **To cite this version:**

Agathe Bour. Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosme. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2015. Français. NNT : 2015INPT0007 . tel-04229935v2

HAL Id: tel-04229935

https://theses.hal.science/tel-04229935v2

Submitted on 5 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Mme AGATHE BOUR

le jeudi 8 janvier 2015

Titre :

EFFETS ECOTOXICOLOGIQUES DE NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE CERIUM EN MILIEU AQUATIQUE: D'UNE EVALUATION EN CONDITIONS MONOSPECIFIQUES A L'ETUDE DE CHAINES TROPHIQUES EXPERIMENTALES EN MICROCOSMES

Ecole doctorale :

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

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

M. LAURY GAUTHIER

M. ERIC PINELLI

Rapporteurs :

M. BERNARD CLEMENT, ENTPE LYON

M. JÉRÔME ROSE, CEREGE

Membre(s) du jury :

Mme LAURE GIAMBERINI, UNIVERSITE DE LORRAINE, Président

M. ERIC PINELLI, INP TOULOUSE, Membre

M. JEAN-PIERRE GAGNE, UNIVERSITE DU QUEBEC A RIMOUSKI, Membre

M. LAURY GAUTHIER, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse

Spécialité : Sciences de l'Environnement – Écotoxicologie

Soutenue publiquement le 08 janvier 2015 par

Agathe BOUR

Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosme.

Jury :

Rapporteurs :	Dr. Jérôme ROSE, CEREGE
	Dr. Bernard CLEMENT, LEHNA
Examinateurs :	Pr. Laure GIAMBERINI, Université de Lorraine
	Pr. Jean-Pierre GAGNE, Université du Québec à Rimouski
Directeurs de thèse :	Dr. Laury GAUTHIER, Université Paul Sabatier, Toulouse III
	Pr. Eric PINELLI, INPT-ENSAT
Membres invités :	Dr. Florence MOUCHET, CNRS (EcoLab, UMR 5245)
	Dr. Jean-Marc BONZOM, IRSN

Laboratoire EcoLab, UMR 5245

Ecole doctorale « Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace » (SDU2E)

Remerciements

Après trois années bien remplies et de nombreuses heures passées à rédiger, il est maintenant temps de mettre un point final à ce manuscrit de thèse. Pour cela, je tiens à remercier toutes les personnes impliquées de près ou de loin dans ces travaux, ainsi que toutes celles qui ont rempli ces années de moments si agréables.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Laury Gauthier et Eric Pinelli, grâce à qui ces années de thèse ont été très riches scientifiquement et humainement parlant. Nos longues discussions autour d'un café ou au détour d'un couloir ont été très enrichissantes pour moi. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous et de « débroussailler » ensemble cette thématique nano/méso. Vous vous êtes tous les deux montrés disponibles, plein de bons conseils et de bonnes idées, attentifs et drôles. Merci d'avoir été présents à chaque fois que j'en ai eu besoin, pour discuter du projet, des résultats, de la rédaction, et de tout le reste.

Mes remerciements chaleureux vont également à Florence Mouchet, qui s'est énormément investie dans cette thèse et a été présente sur tous les fronts. C'est avec toi que j'ai appris à gérer au quotidien tous les aspects du métier de chercheur (ou une grande partie du moins). C'est un bonheur de travailler avec quelqu'un d'aussi dynamique, réactif et efficace que toi ; d'aussi patient, attentif et attentionné. Tu as plus d'une fois débloqué des situations compliquées et fait avancer les choses pour qu'on puisse travailler dans les meilleures conditions, et tu as également toujours été présente, dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Eric, Laury, Florence, ça a été une vraie chance pour moi de faire mes débuts dans la recherche avec vous. J'ai particulièrement apprécié nos réunions interminables, où la bonne humeur était autant au rendez-vous que la science. Si j'ai parfois désespéré d'arriver à vous mettre d'accord, c'est finalement grâce à vos points de vue différents et complémentaires que ce projet a si bien avancé et que j'ai pu progresser comme je l'ai fait. Vous faites un trio de choc, aux qualités scientifiques et humaines certaines. Un grand merci donc pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien, votre gentillesse et votre bonne humeur, qui ont été essentiels pour moi tout au long de cette thèse. Merci pour cette belle aventure !

Je souhaite par la suite remercier les autres membres du jury : Jérôme Rose et Bernard Clément pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse ; Laure Giamberini, Présidente de ce jury, ainsi que Jean-Pierre Gagné, pour avoir évalué ces travaux. Je remercie également Jean-Marc Bonzom d'avoir accepté de participer à ce jury. Je tiens à remercier chacun de vous pour vos remarques pertinentes et constructives, et pour m'avoir permis de profiter de ces échanges intéressants jusqu'à la dernière minute.

Je souhaite également remercier chaleureusement trois autres personnes qui ont contribué de près au projet MESONNET, et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler. Tout d'abord, Jérôme Silvestre, notre MacGyver local. Vous avez réussi à résoudre tous les problèmes techniques qu'on a pu rencontrer (c'est dire !) et avec vous il y a toujours une solution à tout. Un grand merci Jérôme pour avoir été si disponible, et toujours avec beaucoup de patience, de gentillesse et de bonne humeur.

Un grand merci aussi à Laurent Verneuil, mon co-bureau, mon binôme, mon pote... on a commencé la thèse en même temps et fini en même temps, à 24h près... si c'est pas beau ça ! Trois ans dans le même bureau et on ne s'est pas entre-tués (on a même échappé à la mort par asphyxie !) ! Merci Lolo d'avoir été là pendant ces trois années (ça a notamment été plus facile de traverser toutes les galères de la fin de thèse ensemble), merci pour tous les coups de main pour le boulot et tous les moments moins studieux passés à papoter et boire des cafés.

Et enfin, un grand merci à Stéphanie Cadarsi qui m'a épaulée (et supportée !) du début à la fin de ma thèse, et qui a été aussi efficace qu'adorable. Merci pour ta bonne humeur et ta patience Steph. A l'occasion il faudra qu'on pense à aller planter les carottes, pour voir si elles poussent...

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Franck Gilbert, toujours prêt à prêter main forte pour les mésocosmes, et qui ne se déplace jamais sans sa bonne humeur, ses blagues et son appareil photo ! Merci d'avoir immortalisé ces moments mémorables ! J'ai aussi eu la chance de m'initier avec vous à l'étude de la bioturbation, même si hélas le temps nous a manqué pour exploiter ces manips jusqu'au bout.

Je remercie également vivement Jean-Marc Bonzom pour tous nos échanges, et dont les conseils avisés sur les mésocosmes ont été essentiels. Merci également de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour tout m'apprendre sur la dentition des chironomes !

Je souhaite aussi remercier Eric Chauvet pour son aide précieuse concernant l'étude de la décomposition de la litière et des hyphomycètes. Merci également à Sylvain Lamothe pour toutes les analyses effectuées sur ces échantillons.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et au GDRi iCEINT pour leur soutien financier. J'adresse également mes remerciements à Jean-Yves Bottero, directeur du GDRi iCEINT et coordinateur du projet ANR MESONNET, dans le cadre duquel a été effectuée cette thèse. Travailler dans le cadre d'un programme ANR et d'un GDRi m'a notamment permis de découvrir d'autres horizons et de rencontrer d'autres personnes, que je souhaite remercier ici.

Je remercie en premier lieu l'équipe du CEREGE, pour tous les échanges que nous avons eus et pour m'avoir accueillie durant trois semaines. Je remercie ainsi Jean-Yves Bottero et Mélanie Auffan pour leur accueil. Merci également à Marie Tella qui m'a encadrée lors des manips et qui a patiemment répondu à toutes mes questions. Je remercie aussi Perrine Chaurand pour les analyses effectuées en microtomographie. Merci pour ta persévérance malgré les coupures de courant régulières. Merci également à Jérôme Rose et Clément Levard pour les échanges que nous avons eus à cette occasion, et à d'autres moments durant ces trois dernières années. Je souhaite également adresser un grand merci à Sophie et sa coloc Camille pour m'avoir accueillie chez elles pendant cette période. Merci aussi aux copains, Lise & Nico, Julien, Julie, Etienne et Jade. Vous m'avez fait me sentir chez moi pendant tout ce temps, vous avez été super !

Partons maintenant un petit peu plus au nord... Je remercie ici l'équipe du LIEC : merci à Laure Giamberini et Christophe Pagnout pour nos échanges et vos conseils, ils m'ont aidée à faire avancer le projet et guidée dans ma réflexion. Merci aussi Christophe pour les analyses bactério. Merci également à Simon Devin pour son travail sur la « matrice toulousaine » et ses explications sur ces analyses complexes. Une pensée enfin pour Maël Garaud avec qui j'ai bien rigolé à Duke ; bon courage pour la fin de ta thèse.

Pour finir, partons beaucoup plus loin cette fois-ci : je tiens à remercier Mark Wiesner, de l'Université de Duke (USA) et directeur du CEINT, pour son accueil chaleureux lors de mes déplacements à Duke. Je souhaite également remercier Benjamin Espinasse de m'avoir accueillie chez lui lors de mon premier séjour à Duke, et de m'avoir guidée entre le campus, le site des mésocosmes et la ville. Merci également d'avoir installé tout le système de sondes et d'enregistrement des données lors de ton passage à Toulouse.

Revenons maintenant aux Toulousains. Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux, directement ou indirectement.

Tout d'abord, une mention spéciale pour Annick Corrège, à qui on peut faire confiance pour régler rapidement tous les problèmes divers et variés, et qui est toujours prête à rendre service

avec le sourire. Un grand merci pour ton soutien durant cette fin de thèse, merci de m'avoir écoutée, motivée, fait rigoler. J'admire ta capacité à faire avancer le travail malgré les litres de café qu'on t'a fait boire Laurent et moi, et malgré les heures passées à essayer de te distraire...

Je tiens à remercier David Baqué pour les analyses effectuées en ICP-OES/MS. Merci pour tes explications et tes coups de main lors des analyses et pour le « dépouillement » des données. Merci également à Marie-Josée Tavella et Virginie Suc pour leur disponibilité et leur gentillesse. Merci à Annie Perrault pour son support technique. Je souhaite remercier le Service Commun de Microscopie (TEMSCAN), et notamment Lucien Datas pour ses grandes compétences en MET. Je remercie également le Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB), et en particulier Isabelle Fourquaux pour la préparation des nombreuses coupes d'organes.

Mes remerciements vont également à Georges Merlina pour ses conseils avisés de chimiste tout au long de ma thèse, et à Maialen Barret pour avoir aussi éclairci certains points en microbiologie. Je remercie de manière générale toutes les personnes que je n'ai pas citées mais avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir durant ma thèse, pour leurs conseils, remarques, encouragements et bonne humeur.

Je tiens enfin à remercier les personnes qu'on voit rarement dans les labos mais sans qui tout ce travail ne serait pas possible. Je pense tout d'abord à Yannick Combarieu (pour avoir évité plus d'une fois les pétages de plombs, au sens propre comme au figuré), René Nouilhan (pour les « boîtes à moustiques ») et Jean-Marie Arpizou. Un grand merci également à Cécile Odorico pour avoir géré en temps record nos commandes, toutes plus urgentes les unes que les autres. J'ai enfin une pensée amicale pour Paule Tabarelli, pour la réception de montagnes de colis.

Je remercie également chaleureusement les doctorants, post-doctorants, stagiaires et les autres pour les moments passés ensemble : Allison pour son amitié, toutes nos soirées et les heuuuures passées à discuter (*Allez ma belle, t'es presque au bout, courage !*) ; Marion, avec qui j'ai adoré partager mon bureau ; Antoine, qui lui a succédé au bureau mais qui a dû partir trop vite en exil à l'étage (*pas grave, on a bien rigolé quand même !*) ; je pense aussi à Cyril G. et Cyril S., Léo, Thibaut, Adrien, Xiaoling, Antoine, Tiantian, Anthony, Manue, Simon, Lauris, Cécile, Max, Yehia, Christophe, Laure, Maialen, toute l'équipe des « Etoiles Brillent Pour Tous » (*merci notamment à Thierry et Pieter*). J'ai enfin une petite pensée pour Laura qui reprend tout juste le flambeau : bon courage pour tout ce qui t'attend et je te souhaite de te régaler autant que moi !

Un remerciement spécial à mes amies de longue date qui m'ont soutenue et ont été à mes côté en toute occasion. Un grand merci à Sophie, encore une fois pour m'avoir hébergée à chacun de mes passages à Aix et pour m'avoir vraiment fait me sentir chez moi quand j'étais loin des miens. Merci aussi pour avoir assuré à 200% dans les moments les plus durs. Maintenant c'est toi qui attaque la dernière ligne droite... plein de courage ma vieille ! Un autre grand merci à Julie, *alias* Tuctuc. C'est bon de pouvoir compter sur toi, pour tout, tout le temps ! Tes fou-rires aux narines frémissantes me manquent déjà ! Et un grand merci encore à Manue pour tous ces bons moments passés ensemble avant que tu ne t'exiles au fin fond du Lot... promis même là je viendrai t'embêter ! Et un dernier grand merci à Barbara, toujours partante pour profiter de la vie ! J'adore autant nos longues discussions sur toutes les choses de la vie que ton grain de folie en soirée, t'es géniale !

Pour conclure ces remerciements, je tiens évidemment à remercier du fond du cœur ma famille, qui a toujours été à mes côtés, m'a soutenue et m'a portée jusque-là. Je vous dois beaucoup. Finalement, je pense que ça va me manquer de ne plus entendre : « Alors, elles vont comment tes grenouilles ? » ! Merci pour tout !

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces travaux,
Aux miens

Table des matières

Liste des abréviations…..1

Liste des figures.....3

Liste des tableaux.....5

Introduction générale.....7

Chapitre I : Etude bibliographique.....13

1. Nanotechnologies et nanoparticules : présentation et contexte.....15
1.1 Nanotechnologies : une révolution technologique qui inquiète 15
1.1.1 Enjeux technologiques et économiques 15
1.1.2 Questions éthiques.....16
1.2 Les nanoparticules : de quoi parle-t-on ? 19
1.2.1 Présentation 19
1.2.2 Propriétés et utilisations des nanoparticules.....20
1.2.3 Exposition aux nanoparticules 24
1.3 Risques potentiels des nanoparticules : lacunes scientifiques et législatives.....25
1.3.1 Une connaissance partielle des risques liés aux nanoparticules 25
1.3.2 Cadre législatif actuel et actions mises en œuvre.....27

2. Cas des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2).....29
2.1 Présentation générale.....29
2.1.1 Propriétés chimiques du CeO_2 29
2.1.2 Applications des nanoparticules de CeO_2 29
2.2 Ecotoxicité des nanoparticules de CeO_2 30

3. Vers une prise en compte de la complexité des milieux naturels 38
3.1 Difficultés liées à l'étude des nanoparticules en écotoxicologie 38
3.2 Evaluation de l'écotoxicité des nanoparticules suivant des approches pertinentes en termes de représentativité environnementale 39

Références bibliographiques.....73

Chapitre II : Présentation des modèles biologiques.....81

1. Les diatomées *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa*.....83

2. Le diptère *Chironomus riparius*.....86

3. L'amphibien *Pleurodeles waltl.*.....89

4. L'amphibien *Xenopus laevis*.....92

Références bibliographiques.....94

Chapitre III : Ecotoxicité des NP de CeO_2 - Etudes monospécifiques.....99

1. Matériels et méthodes.....101
1.1 Caractérisation des NP.....101
1.2 Détermination de la toxicité chez *C. riparius* 102
1.2.1 Inhibition de croissance et retard de développement.....102
1.2.2 Tératogénicité 103
1.3 Exposition des larves d'amphibiens.....105
1.4 Détermination de la toxicité chez *X. laevis* et *P. waltl.* 106
1.4.1 Toxicité chronique : inhibition de croissance.....106
1.4.2 Génotoxicité 107
1.4.2.1 Principe du test "miconoyaux".....107
1.4.2.2 Détermination de la génotoxicité.....108

2. Toxicité de NP de CeO_2 à différents niveaux trophiques ; effets chez diatomées, chironomes et amphibiens.....110

Références bibliographiques.....129

Chapitre IV: Ecotoxicité des NP de CeO_2 - Etudes en microcosmes.....131

1. Mise en place d'une chaîne trophique fonctionnelle 133
1.1 Développement d'une chaîne trophique expérimentale herbivore 134
1.2 Etablissement d'un équilibre entre les différentes espèces 137

Références bibliographiques.....140

2. Evaluation intégrative de l'écotoxicicité de NP de CeO_2 à l'échelle d'une chaîne trophique expérimentale.....141

3. Ecotoxicité de NP de CeO_2 à l'échelle d'une chaîne trophique expérimentale : vers une compréhension des mécanismes impliqués 161

4. Impacts de NP de CeO_2 sur le fonctionnement d'un écosystème aquatique : étude de la décomposition de la litière par les micro- et macro-organismes associés.....193

Discussion générale.....213

1. Bilan – apport des études en microcosme.....215
1.1 Bilan.....215
1.2 A nanoparticules différentes, effets différents 218
1.3 A méthodes d'exposition différentes, effets différents.....219
1.4 Apports de l'utilisation des microcosmes 223

2. Limites des méthodes d'exposition mises en œuvre 225
2.1 Expositions en microcosme 225
2.2 Application des tests normalisés à l'évaluation des nanoparticules 228

3. Verrous technologiques et conceptuels 231
3.1 Verrous technologiques liés à l'étude des nanoparticules 231
3.1.1 Maîtrise de l'exposition 231

3.1.2 Caractérisation de l'exposition 232
3.1.3 Incertitudes sur l'origine des effets observés 235
3.2 Verrous conceptuels pour l'évaluation du risque des nanoparticules 235

Références bibliographiques 237

Conclusions et Perspectives 243

Annexes 249

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAT : Catalase

CE : Concentration Efficace

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CEINT : Center for the Environmental Implications of NanoTechnology

CEREGE : Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences et de l'Environnement

ChE : CholinEsterase

CIRIMAT : Centre Inter universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux

CL : Concentration Létale

CMEAB : Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie

CMC : CarboxyMéthyl Cellulose

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DCE : Double Couche Electronique

DLS : Dynamic Light Scattering (diffraction dynamique de la lumière)

DLVO (théorie de) : Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeck

DOI : Digital Object Identifier (identifiant numérique)

ECHA : European Chemicals Agency (agence européenne des produits chimiques)

EDR : Eau Déionisée Reconstituée

ENSAT : Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse

FDA : Food and Drug Administration (agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

GA : Gomme Arabique

GDRi : Groupement De Recherche international

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

iCEINT : international Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnologies

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (spectrométrie de masse quadripolaire par plasma à couplage inductif)

IMBE : Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale

ISO : International Organization for Standardization (organisation internationale de normalisation)

LCMCP : Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

LEMiRE : Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et d'Environnements extrêmes

LIEC : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

LIONS : Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire

MET : Microscope/Microscopie Electronique à Transmission

MIT : Massachusetts Institute of Technology

NP : Nanoparticule(s)

NTC : Nanotube de Carbone

OCDE / OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economiques / Organisation for Economic Co-operation and Development

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PCC : Produits de Consommation Courante

PVP : PolyVinyl Pyrrolidone

REACH (règlement) : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques)

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)

SOD : SuperOxyde Dismutase

UMR : Unité Mixte de Recherche

US EPA : United States Environmental Protection Agency (agence américaine de protection de l'environnement)

UV : Ultra-Violet

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de l'augmentation de surface d'une particule en relation avec la diminution de son volume.....21

Figure 2 : NP et Produits de de Consommation Courante (PCC).....23

Figure 3 : Biofilm de diatomées.....85

Figure 4 : Cycle de vie de *Chironomus riparius*.....86

Figure 5 : Couple de *Pleurodeles waltl.* adultes.....90

Figure 6 : Larve de *Pleurodeles waltl.* au stade 53 de développement 91

Figure 7 : Couple de *Xenopus laevis* adultes.....92

Figure 8 : Larve de *Xenopus laevis* au stade 50 de développement.....94

Figure 9 : Mesure de la largeur de la capsule céphalique d'une larve de chironome.....103

Figure 10 : Exemples de malformations du mentum chez les larves de *C. riparius*.....104

Figure 11 : Schéma illustrant le principe de formation des micronoyaux ; érythrocytes micronucléés de pleurodèles.....107

Figure 12 : Systèmes d'exposition des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.....135

Figure 13 : Croissance des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.....136

Figure 14 : Emergence cumulée des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.....136

Figure 15 : Comportement des larves de pleurodèle et validation de la chaîne trophique carnivore en microcosme.....137

Figure 16 : Développement du biofilm et validation de la chaîne trophique herbivore en microcosme.....139

Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution temporelle des différentes phases du cycle de l'azote.....139

Figure 18 : Observation en MET de coupes ultrafines de branchies de larves de pleurodèle exposées en microcosme.....190

Figure 19 : Observation en MET de coupes ultrafines d'intestins de larves de pleurodèle exposées en microcosme.....191

Figure 20 : Illustration des différentes hypothèses proposées pour expliquer les effets des NP de CeO_2 chez les pleurodèles.....222

Figure 21 : Schéma représentant le lien inversement proportionnel entre la maîtrise et la complexité d'un système biologique.....227

Figure 22 : Concentrations en Ce mesurées au cours du temps dans les milieux contaminés à différentes concentrations initiales de NP.....230

Liste des tableaux

Tableau 1 : Grandes classes de propriétés des NP, domaines et exemples d'applications.....21

Tableau 2 : Volumes de production / utilisation de nanomatériaux dans le monde et en Europe.....22

Tableau 3 : Ecotoxicité des NP de CeO_2 – état de l'art.....34

Tableau 4 : Formules de calcul des rangs de la médiane (M), du quartile inférieur (QI) et du quartile supérieur (QS).....109

Tableau 5 : Bilan des effets observés chez les différentes espèces exposées aux NP de CeO_2 suivant différentes méthodes.....217

Introduction générale

La fin du XX^{ème} siècle a été témoin de l'apparition dans l'industrie de matériaux d'un genre nouveau : les nanoparticules. Le caractère novateur de ces matériaux réside moins dans leur nature chimique que dans leur taille, de l'ordre du nanomètre. En effet, celle-ci confère à ces particules des propriétés chimiques et physiques que ne possèdent pas les matériaux de dimensions supérieures, et qui laissent entrevoir des possibilités d'avancées technologiques révolutionnaires. Si les premières synthèses et utilisations des nanoparticules datent des années 1990, ce n'est que dans les années 2010 qu'a eu lieu une véritable explosion du développement des nanotechnologies. Les nanoparticules sont ainsi employées dans de nombreux domaines, tels que la médecine, l'informatique, le bâtiment, l'énergie ou encore les transports, et sont notamment présentes dans plus de 1800 produits de consommation courante.

Cette accélération fulgurante de la production et de l'utilisation des nanoparticules est cependant source de craintes, du fait de l'absence de recul concernant les conséquences en santé humaine et environnementale. Mais l'évaluation de la toxicité des nanoparticules n'est pas aisée, notamment sur l'environnement : ces nouveaux matériaux ont un comportement différent des polluants « classiques » tels que les métaux lourds ou les contaminants organiques. En effet, les nanoparticules ne forment pas des solutions homogènes en milieu aqueux, elles peuvent s'agréger ou encore subir de nombreuses modifications suivant l'environnement dans lequel elles se trouvent. De plus, les premières études ont montré que les nanoparticules, pouvant être de nature chimique différente et posséder des caractéristiques très variables, ne peuvent pas être considérées comme un même groupe répondant de manière identique lors d'essais d'écotoxicité. Leur très grande diversité nécessiterait des études au cas par cas, scénario peu réaliste, ou une compréhension approfondie des paramètres impliqués dans leur toxicité. Néanmoins, les études écotoxicologiques portant sur les nanoparticules sont très peu nombreuses en comparaison de la quantité de données nécessaires, et l'évaluation de l'écotoxicité de ces matériaux en est encore à ses débuts. En outre, les premiers travaux ont mis en évidence que le comportement et la toxicité d'un même type de nanoparticules peuvent varier d'un milieu à l'autre et sont hautement dépendants des paramètres physico-chimiques du système. La présence d'organismes (végétaux, macro-invertébrés, poissons, micro-organismes, *etc.*) peut également modifier les nanoparticules. Il apparaît donc que les essais réalisés en conditions standardisées en laboratoire ne sont pas suffisants pour expliquer les phénomènes se produisant en milieux naturels, infiniment plus complexes. Si ces essais sont indispensables comme première étape dans l'évaluation de la

toxicité des nanoparticules, il devient néanmoins absolument nécessaire de mener également des études en systèmes complexes, plus proches des conditions environnementales.

C'est dans ce contexte scientifique qu'a été mis en place le projet P2N MESONNET, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-NANO-006-04). Ce projet interdisciplinaire vise à mieux comprendre les principes généraux qui gouvernent le comportement dans l'environnement des nanoparticules manufacturées, afin d'apporter des éléments permettant une meilleure évaluation du risque environnemental lié à ces matériaux. Porté par le CEREGE (UMR CNRS 7330, Aix-en-Provence), il regroupe plusieurs laboratoires français dont le LIEC (UMR CNRS 7360, Metz), EcoLab (UMR CNRS 5245, Toulouse), le CIRIMAT (UMR CNRS 5085, Toulouse), l'IMBE (UMR CNRS 7263, Marseille), l'institut NEEL (UPR 2940, Grenoble), le LCMCP (UMR 7574, Paris), le LCSN (CEA, Grenoble), le LEMiRE (UMR CEA/CNRS 6191, Aix-Marseille) et le LIONS Saclay (CEA, Saclay). Ce programme est également associé au Groupement De Recherche international (GDRi) iCEINT (International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology), créé en partenariat avec le centre de recherche américain CEINT (Center for the Environmental Implications of Nanotechnology) qui regroupe plusieurs universités américaines. La contribution du laboratoire EcoLab dans ce projet vise à déterminer la toxicité de nanoparticules en milieu aquatique, grâce à une évaluation chez plusieurs espèces étudiées individuellement d'une part (essais monospécifiques), et regroupées au sein de microcosmes d'autre part.

Notre étude, réalisée dans le cadre du projet MESONNET, a pour but de déterminer l'impact de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2) en milieu aquatique sur une chaîne trophique expérimentale. Elle s'articule notamment autour de deux questions principales :

- Les bio-essais monospécifiques standardisés permettent-ils de déterminer le risque environnemental lié aux nanoparticules de CeO_2, notamment à de faibles concentrations ?

- L'utilisation de microcosmes, dans lesquels les organismes sont en interactions complexes (relations de prédation et/ou de compétition) et qui permettent d'étudier différents traits fonctionnels, permet-elle une évaluation plus pertinente des effets écotoxicologiques de ces nanoparticules ?

Les microcosmes utilisés comprennent un compartiment primaire composé de micro-organismes (bactéries, diatomées, hyphomycètes) associés à une litière de feuilles d'aulne, de la larve du diptère *Chironomus riparius* en tant que consommateur primaire et de la larve de l'amphibien *Pleurodeles waltii* Michahelles, 1830 (*P. waltl.*), consommateur secondaire et maillon supérieur de la chaîne trophique étudiée.

Après une revue bibliographique permettant d'établir le contexte scientifique, économique et social de cette étude, nous présenterons en deuxième partie de ce manuscrit les modèles biologiques étudiés. La troisième partie sera consacrée à l'évaluation écotoxicologique des nanoparticules de CeO_2 chez les espèces isolées, en conditions d'expositions normalisées (essais monospécifiques). L'évaluation à une échelle de complexité supérieure, sur l'ensemble des espèces regroupées en microcosme, sera présentée en quatrième partie de ce manuscrit. Enfin, la toxicité des nanoparticules de CeO_2 sera discutée à la lumière de l'ensemble des résultats obtenus et de la littérature actuellement disponible. Nous présenterons également les perspectives que cette étude offre, ainsi que les verrous actuellement présents concernant l'évaluation écotoxicologique des nanoparticules.

Chapitre I

Etude bibliographique

1. Nanotechnologies et nanoparticules : présentation et contexte

La miniaturisation des technologies est depuis longtemps une des priorités des sociétés industrialisées, mais le domaine ne va prendre une nouvelle dimension qu'en 1959, lors du discours de Richard P. Feynman à l'American Physical Society (Feynman, 1959). Feynman, futur prix Nobel de physique (1965), ouvre en effet de nouveaux horizons en proposant la manipulation de la matière à l'échelle de l'atome. Ce qui n'est encore que perspectives se concrétisera des années plus tard, avec les premières utilisations de nanomatériaux dans l'industrie dans les années 1990. Ces utilisations sont alors encore assez limitées ; il faudra attendre le début des années 2010 pour qu'une véritable explosion du développement des nanotechnologies ait lieu, faisant ainsi écho aux prédictions de Feynman.

1.1 Nanotechnologies : une révolution technologique qui inquiète

1.1.1 Enjeux technologiques et économiques

La découverte des nombreuses propriétés des nanomatériaux et les premières utilisations qui en découlent ont laissé entrevoir des possibilités extraordinaires en termes d'avancées technologiques. Elles concernent notamment le domaine médical (Boxall *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011; Rao et Cheetham, 2001; Shao *et al.*, 2011; The Royal Society, 2004), avec notamment des systèmes d'administration ciblée de médicaments, l'amélioration des appareils et des méthodes de diagnostic et d'imagerie, ou le développement de matériel médical aux propriétés antibactériennes. De nouvelles pistes de recherches sont ouvertes pour la lutte contre le cancer, la fabrication de prothèses, la pose d'implants cochléaires ou rétiniens, ou encore la régulation du diabète. Les nanomatériaux pourraient également permettre le développement de matériaux ultra résistants, une augmentation des capacités de stockage d'énergie et d'information, et des avancées dans le domaine des transports, permettant de diminuer la consommation de carburant et l'émission de gaz à effet de serre. Des applications sont également envisagées dans le domaine de l'environnement, pour la remédiation des sols et des eaux souterraines contaminés. Enfin, de nouvelles technologies sont envisagées à plus ou moins court terme dans le domaine militaire, comme l'absorption de l'énergie d'une onde par de nouveaux matériaux, la détection d'agents chimiques ou biologiques par des combinaisons également capables d'en protéger l'utilisateur, ou encore une amélioration des armes de combat et des méthodes de communication. Il a été énoncé lors d'un symposium international (OECD et INN, 2013) que de 2001 à 2011 les travaux sur les nanotechnologies

étaient principalement axés sur la recherche fondamentale et que ces travaux s'étaient orientés vers des applications concrètes depuis 2011. On observe en effet une multiplication énorme de la demande de brevets ayant trait aux nanotechnologies ces dernières années, passant de 224 en 1991 à 12 776 en 2008. Ainsi, et pour ne citer que des applications médicales, plus de 70 « nano-médicaments » sont actuellement en phase d'essai clinique, 44 systèmes d'administration de médicaments, 18 produits pharmaceutiques et 15 biomatériaux liés à l'imagerie médicale ou au diagnostic sont actuellement sur le marché (OECD et INN, 2013).

Ces multiples applications, concrètes ou potentielles, sont la cause et la conséquence d'investissements économiques importants dans les pays industrialisés, tant de la part des gouvernements que des industries. Le budget annuel des agences fédérales américaines pour la science et l'ingénierie à l'échelle nanométrique est passé de 270 millions de dollars en 2000 à 1,8 milliard actuellement (~ 1,3 milliard d'euros). La Commission Européenne investit actuellement 600 millions d'euros par an dans les nanotechnologies, dont 20% sont alloués à la recherche fondamentale, 15% à la formation / éducation et 65% aux technologies appliquées. L'investissement en Inde est actuellement de 250 millions de dollars, et atteignait 90 milliards de yens au Japon en 2008 (~184 et 650 millions d'euros respectivement) (OECD et INN, 2013). Les financements gouvernementaux au niveau mondial pour la recherche et le développement sont estimés à plus de 7 milliards de dollars en 2008, soit plus de 5 milliards d'euros (Roco, 2011). L'impact de ces investissements sur l'économie mondiale est important, avec par exemple un marché mondial estimé d'environ 630 milliards de dollars en 2016 pour la nanomédecine, soit un peu moins de 20% du marché pharmaceutique global, et un marché mondial de 1100 milliards de dollars en 2009 pour l'industrie électronique dans son ensemble, domaine phare des nanotechnologies (OECD et INN, 2013). Enfin, le marché mondial lié aux nanotechnologies est estimé à mille milliards de dollars en 2015, et extrapolé à trois mille milliards en 2020 (Roco, 2011).

1.1.2 Questions éthiques

Si les nanotechnologies ouvrent la voie vers de grandes avancées technologiques, elles sont également porteuses de craintes et soulèvent des problèmes éthiques variés. Dans un rapport datant de 2004, la Royal Society (The Royal Society, 2004) énonce certaines craintes liées aux nanotechnologies, déjà présentes ou susceptibles d'apparaître. Elle cite notamment la crainte du développement de machines autonomes capables de se construire atome par atome, qui deviendraient hors de contrôle et épuiseraient les ressources planétaires. Un risque de

perte de la vie privée est également évoqué par Ray Kurzweil (2014), directeur de l'ingénierie chez Google, membre du comité de conseil de l'armée américaine dans les domaines scientifique et technologique et membre du conseil d'administration du MIT. Kurzweil imagine ainsi des millions de nanorobots présents dans le corps humain, destinés à nous maintenir en bonne santé mais également à rendre le contenu de notre cerveau public, sur le « cloud[1] ». Si ces scénarios sont encore de l'ordre de la science-fiction, il est évident que le développement croissant des nanotechnologies soulève certains problèmes éthiques plus réalistes (The Royal Society, 2004). Dans le domaine des communications et de l'information, les nanotechnologies pourraient effectivement être à l'origine d'une perte de vie privée, bien que dans une moindre mesure que celle envisagée dans le scénario décrit par Kurzweil. Elles faciliteraient ainsi la surveillance des ordinateurs, réseaux sociaux, du niveau de santé et des habitudes de consommation.

Les progrès dans le domaine médical, ayant pour but initial de restaurer des fonctions endommagées (vue, ouïe, *etc*…), soulèvent également la question des limites de l'amélioration des capacités humaines : si l'augmentation de certaines capacités est rendue possible, jusqu'à quel point est-elle souhaitable ? N'existe-t-il pas un risque de dérive vers des formes d'eugénisme ? Ces avancées technologiques soulèvent également cette autre question de société qu'est l'accès au progrès. Il est fort probable que ces nouvelles techniques de soin, très coûteuses en termes de développement et d'utilisation, ne puissent être accessibles qu'à un nombre limité d'individus du fait même de leur coût, et risquent de ce fait d'augmenter un peu plus les fractures sociales déjà existantes.

Des questions se posent également pour d'autres domaines : les applications militaires des nanotechnologies pourraient déboucher sur l'apparition d'un nouveau type d'armes de combat et une nouvelle forme de course à l'armement.

Enfin, les craintes soulevées par les nanotechnologies sont également liées aux risques sanitaires et environnementaux. De même que pour l'énergie nucléaire, les risques de dissémination chronique, les risques liés au traitement des déchets, et surtout les risques d'accidents industriels font craindre de potentielles catastrophes environnementales, pouvant également avoir de graves conséquences pour la santé humaine. En outre, le caractère récent des nanotechnologies ne permet pas d'avoir le recul nécessaire sur des impacts sanitaires à long terme. Ainsi, les conséquences sanitaires de l'exposition croissante des consommateurs aux nanoparticules ou de l'utilisation des biomatériaux dans le domaine médical sont encore inconnues à l'échelle d'une vie humaine. Ces craintes concernant les risques

[1] Le « cloud » (ou « nuage » en Français) est un espace de stockage informatique dématérialisé.

environnementaux et sanitaires, principalement basées sur une méconnaissance des impacts à long terme, ne sont pas sans rappeler les craintes liées aux organismes génétiquement modifiés (OGM), pour lesquels des moratoires sont demandés par de nombreuses associations afin de limiter leur utilisation tant que l'innocuité n'en sera pas démontrée. Ces craintes liées aux nanotechnologies ou aux OGM ne sont pas sans fondement, des cas de crises sanitaires ayant déjà eu lieu par méconnaissance de la toxicité de certains produits. Ainsi, l'importante toxicité de l'amiante n'a été révélée qu'après des années d'utilisation massive de ce produit, entrainant de très nombreux cas de cancer chez les ouvriers en contact direct avec l'amiante. Il est donc nécessaire de ne pas reproduire les erreurs du passé avec les nouveaux produits liés aux nanotechnologies.

Il apparaît donc que quel que soit le domaine pour lequel les nanotechnologies soulèvent des questions éthiques – libertés individuelles, médecine, armée, environnement ou santé humaine – il est essentiel de trouver un équilibre entre les bénéfices que peuvent apporter les nanotechnologies et les risques potentiels qu'elles entraînent. Notons cependant que la plupart des problèmes éthiques décrits ici ne sont pas propres aux nanotechnologies et sont régulièrement évoqués avec l'apparition de nouvelles technologies.

Il y a actuellement une prise de conscience croissante par le grand public de la présence des nanotechnologies dans notre quotidien, ainsi que des risques et problèmes éthiques qu'elles peuvent entraîner. Cette prise de conscience est en partie due aux médias, plus ou moins alarmistes (« Les nanos sont-elles toxiques ? », France Culture, 2014 ; « Nanotechnologies : Attention danger ! », France Soir, 2010 ; « Les nanomatériaux : ennemis invisibles et omniprésents », Le Monde, 2014 ; « La toxicité des nanomatériaux confirmée par une étude américaine », Le Monde, 2013 ; « Nanotoxiques – une enquête », Lenglet, 2014), et aux moyens mis en œuvre par les instances gouvernementales pour informer le public. Des conférences (ADIT et Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International, 2014) et débats publics (Commission particulière du débat public sur les nanotechnologies, 2010) ont ainsi été organisés ces dernières années, et des sites internet d'information ou d'expression (NanoWiki, 2007; NanOpinion, 2014) ont été développés. Si ces actions sont accusées par les détracteurs des nanotechnologies de n'être que des opérations de communication servant à endormir les consciences (Commission particulière du débat public nanotechnologies, 2010), elles révèlent cependant l'intérêt du grand public pour le sujet ; des actions de groupes « citoyens » et de consommateurs se développent, telles que l'organisation d'une conférence publique sur les nanoparticules en juin 2014 (Programme Boréal, 2014), et la mise en place d'un site internet d'information sur les nanotechnologies (WikiNanos, 2009),

édité par l'Association de Veille et d'Information Civique sur les Enjeux des Nanosciences et Nanotechnologies. En conclusion, même si la question des nanotechnologies n'a pas encore l'ampleur des questions liées aux OGM ou au nucléaire, elle ne laisse pas indifférent ; l'opinion publique est partagée entre espoirs et craintes, acceptation ou refus catégorique, comme le montrent les réactions des internautes (Kurzweil, 2014) et les débats houleux qui ont eu lieu en 2009-2010 en France (Commission particulière du débat public nanotechnologies, 2010).

1.2 Les nanoparticules : de quoi parle-t-on ?

1.2.1 Présentation

Comme son nom l'indique, le monde des « nanos » se situe à l'échelle du nanomètre, soit du milliardième de mètre. Pour définir un nano-objet, la norme ISO/TS 80004 (2011) fixe l'échelle nanométrique de 1 à 100 nm. Il existe plusieurs types de nano-objets : des nano-plaques, définies comme ayant une dimension à l'échelle nanométrique, des nano-fibres ou nanotubes qui ont deux dimensions à l'échelle nanométrique, et enfin les nanoparticules, dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique. Une nanoparticule est donc une particule de taille inférieure à 100 nm. Pour comparaison, l'épaisseur d'un cheveu est de l'ordre de 80 000 nm et le diamètre d'un globule rouge humain mesure environ 7000 nm (The Royal Society, 2004).

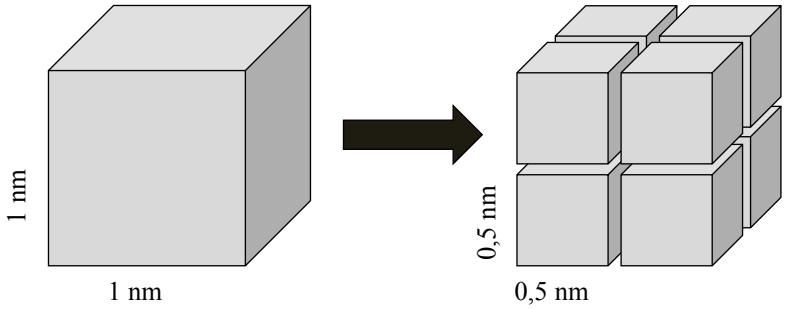
Notons que les nanoparticules (NP) ne sont pas uniquement d'origine anthropique et sont présentes dans l'environnement depuis toujours. En effet, elles peuvent être naturellement produites par les organismes vivants (ex : pollen) ou lors des feux de forêt, des éruptions volcaniques ou autres événements climatiques majeurs (Navarro *et al.*, 2008). Si la vie a évolué en présence de ces NP naturelles, l'exposition à de nouveaux types de NP ou à des concentrations plus importantes pourrait cependant avoir des impacts délétères sur le vivant (Wiesner *et al.*, 2009). Nous allons donc nous intéresser exclusivement aux NP d'origine anthropique, dites manufacturées, et l'ensemble des nanomatériaux cités dans ce manuscrit fera uniquement référence aux matériaux manufacturés. Ceux-ci sont de natures diverses. Il existe d'une part les nanomatériaux carbonés, tels que les nanotubes de carbone (NTC), les fullerènes (C_{60}), et les feuillets de carbone ou graphène. Les deux autres grandes classes sont les NP métalliques, telles que les NP d'argent, d'or ou de cobalt et les oxydes métalliques, comme les dioxydes de cérium (CeO_2) et de titane (TiO_2), ou les oxydes de cuivre (CuO) et de zinc (ZnO).

Il est donc évident que les divers nanomatériaux connus sont de natures chimiques très différentes, et font pourtant partie de la classe des « nano ». Cette définition par la taille et non par la nature n'est pas classique, et s'explique par les propriétés particulières que confère la dimension nanométrique.

1.2.2 Propriétés et utilisations des nanoparticules

Les propriétés spécifiques des NP sont liées à leur très grande réactivité, due à l'augmentation de leur surface, dite surface spécifique, au niveau de laquelle vont se produire les réactions chimiques. Pour illustrer ce rapport de surface, considérons une microparticule de 1 µm de côté, et une nanoparticule de 1 nm de côté. La microparticule a un volume de 1 μm^3 (soit 10^9 nm^3) et une aire de surface de 6 μm^2 (soit 6.10^6 nm^2) et la nanoparticule un volume de 1 nm^3 et une surface de 6 nm^2. Le passage de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique entraîne donc une diminution de volume d'un facteur 10^9 mais une diminution de surface uniquement d'un facteur 10^6. En d'autres termes, à volume égal, la nanoparticule a une surface spécifique 1000 fois supérieure à la microparticule. Ce principe d'augmentation de la surface lors de la diminution du volume est illustré en figure 1. De manière générale, les effets d'un élément chimique sur le vivant sont dépendants de sa nature et de la dose considérée, quelle que soit la taille des particules utilisées. Cependant, du fait de la surface spécifique décuplée, lorsque la taille de ces particules passe au-dessous d'un certain seuil (l'échelle nanométrique) les propriétés de ces particules se trouvent moins dirigées par la nature chimique de l'élément que par sa taille (Bottero *et al.*, 2011; The Royal Society, 2004). On peut ainsi citer l'exemple de l'or, qui est connu pour être un métal inerte, mais qui devient un réducteur puissant sous forme nanoparticulaire. De même, le dioxyde de titane (TiO_2) en solution est de couleur blanche, mais est transparent sous forme nanoparticulaire. Les NP de TiO_2 ayant également des propriétés de protection contre les UV, elles sont incorporées dans les crèmes solaires pour les rendre transparentes.

La taille des NP n'est cependant pas l'unique paramètre qui contrôle leur comportement, et leur grande diversité entraîne des propriétés très variées. Les NP sont par conséquent utilisées dans de nombreux domaines d'application (Huang *et al.*, 2011; Rao et Cheetham, 2001; Shao *et al.*, 2011; The Project on Emerging Nanotechnologies, 2014; The Royal Society, 2004; Verrecchia *et al.*, 1995). Le tableau 1 recense les grands domaines d'application en fonction des propriétés des NP et présente quelques exemples de produits et applications.



Volume de la particule de gauche = $1^3 = 1\ nm^3$
Volume total de la particule de droite = $8 \times 0,5^3 = 1\ nm^3$
Aire de la particule de gauche = $6 \times 1^2 = 6\ nm^2$
Aire totale de la particule de droite = $8 \times (6 \times 0,5^2) = 12\ nm^2$

Figure 1 : Illustration de l'augmentation de surface d'une particule en relation avec de la diminution de son volume.
Pour un même volume, la particule de droite a une aire deux fois supérieure du fait de ses sous-unités de plus petite taille.

Tableau 1 : Grandes classes de propriétés des NP, domaines et exemples d'applications.

Propriétés (exemples de NP concernées)	**Applications/ domaines d'application**	**Exemples**
Electriques, magnétiques, optiques (NTC, Au)	Electronique, stockage de l'information	Matériel informatique, multimédia
Optiques et photo-thermiques	Imagerie médicale	Agents contrastants, tomographie
	Diagnostic médical	
Catalyse (CeO_2, TiO_2)	Secteur automobile	Additifs pour diesel, lubrifiants
	Stockage de l'énergie	Batteries / piles
	Produits autonettoyants	Revêtements pour façades, textiles, verres optiques
	Protection anti-UV	Crèmes solaires, textiles, revêtements extérieurs
Antibactériens (Ag, ZnO)	Secteur alimentaire	Transformation, conservation
	Médecine	Ustensiles, outils chirurgicaux
	Textiles	Pansements, vêtements « anti-odeurs »
	Cosmétiques	Crèmes de soin, traitement de l'acné
Grande résistance / souplesse / biocompatibilité (TiO_2, NTC)	Médecine	Implants orthopédiques, cardiaques
	Matériaux de construction	Ciments
	Matériel de sport	Raquettes, vélos, planches, skis
Possibilité d'encapsuler d'autres substances (Au, NP organiques)	Médecine	Traitements ciblés, anticancéreux
	Pesticides	Relargage progressif et ciblé
Interaction avec d'autres substances (NTC)	Remédiation environnementale	Purification des sols contaminés et des eaux souterraines

Le tableau précédent ne liste pas de manière exhaustive les applications et produits contenant des nanomatériaux, notamment en ce qui concerne les produits de consommation courante. Le projet sur les nanotechnologies émergentes (PEN, The Project on Emerging Nanotechnologies, 2014) recense ces différents produits et analyse entre autres leur provenance, les secteurs concernés et l'augmentation du marché des nanotechnologies. La figure 2 présente quelques données concernant les produits de consommation courante (PCC), disponibles sur le site internet du PEN (http://www.nanotechproject.org/).

Des estimations de volumes de production et d'utilisation de certains nanomatériaux aux niveaux mondial et européen ont été publiées récemment (Piccinno *et al.*, 2012). Cette étude datant de 2012 est basée sur une enquête menée auprès des entreprises produisant et utilisant des nanomatériaux. Le tableau 2 en présente les principaux résultats.

Tableau 2 : Volumes de production / utilisation de nanomatériaux dans le monde et en Europe (d'après Piccinno *et al.*, 2012).

Type de nanomatériau	**Echelle mondiale (tonnes/an)** **Médiane et quartiles (25 – 75)**	**Echelle européenne (tonnes/an)** **Médiane et quartiles (25 – 75)**
TiO_2	3000 (550 – 5500)	550 (55 – 3000)
ZnO	550 (55 – 550)	55 (5,5 – 28 000)
SiO_2	5500 (55 – 55 000)	5500 (55 – 55 000)
CeO_2	55 (5,5 – 550)	55 (0,55 – 2800)
Ag	55 (5,5 – 550)	5,5 (0,6 – 55)
NTC[1]	300 (55 – 550)	550 (180 – 550)

[1] NTC : Nanotubes de Carbone

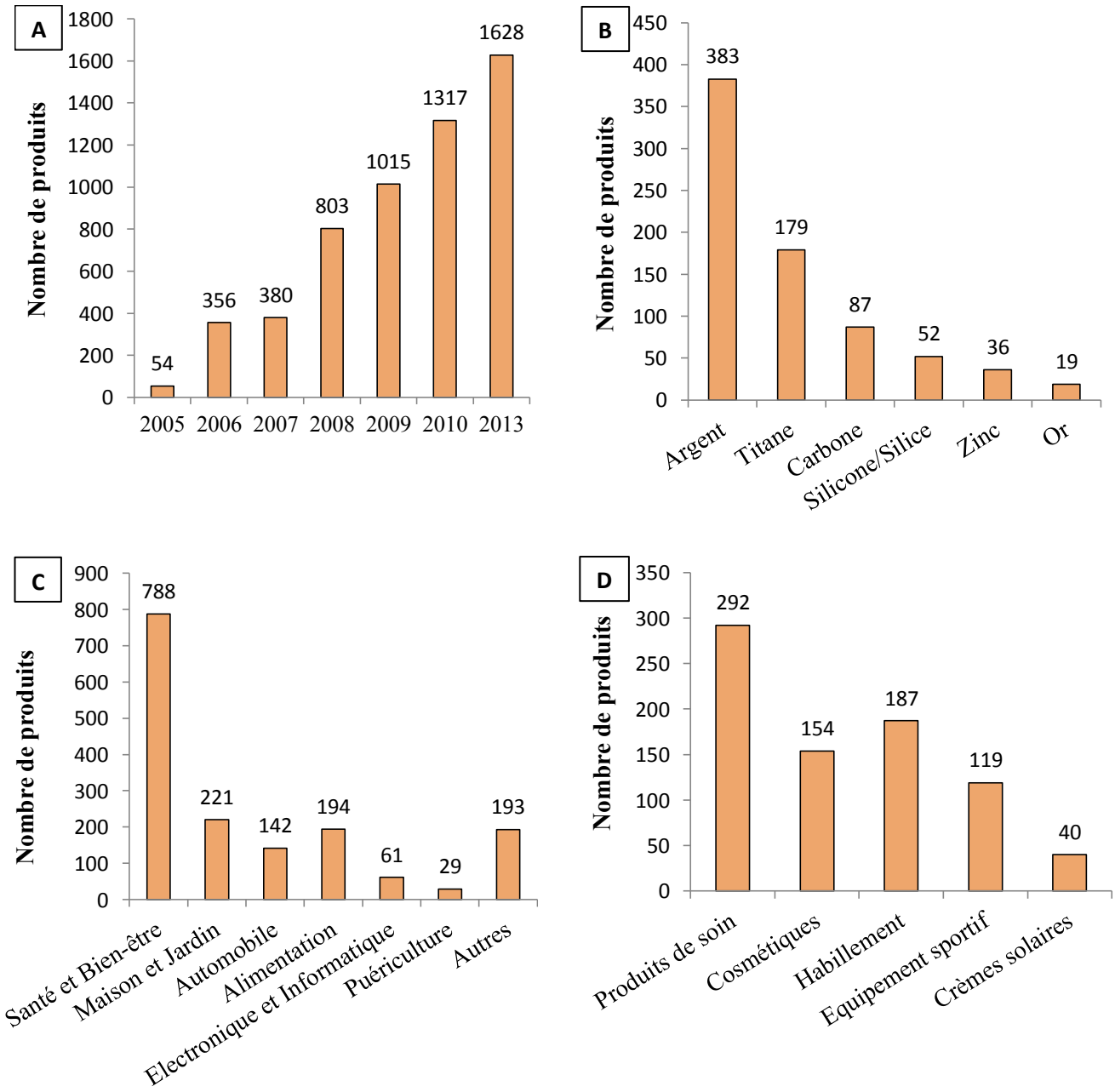


Figure 2: NP et Produits de Consommation Courante (PCC).
(A) Nombre total de PCC recensés entre 2005 et 2013 ; (B) Utilisation des NP les plus répandues dans les PCC ; (C) Principales classes de PCC contenant des NP ; (D) Sous-classe des produits de santé et bien-être contenant des NP.
(d'après « The Project on Emerging Nanotechnologies »)

1.2.3 Exposition aux nanoparticules

Les volumes estimés de nanomatériaux et le nombre de produits en contenant laissent penser que l'exposition des individus est quotidienne dans les pays industrialisés et qu'il est probable que ces substances soient déjà retrouvées dans l'environnement. Plusieurs voies d'exposition peuvent être envisagées pour l'Homme. Ainsi, l'ingestion de produits alimentaires contenant des NP (pour la conservation ou comme antiagglomérants), l'inhalation de NP rejetées dans l'air ou l'application cutanée directe de cosmétiques, notamment sur peaux lésées, sont des voies possibles. Des modèles (O'Brien et Cummins, 2010) basés sur les études de toxicité et d'exposition aux NP d'Ag, de CeO_2 et de TiO_2 montrent cependant que les risques d'inhalation et d'ingestion sont assez faibles, bien que plus de données soient nécessaires concernant l'inhalation potentielle du CeO_2. Les classes de risques mises en évidence par cette étude concernent la présence de TiO_2 et d'Ag dans les eaux de surface, pouvant entraîner une exposition directe. Des études ont également mis en évidence l'exposition de travailleurs au contact des nanomatériaux lors de leur production (Bello *et al.*, 2008; Fujitani *et al.*, 2008; Methner *et al.*, 2007; Yeganeh *et al.*, 2008).

L'utilisation de produits cosmétiques entraîne un risque de relargage dans les eaux usées et/ou dans les points d'eau naturels lors de la baignade, notamment après application de crèmes solaires. Une étude montre ainsi que 250 tonnes de NP provenant de crèmes solaires peuvent potentiellement pénétrer dans le milieu marin chaque année (Baker *et al.*, 2014). Le relargage des NP dans l'environnement à partir de produits d'utilisation courante a également été montré lors du lavage en machine de textiles contenant des NP de TiO_2 et d'Ag (Geranio *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2010; Lorenz *et al.*, 2012; Marcoux *et al.*, 2012; Windler *et al.*, 2012). Ces études montrent notamment que l'utilisation de produits blanchissants accélère grandement la dissolution de l'argent, mais que celui-ci est retrouvé sous forme d'agrégats de taille supérieure à 450 nm. Il existe également un risque d'entrée des NP dans les eaux souterraines lors de fortes pluies, par lessivage des surfaces enduites ou peintes, ou des façades autonettoyantes contenant des NP de TiO_2. Ainsi, Kaegi *et al.* (2008) ont mesuré des concentrations en TiO_2 entre 8 et 10 µg/L dans les enduits de façades, et de 8 à 16 µg/L dans les eaux de lessivage de ces façades, mettant en évidence un relargage important des NP. Une autre source de contamination de l'environnement est liée au transport, et notamment aux véhicules consommant du diesel. En premier lieu, l'abrasion des pneus va libérer sur les routes des particules carbonées ou de silice, qui peuvent alors être drainées vers les sols lors d'épisodes de pluies, et pénétrer dans les eaux souterraines ou de surface (Gottschalk *et al.*, 2010). L'autre source de pollution par les véhicules est le relargage atmosphérique de NP par

les gaz d'échappement (Baker *et al.*, 2014; Gottschalk *et al.*, 2010; Johnson et Park, 2012). Une étude (Johnson et Park, 2012) montre notamment que le maximum de NP de CeO_2 provenant des gaz d'échappement serait retrouvé sur les 20 premiers mètres en périphérie des routes, et serait de 16 µg/kg de sol, après sept années de dépôts continus. Cette valeur pourrait monter à 40 µg/kg en cas de doublement des émissions. Les effluents industriels seraient également à l'origine de la présence de NP dans l'environnement. Ainsi, Baker *et al.* (2014) affirment que les effluents industriels et d'eaux usées contenant des NP d'argent pourraient faire augmenter la concentration en Ag dans les rivières de 4 à 320 ng/L, et de 0,04 à 14µg/g dans les sédiments, et ce jusqu'à 700 km de distance dans les estuaires. Enfin, une autre source de pénétration des NP dans l'environnement est l'épandage agricole des boues d'épuration. En effet, les NP présentes dans les eaux usées peuvent être trouvées dans ces boues, comme cela a été montré dans le cas du TiO_2 (Kim *et al.*, 2012; Kiser *et al.*, 2009). Une de ces études (Kiser *et al.*, 2009) montre qu'une fraction de ces NP est retrouvée sous forme d'agglomérats de taille supérieure à 700 nm et est efficacement éliminée par les processus de traitement. Ces particules se retrouvent alors dans les boues qui serviront à l'épandage, à des concentrations comprises entre 1 et 6 g/kg. Les particules ainsi épandues finiront à plus ou moins long terme par contaminer les eaux de surface. L'épandage de ces boues représente donc une source importante de relargage environnemental (Gottschalk *et al.*, 2010; Moore, 2006; Wiesner *et al.*, 2006).

1.3 Risques potentiels des nanoparticules : lacunes scientifiques et législatives

1.3.1 Une connaissance partielle des risques liés aux nanoparticules

Malgré les études de relargage de NP à partir de produits manufacturés et les modélisations visant à estimer les quantités de NP présentes dans l'environnement, les techniques analytiques disponibles actuellement pour quantifier ces rejets sont rares, complexes et peu adaptées, et ne permettent pas des études de terrain en temps réel (Gottschalk *et al.*, 2010; Tiede *et al.*, 2008). Il en résulte un manque conséquent de connaissances sur les concentrations réelles de NP présentes dans l'environnement. De plus, il existe une énorme quantité de NP différentes, se distinguant par leur nature chimique et leurs caractéristiques intrinsèques, telles que leur taille, forme, aire de surface, structure cristalline, enrobage éventuel par d'autres molécules, potentiel d'agrégation, *etc.*. Ces caractéristiques guidant le comportement des NP dans l'environnement, chaque lot de NP aurait en théorie un

comportement propre, et donc des effets sur le vivant qui diffèrent d'un autre lot de NP (Petersen *et al.*, 2014). L'évaluation de chaque lot produit n'étant pas réaliste, il est nécessaire de comprendre quel(s) paramètre(s) a (ont) un rôle à jouer sur la toxicité, par quel(s) mécanisme(s) et dans quelle(s) condition(s). Les effets étant également dépendants de l'espèce considérée, il est nécessaire de disposer d'un panel d'informations le plus large possible regroupant les différents paramètres intrinsèques des NP, associés à des groupes d'organismes les plus variés possible. La quantité d'informations nécessaires dans ce domaine semble donc colossale si on souhaite avoir une vision claire de la toxicité des NP et des mécanismes associés.

En dépit de cela, les études écotoxicologiques sur les NP sont encore trop peu nombreuses, comme le montre une étude bibliométrique réalisée en 2012 (Kahru et Ivask, 2013). Les auteurs mettent en évidence que la nano*éco*toxicologie est une discipline émergente, qui se développe beaucoup plus lentement que la nanotoxicologie. Si les premières publications dans ce domaine datent des années 90, le premier article de nano*éco*toxicologie ne date que de 2006. Parmi les 160 216 articles publiés entre 1980 et 2011 ayant pour sujet les nanoparticules, uniquement 5832 sont associés au terme « toxicité » (soit 3,6%), 0,84% sont associés au terme « santé », 0,64% à « sécurité » et 0,18% à « danger ». Une recherche pour chaque type de nanomatériaux, associé aux termes « toxic. » et « ecotoxic. » montre que les articles associés à la nanotoxicologie ne représentent que 1% des publications, et ceux associés à la nano*éco*toxicologie n'en présentent que 0,1%. En d'autres termes, quel que soit le type de nanomatériau considéré, pour 1000 articles 10 comprennent de l'information sur les effets toxicologiques, et uniquement 1 traite d'effets écotoxicologiques. De plus, les espèces biologiques étudiées sont peu variées et sont principalement celles préconisées dans le cadre de tests d'écotoxicité normalisés, soit certaines espèces de poissons, d'algues et de daphnies. Ce manque drastique d'informations dans le domaine de l'écotoxicologie appliquée aux NP est confirmé par de nombreux auteurs, notamment des auteurs d'articles de revue ayant rassemblé l'ensemble des informations disponibles sur le sujet (Baun *et al.*, 2008; Kahru et Dubourguier, 2010; Navarro *et al.*, 2008; O'Brien et Cummins, 2010).

Ce manque d'informations est en partie à l'origine des difficultés rencontrées pour mettre en place un cadre législatif pour tout ce qui a trait aux nanomatériaux.

1.3.2 Cadre législatif actuel et actions mises en œuvre

Les instances de régulation des produits et substances mis sur le marché reconnaissent actuellement les nanomatériaux manufacturés comme un groupe de substances à part. Cependant, aucune loi spécifique aux nanomatériaux concernant des limites de production, d'utilisation ou de commercialisation n'est à l'heure actuelle en vigueur. Malgré la reconnaissance de leurs spécificités, les nanomatériaux sont encore couverts par le cadre des autres produits. Ainsi, le programme européen REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) pour l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques, reconnaît que les nanomatériaux ont des propriétés spécifiques qui peuvent requérir une classification à part, mais ne possède aucune disposition particulière à leur égard (European Commission, 2008). De même, l'agence de protection environnementale américaine (US EPA) et l'agence des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) appréhendent le cas des nanomatériaux selon la nouveauté de leur « identité moléculaire » (US EPA, 2008). Ainsi, si un de ces matériaux s'apparente à un produit ayant la même identité moléculaire, il n'est pas considéré comme nouveau et tombe sous la règlementation en vigueur pour son équivalent non-nano. Dans le cas contraire, des études au cas par cas sont envisagées. Au niveau français, même si, comme ailleurs, aucune loi ne régule la mise sur le marché des nanomatériaux manufacturés, des mesures ont été prises en termes de déclaration et d'information du public. Ainsi, la loi Grenelle de l'Environnement (*LOI n° 2009-967 du 3 août 2009 - Article 42*, 2009), complétée par la loi Grenelle de l'Environnement 2 (*LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 - Article 185*, 2010), rend obligatoire la déclaration de fabrication, d'importation depuis l'étranger ou la mise sur le marché de substances à l'état nanoparticulaire pour des quantités supérieures à 100 g. Toutes les informations relatives aux dangers de ces substances et à leur exposition doivent être fournies et mises à disposition du public. L'étiquetage des nanomatériaux dans l'alimentation sera également obligatoire en Europe à partir de décembre 2014, selon le règlement européen concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires (*Règlement (UE) N° 1169/2011 du Parlement Européen et du Conseil du 25 Octobre 2011*).

Les organisations gouvernementales mettent également en œuvre différentes dispositions visant à développer des outils législatifs adaptés. Au niveau européen, l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) a mis en place un programme de test de nanomatériaux manufacturés représentatifs (OECD, 2010a). Une liste prioritaire basée sur les volumes de production et de disponibilité et sur l'information déjà existante, ainsi qu'une liste des paramètres de toxicité à tester ont été établies. L'OCDE a également mis en place un

groupe de travail visant à évaluer l'applicabilité des tests standards aux nanomatériaux (SCENIHR /002 /05, 2005), et a mis à disposition des scientifiques et des industriels un guide pour la réalisation de tests sur nanomatériaux (OECD, 2010b). Enfin, un programme de collaboration entre REACH et l'ECHA (agence européenne des produits chimiques) est actuellement en cours, et a pour but de consolider les connaissances nécessaires pour l'évaluation du risque et de fournir aux industriels et autres intervenants des outils pratiques pour réaliser cette évaluation. A terme, ce projet intitulé REACHnano a pour but d'inclure les nanomatériaux dans le règlement REACH comme un groupe à part entière. Aux Etats-Unis, la FDA propose des guides pour les industriels des filières alimentaire et cosmétique pour l'évaluation de l'innocuité des nanomatériaux (FDA, 2012a, 2012b). Elle a également mis en place un groupe de travail (NanotechnologyTask Force) permettant un meilleur dialogue avec les industriels nationaux et internationaux, un plan de recherche (Nanotechnology Regulatory Science Research Plan, NRSRP) et un programme d'initiative (National NanotechnologyInitiave, NNI) pour les nanomatériaux, ayant également pour but l'amélioration de l'évaluation du risque. Enfin, un rapport très complet de la Royal Society sur les nanotechnologies et les nanomatériaux (The Royal Society, 2004) recommande entre autres que ceux-ci soient considérés comme des substances nouvelles, qu'ils subissent une évaluation du risque complète avant mise sur le marché, que les industriels publient le détail des méthodes utilisées pour cette évaluation ainsi que la liste des ingrédients présents sous forme nanoparticulaire dans les produits de consommation. Il recommande enfin que la priorité soit donnée à l'étude de l'innocuité des nanomatériaux.

Les nanoparticules, ou particules à l'échelle nanométrique, possèdent du fait de leur taille des propriétés que n'ont pas leurs équivalents « non-nano ». Ces propriétés nouvelles ou décuplées en font un enjeu technologique et scientifique, mais également économique. Les nanoparticules sont en effet utilisées dans de très nombreux domaines d'application et sont de plus en plus présentes dans les produits de consommation courante. Une exposition des consommateurs ainsi que des rejets dans l'environnement sont donc à craindre. Malgré cela, aucune loi ne régule actuellement la production ou l'utilisation des nanoparticules, en partie du fait d'une méconnaissance de leurs effets toxiques ou écotoxiques. Une évaluation de ces effets est donc nécessaire et urgente, notamment dans le domaine de l'écotoxicologie.

2. Cas des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2)

2.1 Présentation générale

Le cérium est un métal gris argenté, découvert en 1803 et dont le nom vient de la planète naine Cérès découverte peu de temps auparavant. Il fait partie des lanthanides, ou terres rares, et a la particularité d'être stable à l'état tétravalent à l'inverse des autres lanthanides, stables à l'état trivalent. Le cérium est la terre rare la plus abondante dans la croûte terrestre, dont il représente 0,0046% du poids. On le trouve naturellement dans l'environnement à des concentrations de 48,2 mg/kg dans les sols, 55 ng/L dans les cours d'eau et 66,6 mg/kg dans les sédiments (FOREGS, 2005).

2.1.1 Propriétés chimiques du CeO_2

Le CeO_2 possède deux niveaux d'oxydation, Ce^{III} et Ce^{IV}, qui présentent des réactivités très différentes : le Ce^{III} est un réducteur fort en milieu basique alors que le Ce^{IV} est un oxydant fort en milieu acide. Le passage d'un niveau d'oxydation à l'autre peut se faire dans les deux sens et de manière cyclique, rendant le CeO_2 assez réactif. Il possède un grand nombre de lacunes en oxygènes mobiles, et est donc capable de donner ou stocker des atomes d'oxygène suivant les conditions chimiques dans lesquelles il se trouve (Diot, 2012; OECD, 2010c). Ainsi, si l'atmosphère qui l'entoure est pauvre en oxygène il pourra agir en catalyseur et libérer un atome d'oxygène. Cette perte d'un atome O s'accompagne de l'établissement d'une lacune et d'une réduction du Ce^{IV} en Ce^{III}. Cette propriété catalytique est présente chez le CeO_2 non nanoparticulaire, mais est multipliée lors du passage à l'état de NP. Une autre propriété des NP de CeO_2 est la capacité d'absorption dans l'ultra-violet (UV), due à un transfert de charges entre les orbitales atomiques 2p de l'oxygène et les orbitales 4f du cérium, vides dans le cas du Ce^{IV} (Diot, 2012).

2.1.2 Applications des nanoparticules de CeO_2

Avant l'apparition des NP sur le marché, le CeO_2 était déjà utilisé comme agent de polissage pour les miroirs, verres de lunettes, lentilles ophtalmiques et lentilles optiques de précision, et jouait ainsi le rôle d'antireflets (OECD, 2010c). Il est également encore utilisé à l'heure actuelle dans la fabrication de l'éclairage au gaz pour le camping (Zeyons, 2008). Les NP de CeO_2 sont utilisées dans plusieurs domaines grâce à leurs deux grandes propriétés : absorption des UV et catalyse. On les trouve donc dans des peintures et revêtements de

protection du bois, pour éviter l'altération des surfaces en extérieur (Auffan *et al.*, 2014; Piccinno *et al.*, 2012; Quik *et al.*, 2010; Zeyons, 2008). Du fait de leur propriété catalytique, on les retrouve aussi dans des détecteurs à oxygène (Ju-Nam et Lead, 2008), ou dans les parois des fours autonettoyants (Zeyons, 2008). Cette propriété est principalement mise à profit dans l'industrie automobile (Boxall *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Piccinno *et al.*, 2012). Oxonica commercialise un additif pour diesel, Envirox™, permettant de diminuer les émissions de fumées et la consommation de carburant. Une étude montre qu'ajouté au carburant à des concentrations de 5 à 10 mg/L, ce produit augmenterait de 10% l'efficacité des moteurs diesel (Boxall *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). En effet, par leur rôle de catalyseur les NP de CeO_2 vont permettre une augmentation du rendement de la combustion et donc limiter l'émission des produits toxiques de combustion incomplète, tel que le monoxyde de carbone.

La production des NP de CeO_2 est estimée entre 100 et 1000 tonnes par an au niveau mondial (Piccinno *et al.*, 2012). Ces NP sont utilisées dans de nombreuses applications de la vie courante (agent de polissage, peintures, revêtements, véhicules à moteur) et sont donc susceptibles d'être rejetées dans l'environnement. Il est donc nécessaire et urgent d'en connaître les impacts écotoxiques. Les NP de CeO_2 font notamment partie de la liste de tests prioritaires de l'OCDE (2010a).

2.2 Ecotoxicité des nanoparticules de CeO_2

Les études de toxicité sur les NP de CeO_2 sont actuellement assez peu nombreuses, et les espèces étudiées peu variées. On retrouve cependant des effets et mécanismes de toxicité communs aux différentes études. Le tableau 3 présente l'ensemble des études décrites ci-dessous. Notons qu'un certain nombre d'études a montré un effet protecteur des NP de CeO_2 (Kim *et al.*, 2012; Niu *et al.*, 2007; Tarnuzzer *et al.*, 2005). Ces études sont cependant réalisées sur lignées cellulaires, dans le domaine de la toxicologie, et ne correspondent pas à notre cadre de travail. Elles ne seront donc pas référencées ici.

Toxicité aiguë : une toxicité aiguë a été mise en évidence chez les daphnies dans de nombreux travaux, à des concentrations différentes et dépendantes de l'espèce étudiée. Ainsi, Manier *et al*. (2011) ont calculé une CE_{50} (Concentration Efficace ; mobilité) comprise entre 12 et 25 mg/L chez *Ceriodaphnia dubia*, alors qu'aucune toxicité aiguë n'a été observée chez *Daphnia magna* jusqu'à 1 mg/L (Gaiser *et al.*, 2009; Manier *et al.*, 2011). D'autres études montrent une mortalité significative à 1 mg/L chez *D. magna* (Lee *et al.*, 2009) et une CL_{50} à

48h de 12 mg/L (García *et al.*, 2011). Par ailleurs, aucune mortalité n'a été observée à 10 mg/L après 96h d'exposition, alors qu'une exposition de 21 jours entraîne 100% de mortalité à cette concentration (Gaiser *et al.*, 2012). Les concentrations auxquelles sont observés les effets toxiques dépendent également de l'espèce étudiée : les CE_{50} à 48h d'exposition pour *Daphnia similis* et *Daphnia pulex* sont respectivement de 0,26 et 91,8 mg/L (Artells *et al.*, 2013). Enfin, deux études ont montré que si les NP de CeO_2 n'entraînaient pas de toxicité lors d'une exposition simple, elles augmentaient la toxicité du plomb chez *C. dubia* (Hu *et al.*, 2012) en augmentant sa biodisponibilité et entraînaient une toxicité aiguë chez *D. magna* en co-exposition avec de l'oxyde de cuivre (Jemec *et al.*, 2012). De la mortalité a également été observée chez le chironome *Chironomus riparius* à 1 mg/L (Lee *et al.*, 2009) et chez l'oursin *Paracentrotus lividus*, avec 100% de mortalité en deux jours observée à 10 mg/L (Falugi *et al.*, 2012). Le nématode *Caenorhabditis elegans* présente également des signes de toxicité aiguë, avec une diminution du taux de survie à 1 mg/L (Roh *et al.*, 2010) et une diminution du temps de vie des organismes dès 1 nM (Zhang *et al.*, 2011). Enfin, les NP de CeO_2 ont un effet sur la croissance des algues vertes et la survie de certaines espèces bactériennes. Ainsi, une inhibition de croissance a été observée chez *P. subcapitata* à différentes concentrations suivant les études, avec des effets observés à 66 mg/L (Rogers *et al.*, 2010) et des CE_{50} calculées entre 2 – 3 mg/L (Manier *et al.*, 2011) ou 4,1 – 6,2 mg/L (Manier *et al.*, 2013). De la cytotoxicité a été observée chez *Escherichia coli* dès 5 mg/L (Thill *et al.*, 2006) et entre 50 et 105 mg/L lors d'une autre étude chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*. A l'inverse, aucune toxicité n'a été observée à ces concentrations chez la bactérie *Shewanella oneidensis*, capable de réduire les métaux, probablement du fait de son métabolisme adapté aux métaux.

Effets sub-létaux : des impacts sur la reproduction ont été observés chez deux espèces ; une diminution de fertilité a été mise en évidence chez *Caenorhabditis elegans* dès 1 mg/L (Roh *et al.*, 2010) et une diminution de reproduction a été observée chez *Daphnia magna* de 100 à 1000 mg/L (Manier *et al.*, 2011). Une diminution de croissance a également été mise en évidence chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à 10 mg/L et 50 mg/L, suivant la taille des NP considérées (20 nm et 10 et 15 nm respectivement) (Jemec *et al.*, 2012). La vitesse de nage de *Daphnia similis* et *Daphnia pulex* s'est aussi avérée impactée par la présence des NP, possiblement du fait d'une gêne physique due à l'agrégation des NP sur la cuticule des organismes (Artells *et al.*, 2013). Il a également été montré que les NP de CeO_2 pouvaient impacter l'expression de certains gènes chez le nématode, l'oursin et des espèces bactériennes (Falugi *et al.*, 2012; Pelletier *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2010) et conduire à des dommages chromosomiques chez le chironome et la daphnie (Lee *et al.*, 2009). De plus, une diminution

de l'activité cholinestérase (ChE) a été mise en évidence chez l'oursin (Falugi *et al.*, 2012). Une augmentation de l'activité ChE a aussi été observée chez le poisson *Carassius auratus* à la concentration de 40 mg/L, probablement comme mécanisme de compensation de stress, alors qu'une inhibition a lieu à partir de 160 mg/L (Xia *et al.*, 2013). Il a également été montré dans la même étude une activation de l'activité superoxyde dismutase (SOD) à 40 mg/L, inhibée à partir de 160 mg/L, une inhibition de l'activité catalase (CAT) à partir de 160 mg/L et une activation de l'activité Na/K-ATPase aux concentrations intermédiaires de 60 et 80 mg/L.

Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et stress oxydant : il est souvent mentionné que la production de ROS et le stress oxydant font partie des mécanismes de toxicité des NP. Une induction de ROS et des dommages cellulaires associés ont été observés chez le nématode (Zhang *et al.*, 2011) et une altération morphologique du réticulum endoplasmique et des lysosomes des cellules immunitaires a été observée chez l'oursin (Falugi *et al.*, 2012). La production de ROS a également été montrée chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* (Rodea-Palomares *et al.*, 2012) et la cyanobactérie *Anabeana CPB4337* (Rodea-Palomares *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2010), associée à des dommages membranaires liés à des processus de peroxydation lipidique. Enfin, des marqueurs de stress oxydant et de peroxydation lipidique ont été observés dans des pousses de riz exposées à la forte concentration de 500 mg/L (Rico *et al.*, 2013).

Impacts sur les organismes microbiens : certains des effets observés chez les algues, bactéries et levures sont spécifiques de ces organismes, du fait de leur métabolisme particulier. Une inhibition de la photosynthèse a ainsi été observée chez la cyanobactérie *Anabeana CPB4337* à partir de 0,01 mg/L de NP. Les effets observés chez *P. subcapitata* sont plus contrastés, avec une stimulation de la photosynthèse à des concentrations comprises entre 0,01 et 1 mg/L, et une très forte inhibition observée à 100 mg/L, suggérant un effet d'hormèse à faibles doses. Chez ces deux espèces, l'inhibition de photosynthèse est associée à une production de ROS et à des processus de peroxydation lipidique qui entraînent une altération de l'intégrité membranaire. Les auteurs suggèrent donc que le stress oxydant induit par les NP entraîne des réactions de peroxydation et des dommages aux membranes ayant pour conséquence une altération ou destruction des photosystèmes II, conduisant à une inhibition de la photosynthèse (Rodea-Palomares *et al.*, 2012). Une inhibition de la respiration a été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* exposée de 100 à 1000 mg/L, mais sans altération de l'intégrité membranaire (García-Saucedo *et al.*, 2011). Les mécanismes de toxicité seraient donc ici différents. Une inhibition de 80% de la

bioluminescence a été observée chez *Vibrio fisheri* après une exposition à la très forte concentration de 640 mg/L (García *et al.*, 2011). Des dommages morphologiques ont été observés chez la bactérie *Nitrosomonas europaea* après une exposition de 4h à 20 et 200 mg/L (Fang *et al.*, 2010). De plus, la taille des cellules tend à diminuer à 200 mg/L. Enfin, la toxicité des NP de CeO_2 a été étudiée chez des communautés bactériennes. Il a été mis en évidence une inhibition significative de la respiration et de la production de biogaz, ainsi qu'une diminution de la biomasse à une concentration de 640 mg/L, chez une communauté bactérienne présente dans des boues de traitement des eaux usées (García *et al.*, 2012). Une autre étude sur les communautés présentes dans les boues de traitement montre une modification du biofilm bactérien, avec une diminution de la production d'acides gras et de polysaccharides à des concentrations de NP allant de 5 à 150 g/kg de matrice (Ma *et al.*, 2013). En revanche, les fonctions métaboliques du biofilm (processus de méthanisation) ne sont pas affectées, et les changements observés ne seraient pas dus à une production de ROS, celle-ci n'étant pas significativement stimulée. Enfin, un autre mécanisme de défense a été mis en évidence chez des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* et *Mycobacterium smegmatis*, bactéries communément présentes dans les sols et l'eau. Les auteurs ont observé un détachement de portions externes du biofilm contaminé après une exposition de 6h (5 – 500 mg/L), permettant ainsi une séparation des NP adsorbées dans le biofilm et leur remise en suspension. Les auteurs suggèrent également que la capacité d'adsorption par les biofilms dépend plus de leur aire de surface que de leur épaisseur (Jing *et al.*, 2014).

Modifications de la morphologie et des qualités nutritionnelles chez les plantes : la plupart des études faites chez les plantes sont à visée agronomique et montrent peu ou pas d'effet, voire des effets bénéfiques des NP de CeO_2. Notons que ces études sont souvent réalisées à des concentrations très élevées, de l'ordre de la centaine ou du millier de mg/L ou mg/kg. Des effets sub-létaux ont été observés chez des pousses de riz (stress oxydant, peroxydation lipidique) exposées entre 62 et 500 mg/L (Rico *et al.*, 2013). Aucun effet sur la germination n'a été observé, malgré une accumulation de cérium dose-dépendante dans les tissus. De la génotoxicité a été mise en évidence chez des pousses de soja, mais leur germination n'a globalement pas été affectée (500 – 4000 mg/L) (López-Moreno *et al.*, 2010). Au contraire, les auteurs ont montré une stimulation de la croissance racinaire quelle que soit la dose considérée. Une autre étude met en évidence une augmentation de la croissance racinaire chez des laitues exposées 2 heures à 2000 mg/L, alors qu'aucun effet n'a été observé chez le radis, le colza, la tomate, le blé, le chou et le concombre exposés dans les mêmes conditions (Ma *et al.*, 2010). Aucun effet des NP de CeO_2 sur la germination du radis n'a été

observé entre 50 et 200 mg/L et une augmentation racinaire a au contraire été mise en évidence lors d'une exposition à des NP enrobées de citrate, à 200 mg/L (Trujillo-Reyes *et al.*, 2013). Une augmentation de la production et de la taille des fruits a été observée chez des plants de tomates exposés entre 0,1 et 10 mg/L, associée à une augmentation de la concentration en cérium dans les tissus (Wang *et al.*, 2012). Une accumulation de cérium a également été observée chez des citrouilles exposées à 100 mg/L pendant 8 jours, par translocation des racines vers la tige (Schwabe *et al.*, 2013). Enfin, des auteurs ont reporté des modifications des valeurs nutritionnelles chez le soja (100 – 1000 mg/kg, 48 jours d'exposition) (Peralta-Videa *et al.*, 2014) et le maïs (400 mg/kg, un mois d'exposition) (Zhao *et al.*, 2014), notamment du fait d'une modification de l'absorption et de l'accumulation de divers éléments minéraux (Mg, Al, Fe, Ca, P, S).

Tableau 3 : Ecotoxicité des NP de CeO_2 – état de l'art

Espèce	NP de CeO_2[1]	Exposition	Effets observés	Réf.
D. magna	< 25 nm	100 – 1000 mg/L 48h/8j	Aucun effet	Manier *et al.*, 2011
	< 25nm	0 – 10 mg/L, 96h	Aucune toxicité	Gaiser *et al.*, 2009
	1 et 10 nm	1 mg/L, 96h	Mortalité, génotoxicité	Lee *et al.*, 2009
	6,5 nm +11,5 mV	640 mg/L, 48h	CL_{50} = 12 mg/L	García *et al.*, 2011
	< 25nm	0,1 – 10 mg/L, 96h ou 21j	Pas de toxicité à 96h 100% de mortalité à 21j, 10 mg/L	Gaiser *et al.*, 2012
	CuO-CeO_2 6,5 – 8,2 nm 134 – 166 m²/g	1 – 500 mg/L, 48h	Mortalité	Jemec *et al.*, 2012
D. similis	8 nm -40 mV 110 m²/g	1 – 100 mg/L, 48h	CE_{50} = 0,26 mg/L Diminution de la vitesse de nage	Artells *et al.*, 2013
D. pulex	8 nm -40 mV 110 m²/g	1 – 100 mg/L, 48h	CE_{50} = 91,8 mg/L Diminution de la vitesse de nage	Artells *et al.*, 2013
C. dubia	10 – 30 nm 8 mV 30 – 50 m²/g	0 – 1000 mg/L, 24h ou 120 mg/L, 24h avec Pb^{2+} 0 – 4,5 mg/L	Mortalité à 1 g/L à pH 7,8 (NP seules) Mortalité à 250 mg/L à pH 6,8 (NP seules) Toxicité du Pb augmente avec les NP	Hu *et al.*, 2012
	< 25 nm	100 – 1000 mg/L 48h/8j	CE_{50} = 12 – 25 mg/L Diminution de la reproduction	Manier *et al.*, 2013

C. elegans	15 et 45 nm	1 mg/L, 24h	Augmentation de l'expression de *cyp35a2* Diminution de survie et de fertilité	Roh *et al.*, 2012
	8 nm	1 – 100 nM, cycle complet	Induction de ROS et dommages oxydants Diminution du temps de vie moyen	Zhang *et al.*, 2011
C. riparius	1 et 10 nm	1 mg/L, 24h	Mortalité, génotoxicité	Lee *et al.*, 2009
D. rerio	CuO-CeO_2 6,5 – 8,2 nm 134 – 166 m²/g	1 – 500 mg/L, 7j	Diminution de la croissance	Jemec *et al.*, 2012
P. lividus	50 – 105 nm 15 m²/g	0,1 et 10 mg/L	100 % de mortalité en 2j à 10 mg/L Diminution de l'activité ChE Diminution des protéines de stress Altérations morphologiques intracellulaires	Falugi *et al.*, 2012
C. auratus	20 nm 95 m²/g	20 – 320 mg/L, 4j	Modification des activités AChE, SOD, CAT et Na/K-ATPase	Xia *et al.*, 2013
P. subcapitata	< 25 nm	100 – 1000 mg/L 48h/8j	CE_{10} = 2 – 3 mg/L	Manier *et al.*, 2011
	10 – 20 nm	10 et 66 mg/L, 72h	Inhibition de croissance Peroxydation lipidique, dommages membranaires	Rogers *et al.*, 2010
	10 et 25 nm NP vieillies ou non	0,2 – 25 mg/L, 72h	CE_{50} = 5,6 mg/L (NP non vieillies) CE_{50} = 6,2 mg/L (NP vieillies)	Manier *et al.*, 2013
	< 50 nm	0,01 – 100 mg/L, 72h	Activation de la photosynthèse aux faibles doses, inhibition à 100 mg/L Production de ROS, peroxydation lipidique, altération de l'intégrité membranaire	Rodea-Palomares *et al.*, 2012
S. cerevisiae	50 nm	100 – 1000 mg/L, 12h	Inhibition de la respiration (NP dispersées) Pas d'impacts sur l'intégrité membranaire	García-Saucedo *et al.*, 2011
E. coli	7 nm 400 m²/g	0.46 – 500 mg/L, 3h	Cytotoxicité Adsorption des NP	Thill *et al.*, 2006
	6 ; 15 ; 22 ; 45 nm	50 – 150 mg/L, 18h	Inhibition de croissance dose-dépendante et dépendante de la taille des NP (plus forte pour les petites NP)	Pelletier *et al.*, 2010
S. oneidensis	6 ; 15 ; 22 ; 45 nm	50 – 150 mg/L, 18h	Aucune toxicité	Pelletier *et al.*, 2010
B. subtilis	6 ; 15 ; 22 ; 45 nm	50 – 150 mg/L, 18h	Inhibition de croissance dose-dépendante et dépendante de la taille des NP (plus faible pour les petites NP)	Pelletier *et al.*, 2010

V. fisheri	6,5 nm +11,5 mV	640 mg/L, 5 – 15 min	Inhibition de bioluminescence de plus de 80%	García *et al.*, 2011
Anabeana CPB4337	< 50 nm	0,01 – 100 mg/L, 72h	Inhibition de la photosynthèse à toutes les concentrations Production de ROS, peroxydation lipidique, altération de l'intégrité membranaire	Rodea-Palomares *et al.*, 2012
N. europaea	60 nm 93.8 m²/g -19 mV	20 et 200 mg/L, 4h	Dommages morphologiques Diminution des cellules à 200 mg/L	Fang *et al.*, 2012
Communauté bactérienne	12 nm 121 m²/g 11.5 mV	640 mg/L	Très forte inhibition de la production de biogaz (~100%) Forte diminution de la biomasse	García *et al.*, 2012
Communauté bactérienne	< 25 nm	5 – 150 g/kg	Diminution de la production d'acides gras à chaîne courte et de polysaccharides Pas de production de ROS, pas d'inhibition de la méthanisation	Ma *et al.*, 2013
P. fluorescens et *M. smegmatis*	80 – 100 nm	5 – 500 mg/L, 6h	Détachement de portions de biofilm contaminé Très faible internalisation cellulaire	Jing *et al.*, 2014
L. sativa *C. sativus* *S.lycopersicum* *S.oleracea* *A. porrum* *C.annuum*	6,5 nm +11,5 mV	640 mg/L, 48h	Test non adapté	García *et al.*, 2011
T. aestivum *C. maxima*	17 – 100 nm	100 mg/L, 8j	Association des NP avec les racines Translocation du Ce vers les tiges (*C. maxima*)	Schwabe *et al.*, 2013
R. sativus *B. napus* *L. sativa* *T. aestivum* *B. oleracea* *C. sativus*	7.2 nm	2000 mg/L, 2h	Augmentation de la croissance racinaire (*L. sativa* uniquement) Pas d'autre effet	Ma *et al.*, 2010
G. max	8 nm	100 – 1000 mg/kg, 48h	Altération de l'absorption de Mg, Ca, P, S, Al	Peralta-Videa *et al.*, 2014
Plants de maïs (variété Golden, Del Norte Seed Company, El Paso, TX, USA)	8 nm -0,62 mV	400 mg/kg, 1 mois	Augmentation de l'accumulation racinaire de Fe et Al Augmentation de l'accumulation racinaire de Mn en absence d'alginate	Zhao *et al.*, 2014
S. lycopersicum	10 – 30 nm	0,1 – 10 mg/L	Pas de toxicité Léger effet positif sur la croissance Translocation du Ce des racines vers les tiges Quantités élevées de Ce dans les tissus	Wang *et al.*, 2012

O. sativa	8 nm 93,8 m²/g	62,5 – 500 mg/L, 10j	Pas d'effet sur la germination Peroxydation lipidique à 500 mg/L Altérations enzymatiques, dommages aux membranes	Rico *et al.*, 2013
G. max	7 nm	500 – 4000 mg/L	Pas d'effets sur la germination Augmentation de la croissance racinaire Modification de l'absorption d'éléments	López-Moreno *et al.*, 2010

[1]Taille primaire des NP (nm)
Aire de surface spécifique (m²/g)
Potentiel zêta (mV)

Les nanoparticules de CeO_2 présentent des propriétés particulièrement intéressantes en catalyse et en termes de protection contre les rayons UV. On les retrouve donc dans de nombreux produits du quotidien, notamment dans les revêtements anti-UV et dans le secteur automobile. Leur production importante, estimée entre 100 et 1000 tonnes par an au niveau mondial, peut entraîner leur relargage dans l'environnement, et il est donc nécessaire de connaitre leurs possibles impacts écotoxiques.

Plusieurs études ont mis en évidence une toxicité aiguë associée à l'exposition à ces NP, chez des espèces aquatiques et terrestres. Des effets sub-létaux ont également été observés, tels que des effets génotoxiques, des impacts sur la croissance, la reproduction, la vitesse de nage, des modifications de l'activité enzymatique et de l'expression génétique. Il a également été montré que ces NP pouvaient entraîner chez les algues ou les bactéries une inhibition de la photosynthèse, de la respiration, de la bioluminescence et de la production de biogaz, ainsi qu'une diminution de la biomasse et une altération de l'intégrité membranaire. Ces effets peuvent être associés à une production de ROS et à des processus de peroxydation lipidique. La toxicité des NP de CeO_2 est aussi évaluée chez plusieurs espèces de plantes, dans des études à visée agronomique. Peu ou pas d'effet toxique est reporté, et une stimulation de la croissance et de production est au contraire mise en avant. Cependant l'exposition aux NP de CeO_2 peut également entraîner une altération des qualités nutritionnelles et une accumulation de cérium dans les tissus.

3. Vers une prise en compte de la complexité des milieux naturels

3.1 Difficultés liées à l'étude des nanoparticules en écotoxicologie

Du fait de leurs propriétés particulières, le comportement des NP dans les matrices environnementales diffère de celui de la plupart des autres contaminants. La majorité d'entre elles sont notamment peu ou pas solubles et ont tendance à s'agréger/s'agglomérer et sédimenter en milieu aqueux, en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu. De ce fait, lorsqu'elles sont introduites dans le milieu aquatique, les NP ne sont pas réparties uniformément dans le milieu, et la probabilité pour un organisme de rentrer en contact avec une NP n'est pas la même dans tout le système d'exposition. Une conséquence de ce phénomène d'agglomération et de sédimentation est la difficulté du maintien de la dose initiale d'exposition, et des concentrations différentes suivant la hauteur de la colonne d'eau. De plus, l'agrégation ou l'agglomération des NP fait que leur taille augmente et que le caractère nanométrique peut ne plus être conservé. De ce fait, même si la taille initiale des NP utilisées est connue, elle risque de varier durant l'exposition. Des paramètres autres que la taille, tels que l'aire de surface, la réactivité, la chimie de surface ou la charge électrique peuvent évoluer au cours du temps. Même si les caractéristiques sont initialement connues, le système peut évoluer au cours de l'exposition, rendant la caractérisation de l'exposition peu aisée. Enfin, comme évoqué précédemment, les NP sont de natures très variées et deux NP de même nature chimique peuvent avoir des propriétés physico-chimiques complètement différentes. Pour comprendre les mécanismes de toxicité, il est donc nécessaire de les mettre en lien avec les paramètres physico-chimiques des NP et leur évolution. L'étude écotoxicologique des NP est donc très spécifique à ces contaminants, faisant de la « nanoécotoxicologie » un domaine à part.

Le comportement particulier des NP peut entraîner des effets toxiques qu'il n'est pas possible de prévoir en se basant sur l'expérience acquise des équivalents non nanoparticulaires. De plus, ces effets peuvent varier d'un milieu à l'autre, d'une espèce à l'autre, et d'une condition d'exposition à l'autre. Il est donc impératif d'évaluer la toxicité des NP dans des conditions qui se rapprochent le plus possible des conditions naturelles. La prise en compte des effets à une échelle supérieure à celle de l'espèce seule, à un niveau qui tend à se rapprocher de l'écosystème, est également nécessaire. Ainsi, les méthodes d'exposition, les matrices sélectionnées, les espèces étudiées et le niveau de complexité du système biologique considéré ont un rôle déterminant dans la pertinence de l'étude menée.

3.2 Evaluation de l'écotoxicité des nanoparticules suivant des approches pertinentes en termes de représentativité environnementale

Conscients de la nécessité d'étudier le comportement et les effets des NP dans des conditions qui se rapprochent des conditions naturelles, les scientifiques du domaine ont récemment orienté leurs études vers des méthodes d'exposition qui intègrent la complexité du milieu naturel. Cette partie fait l'objet d'un article de revue publié dans le journal *Journal of Hazardous Materials* (Bour *et al*., 2015).

RESUME :

Les publications de plus en plus nombreuses concernant l'étude des NP tendent à montrer que celles-ci ne se comportent pas dans les matrices environnementales comme d'autres types de contaminants (métaux, pesticides, HAP…). Il est donc impératif d'étudier le comportement et la toxicité des NP dans des conditions d'exposition qui se rapprochent des conditions naturelles. Des études récentes ont employé des méthodes d'exposition intégrant en partie la complexité des conditions naturelles.

Une première approche consiste à exposer les organismes par la voie trophique uniquement. Pour cela, une espèce d'un niveau trophique inférieur est initialement exposée aux NP, puis fournie comme nourriture à l'espèce d'intérêt. Ce type d'exposition se fait généralement à deux niveaux trophiques, mais certaines études ont utilisé trois espèces à des niveaux trophiques différents. Ces études permettent de déterminer l'implication de la voie trophique dans la toxicité des NP et leur transfert potentiel dans les réseaux trophiques. Une autre approche consiste à exposer simultanément plusieurs espèces en conditions contrôlées. Cette méthode permet l'établissement de relations inter-espèces complexes, telles que la prédation, la compétition, ou des relations indirectes entre espèces, tout en conservant un contrôle important des paramètres abiotiques du système. Enfin, les études à ciel ouvert représentent une étape de plus dans la complexification du système, avec une absence de contrôle des conditions climatiques ou des espèces non-intentionnelles, colonisatrices du système. Cette diminution de contrôle permet en contrepartie de se rapprocher un peu plus des conditions naturelles. Ces différentes méthodes d'exposition permettent d'étudier la toxicité des NP à différents niveaux : sur espèce seule, sur espèce seule par la voie trophique, et à l'échelle de la communauté.

Les principaux effets relevés dans ces différentes études sont l'induction de systèmes de défense biochimiques (enzymes de stress oxydant, métallothionéines), une immuno-modulation, des impacts sur la croissance et la reproduction, des altérations du comportement et la mortalité des organismes, suivant l'espèce considérée. Les principaux impacts des NP sur les communautés microbiennes sont des modifications de composition et de diversité des communautés, une diminution de la biomasse et des modifications de l'activité microbienne.

Il y a actuellement un manque considérable d'études d'écotoxicologie intégrée. Au-delà de ce manque général, des lacunes plus spécifiques ont été mises en évidence. Ainsi, les études en milieu terrestre sont dramatiquement peu nombreuses, malgré la pertinence de ce compartiment pour l'étude des NP. Les études sur les organismes benthiques fouisseurs sont également trop peu nombreuses. Les lacunes observées concernent également les types de nanomatériaux étudiés : les nanomatériaux carbonés (NTC, C_{60}, graphène), ou provenant de l'altération de produits de consommation sont encore trop en marge. Pour finir, la toxicité des NP métalliques devrait systématiquement être comparée à la forme ionique du métal correspondant. De même, les effets observés par voie trophique devraient être interprétés à la lumière des effets observés par exposition directe.

Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review

Agathe Bour[1,2] , Florence Mouchet[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Laury Gauthier[1,2] and Eric Pinelli[1,2,*]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

HIGHLIGHTS

- Integrated ecotoxicity of NPs from organism to community level is reviewed
- Trophic chains allow determining the implication of trophic route in NP toxicity
- The use of microcosms and mesocosms allows studies at larger scale
- Data concerning NP fate and effects in environmental conditions are lacking

ABSTRACT

Despite the increasing production and use of nanoparticles (NPs), there is a lack of knowledge about their environmental fate and ecotoxicity. Studies in environmentally relevant conditions are necessary to better assess these parameters, but such studies are rather rare. The present work represents first time that studies on engineered NPs using environmentally relevant exposure methods have been reviewed. These exposure methods differ from standardized protocols and can be classified into three groups: experimental trophic chains that allow study of the trophic route, multi-species exposures under laboratory conditions that allow for complex but controlled exposure and outdoor exposures that are more similar to environmentally realistic conditions. The majority of studies of micro- or mesocosms have focused on NP partitioning and bioaccumulation. The other major parameter that has been studied is NP ecotoxicity, which has been assessed in single species, in single species *via* the trophic route, and at the community level. The induction of biochemical defense systems, immunomodulation, effects on growth and reproduction, behavioral alterations and mortality have been used as indicators of major toxicity, depending on the species studied. The major effects of NPs on both microbial and algal communities include modifications of community compositions and diversities, decreased biomass and changes in community activities.

1. Introduction

Recent decades have seen the emergence of manufactured nanoparticles (NPs), and the substantial advantages of NPs are now widely recognized. These nanoscale materials have been produced for decades, but industrial large-scale production began only in recent years. Piccinno *et al.* [1] estimated the worldwide production of four metal-oxide NPs and carbon nanotubes (CNTs) to be between 100 and 1000 t/year and up to 10,000 t/year for TiO_2 NPs. Nanoparticles are used in various fields, such as medicine, electronics and computers, the automotive industry, and in more than 1800 consumer products. This latter number has doubled in the last five years (http://www.nanotechproject.org). Several studies have modeled the potential release of NPs into the environment [2–5] and shown that NPs are expected to be found in the different environmental compartments (*i.e.* soil, water, air, and landfills).

Thus, it is of primary importance to elucidate the potential effects of nanomaterials on the health of ecosystems. The literature provides an increasing number of studies about the toxicities [6], environmental behaviors and ecotoxicities of NPs [7,8], particularly the most widely used NPs, such as TiO_2 [9] and silver NPs [10]. However, most of the ecotoxicity studies have been conducted under controlled laboratory conditions and with single-species exposures to determine whether NPs are toxic to a specific species or to understand the toxicity mechanisms. Although essential, these studies do not account for complex environmental parameters; e.g. such as complex matrices, real weather conditions, multi-species exposures, competition, predation and trophic relations. To better understand the actual effects of nanoparticles on ecosystems, recent studies have tended to reproduce more environmentally relevant exposure scenarios *via* the use of different exposure methods and systems.

The first goal of this review is to provide an overview of the methods and systems that are currently used in the field of ecotoxicology and enable integrated studies of engineered NP ecotoxicity in both aquatic and terrestrial environments. Data regarding laboratory exposures involving single species are not presented in the present review; rather, this review focuses on experiments related to multiple trophic levels, simultaneous exposures of multiple-species, and systems that allow for the study of complex biotic and/or abiotic factors. The second part of this review highlights the different types of information that such studies can provide and presents the main findings of these studies. Finally, the contribution of integrated ecotoxicity studies to the furthering of our knowledge about NP toxicity and remaining gaps and perspectives for future studies are discussed in the third part.

2. Organismal uptake and accumulation of NPs

Several notions concerning NP accumulation in organisms are used in the present review. The key terms are defined in this section.

Bioaccumulation refers to the accumulation of a contaminant in an organism, and all routes of exposure are considered. Bioaccumulation thus results from direct exposure (e.g., from the water, soil and air) and exposure from contaminated food. Bioaccumulation can be quantitatively determined with the bioaccumulation factor (BAF), which is defined as the ratio of a contaminant

concentration in an organism to the contaminant concentration in the environment. The BAF is typically determined in field experiments in which no distinction is made between uptake due to food and uptake due to direct exposure.

Bioconcentration refers to the accumulation of a contaminant in an organism solely from its environment (*i.e.* water, soil and air). In contrast to bioaccumulation, only direct contact is considered (e.g., skin contact, respiration), and contamination from food is excluded from assessments of bioconcentration. Thus, bioconcentration can only be determined in laboratory experiments. Bioconcentration can be quantitatively determined with the bioconcentration factor (BCF), which is defined as the ratio of a contaminant concentration in an organism to the contaminant concentration in the environment.

Biomagnification: The term biomagnification is used when the contaminant concentration in an organism is higher than the concentration in an organism of a lower trophic level. The biomagnification factor (BMF) is defined as the ratio of a contaminant concentration in a predator to the concentration in its prey. BMFs exceeding one generally indicate the occurrence of biomagnification in a trophic chain.

The *trophic transfer factor* (TTF) is the ratio of the concentration of a substance in an organism's tissue to the concentration of that substance in organism's food.

When bioaccumulation, bioconcentration, bioamplification and TTF are assessed in ecotoxicity studies, it is important to ensure that only the portion of the contaminant that has actually accumulated considered. Contaminants present on the surface but not absorbed inside the organism must not be taken into account. Similarly, if a contaminant ingested by an organism can be eliminated by simple excretion, it must not be taken into account despite its temporary presence in the digestive tract. Therefore, following the exposure period, organisms should be rinsed and allowed to depurate; *i.e.*, they should be placed in a non-contaminated environment long enough for complete excretion to occur so that only the absorbed contaminant is left in the organism.

Absorption by the organism can result from several processes. Contaminants can directly enter the cells (*e.g.*, intestinal, skin or gill cells) or can cross epithelial barriers through intercellular junctions without entering the cells to enter the blood circulation and then be distributed to the whole organism. In the particular case of NPs, contaminants can also be trapped inside the digestive tract and prevent normal exchanges (e.g., nutrient uptake), which can result in physiological impairments even though the contaminant is not absorbed. Therefore, it is relevant to consider these NPs as accumulated, given that they cannot be eliminated by simple excretion.

3. Exposure methods for integrated studies on nanoparticle ecotoxicity

The exposure systems that are reviewed here are presented in figure 1.

3.1 Exposure via *the trophic route under laboratory conditions*

Understanding the role of the trophic route is essential in ecotoxicology because organisms living in contaminated ecosystems are likely to feed on contaminated food. The ingestion of contaminants can have effects that differ

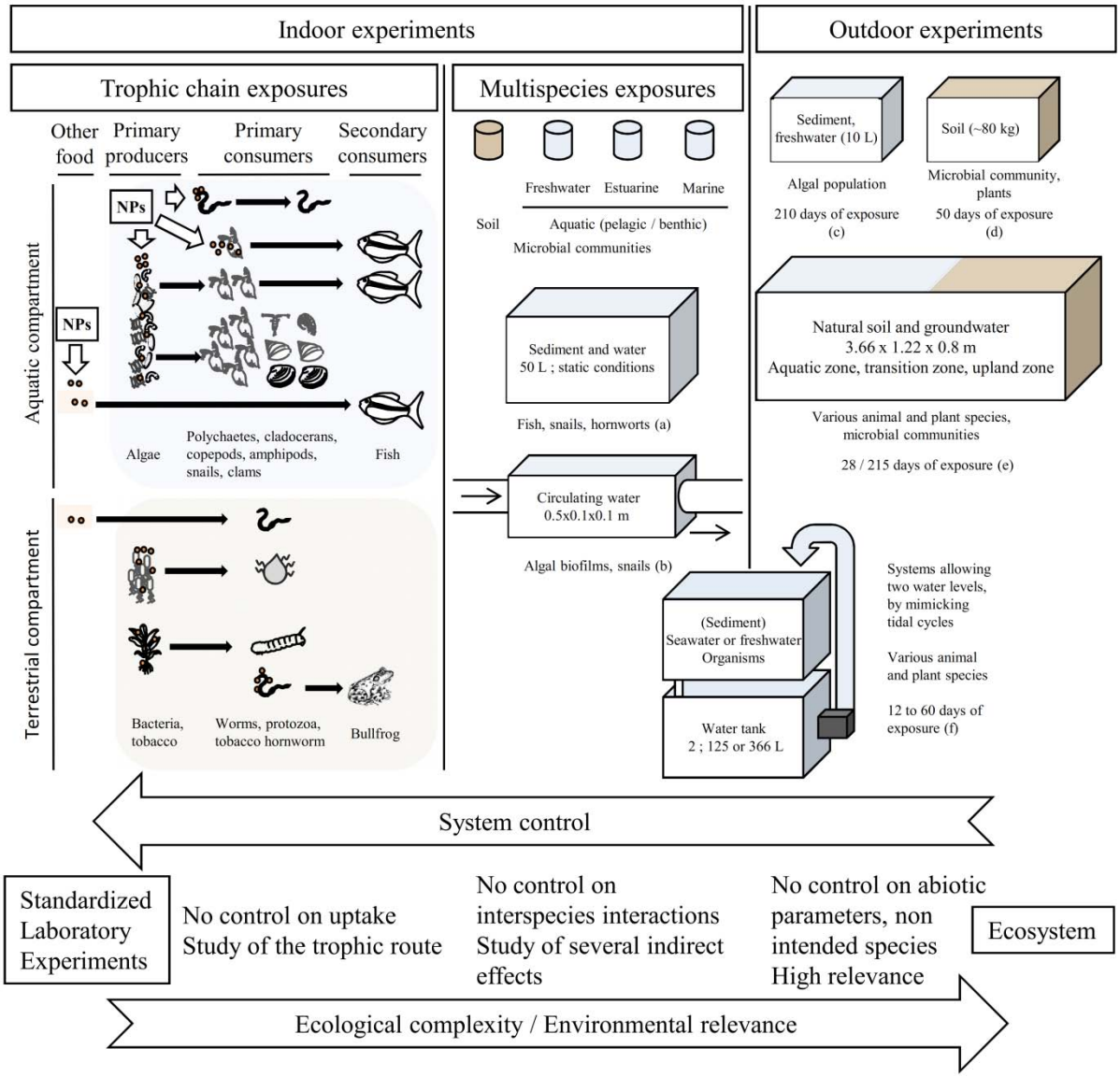


Figure 1: Schematic representation of the different methods used to study NPs in environmentally relevant conditions. Sizes of organisms and experimental devices are not representative and should not be compared. The number of primary consumers represented (left part) correspond to the number of studies presently reviewed. Systems mimicking tidal cycles can be outdoor or indoor systems. They are considered as "indoor systems" when used under greenhouse conditions. Ref.: (a) Zang *et al.*, 2012 [44]; (b) Kulacki *et al.,* 2012 [45]; (c) Pakrashi *et al.,* 2012 [53]; (d) Colman *et al.,* 2013 [52]; (e) Lowry *et al.*, 2012; Colman *et al.*, 2014 [54,55]; (f) Ferry *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2013; Cleveland *et al.*, 2012; Buffet *et al.*, 2014, 2013 [46,47,48,56,57].

from those observed following direct exposure to the environment because different physiological processes are involved. Additionally, some contaminants, such as PCBs, PAHs and methyl-mercury are known to bioaccumulate and to be transferred up the trophic chain [11]. The BAFs of metallic contaminants are also often 100 to 1000 times larger than the BCFs [12], which again demonstrate the importance of the trophic route in contaminant uptake. The study of the trophic route in ecotoxicology requires exposure methods that allow for contamination only *via* the ingestion of contaminated food. For this purpose, organisms at lower trophic levels are classically exposed to a contaminant and then given to a species of a higher trophic level as source of food. Inert food can also be contaminated rather that living organisms. These experiments allow the determination of NP accumulation in the food chain and the implication of the trophic route in their toxicity. Such experiments are also typically compared to direct exposures *via* the environment (water/soil). Another advantage of these experiments is the tight control of the quantities of food ingested and excreted which allows accurate calculations of TTFs.

A first approach consists of contaminating inert food. This allows better control of NP concentrations in ingested food compared to the contaminations in living organisms, which depend on the uptake and thus cannot be controlled. This method has been used to study the toxicity of TiO_2 NPs on the earthworm *Lumbricus terrestris* [13] and the fish species *Oncorhynchus mykiss* [14] and *D. rerio* [15].

In a second approach, living organisms are exposed to NPs and then fed to species of a higher trophic level. This method accounts for bioaccumulative capacity of the first species and therefore the actual potential for NPs to be transferred through the food chain. In one such study, the authors examined the toxicity mediated *via* the trophic route but in organisms at the same trophic level [16]. These authors exposed marine ragworms to CdS quantum dots (QDs) and fed with contaminated worm tissue to non-contaminated worms. However, the majority of studies utilize species of different trophic levels. Terrestrial trophic chains have been studied to investigate the trophic transfer of gold NPs from tobacco (*Nicotiana Tabacum* L. cv *Xanthi*) to the tobacco hornworm *Manduca sexta* [17] and from the earthworm *Eisenia fetida* to the bullfrog *Rana catesbeina* [18]. Holbrook *et al.* [19] studied the transfer of QDs from the bacteria *Escherichia coli* to the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Other studies have involved aquatic trophic chains. The majority of these studies use algae as the first species, because they are the primary producers at the base of the food web. The algae are then exposed to NPs in culture medium over a short period, rinsed to eliminate the free NPs, and then fed to primary consumers for a variable period (in a single dose or chronically of up to several weeks). Various primary consumers have been studied; e.g., clams [20,21], daphnids [22–25], snails [26,27], copepods [28] and amphipods [29]. Rather than using algae and primary consumers, Zhu *et al.*[30] studied the transfer of TiO_2 NPs from primary (daphnids) to secondary (fish) consumers.

Finally, only two studies have investigated the toxicity of NPs through trophic chains across three levels. Cedervall *et al.* [31] studied the toxicity of polystyrene NPs on fish through an “algae – daphnids – fish” food chain. Algal cultures of *Scenedesmus sp.* were first exposed to NPs (0.01% w/v) for 24h and then fed to the cladoceran *Daphnia magna* for another 24h. Next, daphnids were fed to *Danio rerio*

every day for 39 days. A similar method was used to study the effects of nanomaterial residue from aged TiO_2 on secondary consumers [15]; a culture of *Pseudokirchneriella subcapitata* was contaminated (0.01 and 1 mg/L) for 96h, fed to *D. magna* neonates for 48h, and the daphnids were then fed to juvenile *D. rerio* twice a day for 7 days.

3.2 Indoor multi-species exposure

Simultaneous exposure of several species might lead to complex toxicity responses due to complex interaction that might not occur during single-species experiments. Competition for food or nutrients can be considered [32] as can the production of toxins that might affect other species [33] or the establishment of a "defense system" at the community level in algal or microbial communities [34]. Moreover, in contrast to field studies, such experiments under laboratory conditions allow for the control of abiotic factors.

The methods and systems used for multi-species exposures depend on species. Experiments on microbial communities are typically performed in small containers or beakers that contain standard artificial soils [35], natural soils collected from the field [6,36–39], streamwater [40,41], raw seawater [42] or estuarine sediments [43]. The use of standard artificial soils allows experiments to be performed in the same conditions and thus allows for the comparison of results between studies. However, it must be kept in mind that standard soils are not representative of every natural soil, and soil composition greatly influences the toxicity of NPs as demonstrated by Frenk *et al.* [36].

Exposures are also carried out in large containers when the species require substantial volumes of media. Zhang *et al.* [44] studied the partitioning of ceria NPs in the presence of plants (*Ceratophyllum demersum L.*), fish (*Pseudorasbora parva*) and snails (*Bellamya purificata*) in large glass tanks (50 L).

Kulacki *et al.* [45] used more complex systems to study the responses and influences of snails (*Physa acuta*) and different algae to TiO_2 NPs. Algal biofilms were grown in "recirculating flumes" that enabled spatial heterogeneous water flow, which is known to allow algal species to coexist in natural streams [45]. The lighting of the systems was also controlled, and the full spectrum of the light was measured.

Other systems have been designed to mimic tidal cycles (figure 1). Although experimental designs vary slightly from one study to another (e.g., in terms of size, time of exposure, *etc.*), these studies are based on the same general concept. The systems are composed of two tanks that are connected to each other. One of the tanks contains the organisms and mimics tidal streams, the second tank serves as a tidal reservoir, and a pump delivers water to the first tank during the "high tide" cycle. These systems have been used in outdoor conditions (see part 3.3) and greenhouse conditions and are thus considered to be indoor experiments, as further discussed. Ferry *et al.* [46] used mesocosms that modeled a tidal marsh creek for the first time to study the fate of NPs. These authors exposed the plant *Spartina alterniflora*, the clam *Mercenaria mercenaria*, the mudsnail *Ilyanassa obsoleta*, the sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus*, the grass shrimp *Palaemonetes pugio* and microbial biofilm to gold nanorods for 12 days and observed the distributions of the rods in the different environmental compartments. Another study was conducted with smaller paddy microcosms to assess the distributions of TiO_2 NPs and nanotubes between the

compartments and organisms [47]. Mud snails, ricefish, and water dropwort were intentionally introduced into the microcosms. The authors underlined that unintentional species were also naturally introduced during the experiment and made the system more complex. Outdoor mesocosms equipped with a tidal cycle system have also been used to investigate the fate of silver nanomaterials that are leached from consumer products [48]. In this study, a tidal cycle was simulated and monitored for 60 days. The mesocosms contain biofilms, mud snails, grass shrimp and juvenile clams.

These different exposure methods do not intend to reproduce natural ecosystems but have many advantages nonetheless. These advantages include the relative ease of conducting and sampling, the possibility of replicating exposures, and the control of abiotic factors.

3.3 Outdoor exposure systems for studies under more realistic conditions

Methods for the detection and quantification of NPs in the environment require further improvement, or development for routine application. Consequently, data from field studies are very scarce [49]. Kaegi *et al.* [50] reported TiO_2 NP discharge from façade paints in natural weather conditions and the release of these NPs in natural receiving waters. These authors measured between 8 and 16 µg of Ti/L in urban runoff. Similarly, Kiser *et al.* [51] measured between 5 and 15 µg of nanoparticulate Ti/L in sewage effluent in a wastewater treatment plant.

To circumvent the difficulty of detecting and measuring NPs in the environment, outdoor studies involving the intentional contamination of specific exposure systems have been conducted. These outdoor facilities have different purposes and designs but similar advantages and limitations. Such studies can often be performed at larger scales compared to laboratories studies, and specific designs and real weather/climate conditions make these studies more realistic. However, these studies can be more difficult to conduct and offer less control, particularly in terms of abiotic factors, which might lead to low repeatability. The time of exposure in mesocosm studies vary from a few days to several months. In the latter cases, the studies are not easy to perform and are too long to be considered for standardization. However, such studies are well adapted for research purposes.

Outdoor experiments can be conducted in simple containers to study terrestrial or aquatic systems. Colman *et al.* [52] studied the long-term effects of Ag NPs present in biosolids on terrestrial mesocosms comprised of plants and micro-organisms. The mesocosms were filled with collected natural soil, planted with five plant species and allowed to establish for two months. The mesocosms were then contaminated with Ag NPs (at a final concentration of 0.14 mg of Ag/ kg of soil) or Ag as $AgNO_3$ (at a final concentration of 0.54 mg of Ag/ kg of soil), and the analyses were performed for 50 days. Similarly, Pakrashi *et al.* [53] studied the fate of Al_2O_3 NPs and its effects impacts on algal communities over 7 months. The exposure was realized in 10L capacity tanks that contained natural soil and water that was allowed to acclimate for 6 weeks prior to contamination (at NP concentrations of 50, 500 and 1000 µg/L).

More complex systems have also been used to study the fate of NPs in the environment. The mesocosms used in long-term studies of the fate and effects impacts of Ag NPs [54,55] have exhibited particular feature of having both terrestrial and aquatic compartments and permanently flooded portions (aquatic zones), periodically

immersed portions (transition zones), and rarely immersed portions (upland zones). In the first such study [54], the mesocosms contained four plant species and other non-intended organisms (mosquitofish, chironomids, damselflies and dragonflies) and were contaminated with polyvinylpyrrolidone (PVP)-coated Ag NPs at 25 mg/L. The NP distribution was determined 18 months later. In the most recent study [55], the mesocosms contained three plant species, and algal and bacterial communities from natural wetland sampling were introduced. Ionic Ag (as $AgNO_3$) and PVP- or gum arabic (GA)- coated Ag NPs were introduced into the water column to achieve a final concentration of 2.5 mg/L. NP partitioning and the toxicity to the plants and microbial communities were studied after 30 days of exposure.

Finally, mesocosms mimicking tidal cycles have been used to assess the toxicity of silver and CuO NPs on clams and worms [56,57]. In these studies, the mesocosms are composed of two tanks, one of which contains natural sediment and the organisms, and the other core serves as a reservoir. Natural seawater is added to the tanks and NPs (or equivalent soluble metal) are injected at the water surface into the tank containing the experimental cores.

4. Studied endpoints and main results

The studied endpoints and results are summarized in table 1.

4.1 Nanoparticle partitioning and biogeochemical analyses

In most studies that have used complex exposure systems, the authors have studied NP partitioning; *i.e.* the distributions of the NPs in the different environmental compartments (e.g., water, sediment and organisms). Some studies have also focused on the bioaccumulation or bioconcentration of NPs to evaluate their potential of accumulation in organisms.

Most NPs have low solubilities, are quickly removed from the water column and are primarily found in the sediment or organisms. Lowry *et al.* [54] observed that the majority of PVP-coated Ag NPs injected into the water column sedimented over the first 8 days and were found in the subaquatic sediment in sulfide (Ag_2S) or Ag-sulfhydryl compound forms. NPs also accumulated in fish and chironomids, and a fraction was detected in plants. No NPs were detected in the water column after 18 months. Similarly, Colman *et al.* [55] observed a rapid and substantial decrease in Ag NPs in the water column. Zhang *et al.* [44] observed that ceria NPs were quickly removed from water and partitioned between the organisms and sediment, the latter of which was the major sink (more than 75% of total NPs). The same patterns were also observed for Au nanorods [46], CeO_2, SnO_2, Fe_3O_4 NPs [39] and TiO_2 NPs [47], which were primarily found in lower compartments; *i.e.*, the sediment and biofilms. In this latter study, TiO_2 NPs were also detected in the primary consumers: filter-feeders (clams) and biofilm grazers (snails).

Three studies have compared the metal leaching from NPs and equivalent metallic suspensions, which used were as references. Silver NPs were found to release the total amount of initial silver (as Ag^+) within 21 days [56], while no labile copper was released from CuO NPs [57]. Mesocosms have also been used to study the fate of silver NPs that leach from consumer products (CPs), specifically a black dress sock and a stuffed toy bear that were advertised as containing silver-coated nylon fibers and Ag NPs respectively. The fate of the silver NPs that leached from CPs was

Table 1: Studied endpoints and main results.

Exposure method / Environmentally relevant parameters	Species	Material	Studied endpoints	Main results	Ref.
Contaminated commercial food Use of aged NM	Earthworm *Lumbricus terrestris*	Aged TiO_2 nanocomposites (1 – 100 mg/L)	Bioaccumulation NP localization in the organism Mortality Apoptosis	No bioaccumulation NPs do not cross biological barriers No mortality Increased apoptosis frequency (waterborne exposure only)	[13]
Contaminated commercial food	Fish *Oncorhynchus mykiss*	TiO_2 NPs (21 nm rutile 25%, anatase 75% 10 – 100 mg/kg)	NP localization in the organism Weight, growth Nutritional performance Blood parameters Enzymatic activities (ATPase, GSH) Lipid metabolism (TBARS)	Accumulation in organs (spleen, brain, gills, intestines, liver) ATPase inhibition (50%, brain) TBARS decrease (50%, gills, intestine) Effects on GSH activity (liver) (effects at 10 and 100 mg/kg)	[14]
Trophic chain, Contaminated commercial food Use of aged NM	Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* Crustacean *Daphnia magna* Fish *Danio rerio*	Aged TiO_2 NPs (rutile 0.01 – 1 mg/L)	NP accumulation in the organism Mortality, growth, energy reserves Digestive and oxidative stress enzymes activities	Alteration of digestive physiology Slight toxicity after direct exposure No bioaccumulation, no biomagnification (effects at 0.01 and 1 mg/L)	[15]

Contaminated food Low concentrations	Polychaete *Hediste diversicolor*	CdS QDs (10 µg/L)	NP bioaccumulation Behavior Oxidative stress enzymes activities	Bioconcentration only Impairment of body undulations CAT, CSP activities induction	[16]
Trophic chain (terrestrial)	Plant *Nicotiana tabacum* Tobacco hornworm *Manduca sexta*	Au NPs (tannate-capped 5; 10; 15 nm 100 mg/L)	NP transfer	Transfer Biomagnification	[17]
Trophic chain (terrestrial)	Redworm *Eisenia fetida* Bullfrog *Rana catesbeina*	Au NPs (tannate-capped 12 nm 200 mg/kg)	NP transfer and accumulation	Accumulation (liver, kidney, spleen, muscle, stomach, intestine) Biomagnification	[18]
Trophic chain	Bacteria *Escherichia coli* Protozoa *Tetrahymena pyriformis*	CdSe/ZnS QDs ($1.63 – 2.58 \times 10^{12}$ QDs/ml)	NP transfer	Transfer through dietary uptake No biomagnification	[19]
Trophic chain Low concentrations	Diatoms *Nitzschia* sp Clam *Scrobicularia plana*	Ag NPs (40 – 45 nm 10 µg/L)	NP bioaccumulation Enzymatic activities, TBARS Behavior	Bioconcentration (>bioaccumulation) Oxidative stress (CAT, SOD, GST) Feeding behavior impacted	[20]
Trophic chain	Algae *Scenedesmus subspicatus*	Au NPs (10 nm $1.6 \times 10^3 – 1.6 \times 10^3$ NP/cell)	NP localization in the organism Tissues structural disturbance	NPs penetrate gills and digestive epithelia, no structural disturbance Modification of genetic expression	[21]

	Clam *Corbicula fluminea*		Genetic expression		
Trophic chain Low concentrations	Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* Crustacean *Ceriodaphnia dubia*	QDs (11.1 – 50 µg/L)	NP transfer	Transfer	[22]
Trophic chain Low concentrations	Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* Crustacean *Daphnia magna*	Aged TiO2 from sunscreen (rutile 0.01 – 10 mg/L)	Survival, reproduction, growth	Growth and reproduction impacted (effects from 0.01 mg/L)	[23]
Trophic chain Low concentrations	Algae *Chlamydomonas reinhardtii* Crustacean *Daphnia magna*	Ag NPs (carbonate coated 20 nm 2-500 µg/L)	NP accumulation biokinetic	Efficient assimilation, concentration dependent uptake	[24]
Trophic chain Low concentrations	Algae *Chlamydomonas reinhardtii* Crustacean *Daphnia magna*	Ag NPs (polymer coated 15 nm 20 – 100 µg/L)	NP bioaccumulation Mortality, feeding rate	Decrease in feeding rate, no mortality Bioaccumulation in daphnids (effects at 100 µg/L)	[25]
Trophic chain	Diatom *Nitzschia palea*	ZnO NPs (Enriched ^{67}Zn 20 – 70 nm)	Digestion	Digestion affected	[26]

	Snail *Lymnaea stagnalis*				
Trophic chain	Diatom *Nitzschia palea* Snail *Lymnaea stagnalis*	Ag NPs (citrate capped 17 nm 7-250 nmoles/g)	NP bioaccumulation dynamics Digestion	Efficient assimilation, slow loss Damaged digestion	[27]
Trophic chain Low concentrations	Diatom *Thalassiosira weissflogii* Copepod *Acartia. tonsa*	ZnO NPs (10 – 1000 µg/L)	Survival, reproduction	Decrease in survival and reproduction (effects at 263 µg/L)	[28]
Trophic chain	Microalgae *Isochrysis galbana* Amphipod *Leptocheirus plumulosus*	CdSe/ZnS QDs 3.6 mg/L	NP bioaccumulation Mortality	Bioconcentration > bioaccumulation Mortality after dietary exposure only	[29]
Trophic chain	Crustacean *Daphnia magna* Fish *Danio rerio*	TiO_2 NPs (rutile 20%, anatase 80% 21 nm 0.1 – 1 mg/L)	NP bioaccumulation	Bioaccumulation > bioconcentration No biomagnification	[30]
Trophic chain	Algae *Scenedesmus* sp Crustacean *Daphnia magna*	Polystyrene NPs (24 nm 0.01% w/v)	Fat metabolism Behavior	Fat metabolism and behavior affected	[31]

	Fish *Danio rerio*				
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural soil Long term exposure	Soil microbial community	Cu, Ag and SiO_2 NPs (20 nm 20 nm 15 nm 0.066% w/w)	Microbial community diversity and physiological profiles	Impacts on bacterial community	[6]
Laboratory multi-species exposure Community scale Medium term exposure	Soil microbial community	Polymers of CMC, HM-CMC, HM-PEG Vesicles of SDS/DDAB and Mo/NaO TiO_2 and $TiSiO_4$ NPs CdSe/ZnS QDs Au nanorods Fe/Co magnetic fluid	Structural diversity of microbial community	Structural diversity affected by Au nanorods, TiO_2 NPs, CMC, HM-CMC, HM-PEG, and SDS/DDAB.	[34]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural soils	Soil microbial community	CuO and Fe_3O_4 NPs (50 nm 0.1 – 1% w/w)	Bacterial community activity, composition and size depending on soil type	Changes in community activity, composition and size (effects depend on soil composition)	[35]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural soil Long term exposure	Soil microbial community	TiO_2 NPs (rutile 19%, anatase 81% 20 – 30 nm 20 mg/g)	Bacterial community composition and diversity	Alteration of community composition and diversity	[36]

Laboratory multi-species exposure Community scale Natural soil Medium term exposure	Soil microbial community	MWNTs (10 - 10 000 mg/kg)	Soil metabolic functioning Microbial community composition	No effects on soil respiration No effects on enzymatic activities Modification of microbial community composition (effects at 10 000 mg/kg)	[37]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural soil Medium term exposure	Soil microbial community	CeO_2, Fe_3O_4 and SnO_2 NPs (50 – 105 nm 20 – 30 nm 61 nm 10 – 100 mg/kg)	Microbial biomass	Microbial stress / changes in the bacterial/fungal biomass ratio, predominance of microbial communities (effects at 10 and 100 mg/kg)	[38]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural streamwater	Freshwater microbial communities Alder leaves	CuO and Ag NPs (<50nm ; <100nm 100 – 500 mg/L 100 – 300 mg/L)	Fungal sporulation rates Microbial biomass Microbial community diversity Leaf mass loss (decomposition)	Decrease in microbial biomass (from 100 mg/L for Ag NPs and 200 mg/L for CuO NPs) Decrease in in communities richness (from 100 mg/L for both NP) Decrease in litter decomposition (from 100 mg/L)	[40]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural streamwater and sediment	Freswater bacterial communities	Ag NPs (PVP-coated 21 nm 0.75 – 75 mg/L of water 0.375 – 1.25 mg/kg of sediment)	Microbial respiration and functional responses (pelagic communities) Microbial community biomass and composition, respiration and enzymatic activity (benthic communities)	Decrease in microbial respiration (for pelagic communities, at 75 mg/L) No impact on benthic communities except a slight decrease in sulfate concentrations (at 1.25 mg/kg)	[41]

Laboratory multi-species exposure Community scale Natural seawater Low concentrations Medium term exposure	Marine microbial community	Ag NPs Polymer coated (20 nm 5 - 50 µg/L)	Bacterial diversity Overall community abundance	Lag phase increase Community richness decrease (selection of a fraction of the initial community) (effects at 5 and 50 µg/L)	[42]
Laboratory multi-species exposure Community scale Natural estuarine sediment Low concentrations	Estuarine bacterial communities	Ag NPs (58.6 nm)	Prokaryotic abundance Bacterial communities diversity	No effects on abundance or communities diversity	[43]
Laboratory multi-species exposure Natural sediment	Hornwort *Ceratophyllum demersum L.* Fish *Pseudorasbora parva* Snail *Bellamya purificata*	Radioactive ceria NPs (1.2 mg/L)	NP partitioning	75% of NP found in the sediment 0.095% of NP found in the water Quick adsorption and strong desorption in organisms	[44]
Laboratory multi-species exposure, in recirculating stream channels Medium term exposure	Algae *Synedra ulna* *Scenedesmus quadricauda* *Stigeoclonium tenue* Snail *Physa acuta*	TiO_2 NPs (rutile 18%, anatase 82% 27 nm 0.1 - 1 mg/L)	NP accumulation Algal growth Snails grazing rate	NP accumulation on the biofilm No effects on algal growth No effects on grazing rate	[45]

System mimicking tidal cycles Natural seawater and sediment	Biofilms Snail *Ilyanassa obsoleta* Crustacean *Palaemonetes pugio* Clam *Mercenaria mercenaria* *Cordgrass* *Spartina alterniflora*	Au nanorods (65 x 15 nm 7.08 x10^8 NP/mL)	NP partitioning NP bioconcentration	25% of NP found in the sediment Major accumulation in biofilm (60%) Accumulation in clams (5%) Low accumulation in other species	[46]
System mimicking tidal cycles Natural sediment and freshwater	Algae *Spirogyra* spp. Snail *Cipangopaludina chinensis* Fish *Oryzias sinensis* Dropwort *Oenanthe javanica*	TiO_2 NPs and nanotubes (1818.2 µg/L)	NP bioaccumulation	Prey/predator transfer (elevated BAF) Highest accumulation in the biofilm Absorption onto roots and invertebrates	[47]

System mimicking tidal cycles Use of consumer products Natural sediment and seawater Medium time exposure	Biofilms Snail *Ilyanassa obsoleta* Crustacean *Palaemonetes pugio* Clam *Mercenaria mercenaria* *Cordgrass* *Spartina alterniflora*	Ag NPs (100 g) Ag leaching from consumer products	Ag leaching from CPs NP bioconcentration NP trophic transfer	NP bioconcentration in snail, clam and biofilm Trophic transfer from biofilm to snail, clam and shrimp Quick removal of Ag from water column Important leaching from CPs (82 to 99% in 60 days)	[48]
Outdoor systems Community scale Natural soil Medium term exposure	Bacterial community Plant species *Carex lurida* *Juncus effusus* *Lobelia cardinalis* *Microstegium vimineum* *Panicum virgatum*	Ag NPs (PVP coated 21 nm 0.14 mg/kg)	NP partitioning Gas flux in soil Plant biomass and photosynthesis Bacterial community abundance, functioning and composition	NPs uptake by plants Increase in N_2O flux in soil Species-specific impacts on plants Changes in bacterial community composition, biomass and enzymatic activities	[52]
Outdoor systems Community scale Natural freshwater and sediment Low concentrations Long term exposure	Algal community	Al_2O_3 NPs (50 – 1000 µg/L)	NP physico-chemical temporal changes Algae viability and chlorophyll content	Quick decrease in algal viability (~25%) with long-term recovering (7 months) Rapid NP aggregation, decrease in specific surface area and increase in solubilization (effects at 1 mg/L)	[53]

Outdoor systems Both terrestrial and aquatic compartments Natural soil and groundwater Long term exposure Community scale	Plant species *Juncus effusus* *Carex lurida* *Panicum virgatum* *Lobelia cardinalis* Fish *Gambusia holbrooki* Non-intended organisms (damsel flies, dragonflies, chironomids)	Ag NPs (PVP-coated 10 nm 25 mg/L)	NP long-term behavior	Quick sedimentation of NPs (>70% NPs found in sediment, predominantly as Ag_2S) Important accumulation in fish and chironomid	[54]
Outdoor systems Both terrestrial and aquatic compartments Natural soil and groundwater Long term exposure	Plant species *Egeria densa* *Potamogeton diversifolius* *Landoltia punctata* Algae Zooplankton Non-intended organisms	Ag NPs (PVP or GA coating 12 nm ; ~50 nm 2.5 mg/L)	NP partitioning Toxicity to plants Bacteria and zooplankton abundance Physico-chemical monitoring (dissolved organic carbon, O_2, CO_2, Cl^-, SO_4^{2-}, Br^-, NO_3^-, NH_4^+, total dissolved nitrogen)	Important accumulation of NPs in plants Toxicity on plants Changes in microbial abundance Changes in physic-chemical parameters Effects at the ecosystem level	[55]
Outdoor systems Mimic tidal cycles Natural sediment and seawater Low concentrations	Clam *Scrobicularia plana* Polychaete *Hediste. diversicolor*	Ag NPs (maltose-capped 40 – 45 nm 10 µg/L)	Condition index Enzymatic activities (MT, SOD, LDH, GST, CAT, AChE, AP, PO) Lipid peroxidation (TBARS) Immune responses Genotoxicity Behavior	Induction of defense systems against oxidative stress Detoxification, apoptosis, genotoxicity and immunomodulation	[56]

Outdoor systems Mimic tidal cycles Natural sediment and seawater Low concentrations	Clam *Scrobicularia plana* Polychaete *Hediste. diversicolor*	CuO NPs (10 – 100 nm 10 μg/L)	Condition index Enzymatic activities (MT, SOD, LDH, GST, CAT) Lipid peroxidation (TBARS) Immune responses Genotoxicity Behavior	Increase in MT, GST and CAT activities Decrease in TBARS Genotoxicity Decrease in feeding rate and burrowing speed	[57]

also compared to the fates of Ag NPs and ionic silver (Ag^+) spiked into the water column [48]. The authors found that 82 to 99% of the total silver initial load in the CPs was released within 60 days. Moreover, while soluble Ag^+ was completely removed from water column with a few hours, the silver NPs continued to leach from the CPs for at least 30 days. In this experiment, silver was found to accumulate in snails and biofilms. These results underline the importance of exposure duration in observations of the processes that might occur in natural environments.

Nanoparticles have been shown to bioaccumulate in various organisms. Studies have shown that, following exposure, silver NPs are found in plants [52], snails [27], worms and clams [20,56]. Cleveland *et al.* [48] also observed Ag NP bioaccumulation in shrimps, clams, snails and plants, but the accumulation was greater in the clams and snails (high TTFs). Significant accumulation was also observed in biofilms. McTeer *et al.* [25] observed Ag bioaccumulation in *D. magna* following dietary exposure to both Ag NPs and $AgNO_3$, and similar accumulations resulted from exposure to these two forms of Ag. Zhao and Wang [24] also observed assimilation efficiencies of 22 to 45% for Ag from Ag NPs in this organism and reduced assimilation of Ag from $AgNO_3$. Bioaccumulation of TiO_2 NPs has also been observed in different species. In their study, Yeo and Nam [47] found significant BAFs in nematodes and snails, which highlighted that TiO_2 NPs and nanotubes are largely transferred from prey to consumer. TiO_2 NP uptake has been observed in fish (*D. rerio*) *via* the ingestion of contaminated daphnids, although BAF calculations following 7 days of depuration indicated that no biomagnification had occurred [30]. In contrast, Fouqueray *et al.* [15] showed that, while bioaccumulation of TiO_2 NPs from algae to daphnids occurred, no accumulation occurred from daphnids to *D. rerio* after the depuration time. Kulacki *et al.* [45] showed that biofilm composition influenced the TiO_2 NP bioaccumulation in snails because the algae palatability varied depending on the species, and TiO_2 accumulation also varied across different algal species. In contrast, Lapied *et al.* [13] found that *L. terrestris* did not bioaccumulate TiO_2 when exposed to contaminated food, soil or water. Bioaccumulation of QDs occurred in daphnids [22], rotifer species [19], amphipods [29] and worms [16]. Au NPs have been shown to bioaccumulate in terrestrial organisms; *i.e.*, tobacco hornworms fed on contaminated tobacco leaves [17] and bullfrogs fed on contaminated earthworms [18]. Au nanorods are also highly accumulated in aquatic organisms. Ferry *et al.* [46] observed that 60% of the initial amount of Au was found in the biofilm, which only represented 0.5% of the total biomass, and 5% of the Au was detected in clams. Finally, CuO NPs have been shown to bioaccumulate in clams and worms [20], and ceria NPs have been found in plants and snails, albeit in low quantities [44].

Furthermore, all of the studies that have compared NP accumulation *via* the trophic route and accumulation *via* water only have found that NP accumulation in organisms *via* the trophic route is greater [17,20,27,48], which highlights the importance of this route of exposure. However, QDs seem to be an exception to this rule; Jackson *et al.* [29] observed greater accumulation in amphipods exposed *via* water than *via* contaminated algae, and Buffet *et al.* [16] found accumulation in worms only *via* the water route.

Despite the accumulations that have been observed in many species and with different

NPs, no biomagnification has been observed based on BMF calculations. This result indicates that only a small fraction of NPs could be transferred up the trophic chain. The findings of Fouqueray *et al.* [15] are in agreement with this hypothesis. These authors studied the transfer of TiO_2 NPs in a 3-link food chain and found that primary consumers accumulated NPs from primary producers, but no NPs were detected in the secondary consumers after the depuration time, which indicates that TiO_2 NPs did not reach the top of the trophic chain. Again, one study stands out as an exception to these general findings. Biomagnification was observed in a food chain composed of tobacco and tobacco hornworms [17], in which the BMF reached 11.6. This study focused on a terrestrial food chain, whereas the majority of studies have been realized in aquatic food chains; however it cannot be concluded that this difference explains the observed biomagnification. Generally, the data are too scarce to draw any conclusions, which highlights the urgent need for further ecotoxicity studies in trophic chains.

4.2 Toxicity of nanoparticles

4.2.1 Assessment of toxicity in single species

Buffet and co-workers assessed the toxicities of Ag NPs [56] and CuO NPs [57] at 10 µg/L on worms (*H. diversicolor*) and clams (*S. plana*) that were exposed in mesocosms that modeled tidal cycles. These authors observed an induction of genotoxicity (DNA damage observed with the comet assay) and oxidative stress defense system responses in both organisms and for both NPs. The oxidative stress markers that were affected by CuO NPs were glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT), and Ag NPs affected the activities of GST, CAT, superoxide dismutase (SOD) and caspase (CSP-3 like). Moreover, CuO NPs altered the burrowing behavior of the worms. Ag NPs also induced apoptosis and immunoregulation in both species.

In complex systems, such as mesocosms, in which species are simultaneously exposed, indirect toxicity is a possibility. Indeed, even if the species have no direct interactions, such as prey-predator links, it can be hypothesized that one species might produce substances in response to NP exposure that are potentially repellent or toxic to another species. Degradation of organic tissues can also lead to modifications of the media that result in toxicity in other species [55]. In such cases, it becomes extremely difficult to determine whether the observed toxicity is a direct consequence of NP exposure or case of indirect toxicity.

4.2.2 Toxicity via the trophic route

The role of the trophic route in NP toxicity can be assessed only with experiments performed on reconstructed trophic chains (*cf.* part 3.1) because other exposure methods allow for contamination *via* the exposure medium. The authors of the majority of such studies have compared observed toxicities to the direct toxicities of NPs and the toxicities of equivalent metallic suspensions (*e.g.* Ag^+, ionic copper and ionic cadmium) as reference substances to confirm or invalidate the occurrence of a "nano effect".

Jackson *et al.* [29] observed significant mortality among amphipods fed on algae contaminated with CdSe/ZnS QDs at a concentration equivalent to 3.6 mg of Cd per liter of culture medium. Toxicity have also been observed in earthworms fed on food contaminated with CdS QDs at concentrations equivalent to 10 µg of Cd per liter [16]; the induction of oxidative stress

enzymes was observed as was an increase in caspase activity and an alteration of body undulations. TiO_2 NPs have been shown to be toxic to daphnids that have ingested contaminated algae [23]. In this study, the tested TiO_2 NPs were composed of a rutile core coated with $Al(OH)_3$, and algal contamination was performed under continuous illumination at 2500 lux. Minor effects on mortality, growth and reproduction were observed in the adults, and significant mortality was observed in the neonates (the foods were contaminated at 0.01 mg/L, from 0.01 to 10 mg/L and from 0.1 to 10 mg/L, respectively). TiO_2 NPs (approximately 25% rutile and 75% anatase) also affect rainbow trout when spread on their food at 10 or 100 mg/kg of food [14]. The authors of this study observed significant inhibition of brain ATPase and decreases in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the gills and intestines. Glutathione (GSH) activity in the gills was also impacted. Ingested ZnO NPs alter the digestion of snails [26] and decrease the reproduction and survival of copepods (at 99 µg/L and 263 µg/L, respectively) [28]. The oxidative stress enzymes (CAT, GST and SOD) of clams have also been shown to be affected by exposure to Ag NPs *via* the ingestion of diatoms contaminated at 10 µg of Ag NPs /L. The feeding rates of such clams are also affected. The authors who reported these findings underlined that the toxicity was primarily due to labile silver [20]. A reduction in the feeding rate of *D. magna* has also been observed following dietary exposure to Ag NPs (100 µg/L in algal culture medium) [25]. Cedervall *et al.* [31] studied a three-species trophic chain (algae – daphnids – fish) and found that polystyrene NPs (at 0.01% w/v in algal culture medium) induced significant behavioral alteration and metabolic perturbations in *D. rerio*. Finally, Renault *et al.* [21] observed that, following trophic exposure ($1.6x10^4$ and $1.6x10^5$ NP/algal cell), Au NPs can penetrate the branchial and digestive epithelia of *C. fluminea* and induce increases in metallothioneins (MTs) and SOD activity at high concentrations, which lead to modifications of the expressions of six genes. The studies cited above show that NPs are toxic *via* the trophic route; furthermore, some of these authors observed that the ingestion of NPs induces greater toxicity than does direct exposure [20,23,29].

However, these results have to be qualified. No toxicity was observed in *C. dubia* exposed to QDs (up to 110 ppb) *via* contaminated algae [22]. The ingestion of TiO_2 NP-contaminated food (0.01 and 1 mg/L, rutile core coated with $Al(OH)_3$, algal contamination performed under continuous illumination at 2500 lux) also did not affect *D. rerio*, although slight toxicity was observed after direct exposure [15], and Lapied *et al.* [13] showed that TiO_2 NPs (up to 100 mg/kg of food or soil) did not induce toxicity in *L. terrestris via* the trophic route, but waterborne exposure increased the frequency of apoptosis. Furthermore, although Buffet *et al.* [16] showed that QD exposure *via* food induced toxicity in *H. diversicolor*, these authors also observed the toxicity mediated by water exposure was greater.

These contrasting results again highlight the lack of information about NP toxicity that is mediated *via* the trophic route. Various types of NPs have been studied, but an insufficient number of studies have been performed on each NP to draw conclusions. Finally, the results have not been systematically compared to direct toxicity, which is a necessary step toward completely understanding the role of the trophic route in NP toxicity.

4.2.3 Toxicity at the community level

Studies at the community level have primarily been realized in microbial or algal communities. The present review does not include studies of single microbial species [58], or studies realized in wastewaters or activated sludge. Indeed, these studies are performed to order to evaluate treatment processes, and this review focuses on the effects of NPs in the context of integrated ecotoxicology. Studies of wastewaters and activated sludge have recently been reviewed [59,60].

Doiron *et al.* [42] studied the effects of polymer-coated Ag NPs on marine microbial communities. These authors observed an increase in the lag phase that was suggestive of an adaptation period and a decrease in community richness due to NP exposure (5 and 50 µg/L) that suggested that a fraction of the initial community was selected.

Colman *et al.* [41] observed a significant decrease in microbial respiration in streamwater microbial community following exposure to 75 mg of Ag NPs/L. In contrast, no effects were observed on bacterial communities from sediment exposed to Ag NPs at concentrations of 0.37 to 1.25 mg/kg of sediment.

The toxicities of Ag NPs on bacterial communities from estuarine sediments have also been studied [43]. After 20 days of exposure at 25 and 1000 µg of NPs/L, no effects on prokaryotic abundance or bacterial diversity were observed.

Other studies have considered soil bacteria, and the majority of these studies have shown that NPs have several effects at the community level. First, the most common effect is a decrease in total microbial biomass, and this effect has been observed with Ag NPs (0.003 – 100 mg/kg of soil) [52,58] (which are the most commonly studied NPs in terms of microbial communities), metal-oxide NPs [36,58] and multi-walled CNTs at very high concentrations (5000 µg/g of soil) [58]. Authors have also shown that NP exposure leads to changes in community compositions and diversities. These effects have been observed with Ag NPs (from 0.14 mg/kg of soil) [6,52,58], metal-oxide NPs from 10 mg/kg of soil [6,35–37,39,58], multi-walled CNTs at extremely high concentration (10 000 mg/kg) [38], QDs and organic NPs (at 0.5 and 10 mg/kg, respectively) [35]. Changes in microbial community composition can have extremely severe effects on community activity and functioning. In cases of massive losses of species, there are risks of the loss of bacterial function (*e.g.* denitrification) and thus consequences on the functioning of the entire community. Authors have observed changes in community activity, such as a decreases in N_2O flux in soils, and inhibitions of enzymatic activities (e.g., leucine amino peptidase and phosphatase) [52], and similar inhibition of denitrifying bacteria activity [58].

Two studies have focused on freshwater algae. Kulacki *et al.* [45] exposed three freshwater algal species as single culture and together as multi culture to TiO_2 NPs (82% anatase and 18% rutile) in stream mesocosms that were illuminated with the entire visible spectrum and the upper UV spectrum (360 – 400 nm) at an intensity above 0.2 µW/cm². These authors observed that the NPs had no effects on the growth or final dry biomass regardless of concentration (0.1 – 1 ppm). Moreover, no differences were observed between single and multi-cultures. Pakrashi *et al.* [53] studied the fate of Al_2O_3 NPs over 210 days and the effects of these NPs on algal population. These authors observed an immediate effect (5 days) at 1 mg/L; *i.e.*, a 25% decrease in ~~of~~ algal viability and a long term (7 months) gradual recovery. Algal viability was

assessed *via* cell counts and chlorophyll content estimations.

Although NPs affect algal and microbial communities, long-term recovery has also been observed in some cases [52,53], and no study has shown irreversible drastic effects (e.g. the combination of three effects: changes in community biomass, composition, and activity). Two studies have also shown no toxicity to microbial communities exposed to fullerenes or metallic NPs [58].

Colman *et al.* studied the toxicity of Ag NPs (2.5 mg/L) at the ecosystem level using large mesocosms [55]. These authors found that the initial toxicity of the NPs on the plant species led to medium modifications that resulted in changes in heterotrophic bacteria abundance and ultimately drove the water column to hypoxia. Pradhan *et al.* also studied the effects of NPs at the ecosystem level [40]. These authors observed a significant decrease in litter decomposition with CuO NPs (100 – 500 mg/L) and Ag NPs (100 – 300 mg/L) due to NP toxicity in the microbial decomposers. Indeed, NP contamination leads to decreases in bacterial and fungal biomasses (at all concentrations of Ag NPs, and from 200 mg of CuO NPs/L for bacteria, and the highest concentrations tested for fungi), shifts in bacterial and fungal communities and global decreases in the richness of bacterial and fungal communities for all Ag and CuO NPs concentrations tested. In these studies, the authors showed that initial NP toxicity to organisms can affect other species and lead to severe modifications of the media, which highlights the importance of interactions at the ecosystem level.

5. Discussion

5.1 Integrated studies approaching environmental conditions are emerging

Recently, scientists working on the fate and effects of engineered nanomaterials have aimed to approaching realistic environmental conditions when performing experiments. The systems that are used are more or less complex and allow for the study of different endpoints depending both on the biological models and the exposure method. Experiments are performed in small or large systems, in the laboratory or in the open air in natural weather conditions.

It appears that authors do not necessarily use the same terminology when referring to the same exposure systems, particularly concerning micro/mesocosms. Some authors seem to refer to the system size, others refer to systems complexity (e.g., particular features, numbers of species), or their localization (*i.e.*, outdoor or in the laboratory). An analysis of the literature reveals a clear distinction between microcosms and mesocosms in the field of ecology that is based on whether exposures are realized in the laboratory or in the open air. Odum [61] describes mesocosms as "limited, more or less closed experimental systems at an intermediate scale between the microcosm of the lab and the full complexity of the real world, the ecosystem". Unlike microcosms, mesocosms are exposed to the spontaneous variability of climatic factors [62], which makes them more similar to realistic conditions than microcosms. This distinction based on the localization therefore seems to be relevant to the definition of systems. In contrast, the etymological definitions of "mesocosm" (from ancient Greek "meso": middle / intermediate and "kosmos": world), and "microcosm" ("small") can refer to size, but reference to the complexity of the system is more relevant. Mesocosms can thus be considered to be representative of natural environments at an intermediate scale of complexity that is between natural

ecosystems and laboratory experiments. Complexity, regardless of the localization of the system, could then orientate the terminology. But, how should complexity be defined? Such a definition could be based on biological complexity according to environmental matrices (e.g., natural water or soils), communities (e.g., microbial communities), several species with recognized interactions, or unintended organisms. The complexity of the system can also depend on lack of control of abiotic parameters as occurs in outdoor systems. In such cases the weather conditions (e.g., UV light, rain, and temperature) strongly influence the system parameters. The present review does not claim to define the various experimental systems but suggests potential guidelines for terminology. Systems with a certain degree of biologic and/or abiotic complexity could be called mesocosms. However, it appears unrealistic to define a distinct limit between complex and simple systems because a continuum of complexity exists across experimental set-ups. The lack of control of biotic/abiotic parameters could be a complexity indicator. Moreover, a distinction could be made between indoor and outdoor mesocosms. For example, mesocosms maintained in greenhouse could be considered to be indoor mesocosm because greenhouses offer protection against rain, extreme weather conditions and even UV exposure, which is especially important in the study of NPs.

Most of the studies of micro/mesocosms have focused on NP partitioning and bioaccumulation and concluded that NPs are readily removed from water columns and primarily found in sediments and organisms and that bioaccumulation occurs preferentially in biofilms and primary consumers (biofilm grazers and filter-feeders). Bioaccumulation has also been studied with reconstructed trophic chains. Many studies have demonstrated bioaccumulation across the trophic chain, but biomagnification has only been observed in a single study [17]. However, the results do not consistently point towards the same conclusion because some studies have found more significant bioaccumulation *via* the trophic route than *via* direct exposure, while others have reported the opposite result. However, it should be noted that bioaccumulation is not a direct indicator of toxicity. Jackson *et al.* [29] exposed the amphipod *L. plumulosus* to CdSe/ZnS QDs directly *via* water or *via* the ingestion of contaminated algae. No toxicity was observed following direct exposure, but significant mortality occurred following the ingestion of the contaminated algae and QD bioconcentration (*i.e.*, accumulation *via* water) was nearly four times greater than bioaccumulation (*i.e.*, accumulation *via* ingestion). The authors suggested that the toxicity might have been due to increased dissolution of QDs by algae, which led to greater dispersion in the organisms. These results highlight the importance of comparing direct and trophic exposures, the study of toxicological effects, and quantitative analyses. Moreover, metallic NP toxicity should consistently be compared to the toxicity of the corresponding metal ionic form.

5.2 Serious gaps remain

The present review highlights the important lack of data concerning NP fates and effects in environmentally realistic conditions. Integrated ecotoxicity studies of NPs and studies utilizing complex systems that intend to model environmental conditions, such as microcosms or mesocosms, are very scarce. These studies vary widely and concern different types of NP and many different biological models,

which prevents the comparison of the results and makes it very difficult to establish general trends regarding NP toxicity and toxicity mechanisms. Furthermore, many uncertainties and artifacts can occur during nano-ecotoxicity studies [63] and complicate comparisons between studies.

In addition to the general lack of data, important shortages related to specific points should be noted. In the present review, the studied species can be classified into the following eight main groups: fish species, aquatic snails, bivalve mollusks, daphnids, worms, plants, and algae and bacteria (which are the most often studied). It is important to note that only two studies focused on terrestrial systems despite the fact that important portions of engineered nanomaterials are expected to enter terrestrial environments [64]. Despite their relevance, sediment-dwelling species are also used too infrequently in NP experiments. Indeed, as shown in the present review, NPs tend to aggregate and sediment quickly once in the water column, which makes sediments the major sink for NPs in the environment. A significant lack of studies on marine species was also noted. Furthermore, while algae are used in a substantial portion of studies, their primary use is as the first link in trophic chains. Indeed, algae, which form the base of the trophic web, seem to be minimally affected by NPs in the long term [9,65,66] and might play an important role in trophic transfer by aggregating and "catching" NPs [67,68]. Finally, a lack of experiments conducted in estuarine conditions was observed, and salinity greatly influences physical and chemical properties of NPs, and important modifications in NP behavior can be expected in estuarine environments.

Regarding the nature of the nanomaterials studied, we note that studies of carbon-based nanomaterials (*i.e.*, CNTs, fullerenes and graphene) are scarce, although such NPs are produced on a large scale [1] and represent the second-most referenced material in commercial products [69]. Recent studies have assessed the fates and effects of aged nanomaterials from consumer products and the NPs that leach from such products, but additional studies of consumer products containing NPs are needed.

6. Summary

With the increasing number of studies of NPs and their behaviors, fates and effects, it has become clear that NPs are unlikely to behave like other contaminants (e.g. metals, organic pesticides, and PAHs) in the environment. Studies with conditions that approach environmentally realistic conditions are thus highly necessary to better understand the real effects of NPs in the environment. Hence, this review aimed to gather studies that have used methods that allow for integrated ecotoxicological assessments of engineered NPs and to describe their characteristics and associated endpoints. First, reconstructed trophic chains (or exposures *via* contaminated food) under control conditions enable the determination of the implications of trophic routes on NP toxicity and their potential transfer in the trophic web. Another method consists of simultaneous exposures of several species, which allows for multi-species studies and examination of the potential interaction between species while effecting important controls on abiotic parameters because the exposures are realized in laboratory. Finally, outdoor systems represent a step closer to realistic environmental conditions. The exposure systems described in this review allow for studies of toxicity in single species, studies of toxicity in single species *via* the trophic route, and studies of toxicity at the community level. Depending on the

species, major toxicity responses include the induction of biochemical defense systems (e.g., oxidative stress enzymes and MT), immunomodulation, effects on growth and reproduction, behavioral alterations and mortality. The major effects of NPs on microbial and algal communities are modifications of community compositions and diversities, decreases in biomass and changes in community activities. NPs have also been shown to cause severe changes in the exposure media and to affect different species of an ecosystem *via* indirect effects.

In addition to the general lack of data, major gaps were noted concerning the species and materials studied. For example, a severe lack of studies on terrestrial organisms and ecosystems was highlighted despite the relevance of this compartment in nanoecotoxicology. Studies on sediment-dwelling and marine organisms are also currently too rare. Regarding the assessed materials, studies of carbon-based nanomaterials (e.g., carbon nanotubes, fullerenes and graphene) and consumer products that are advertised to contain nanoparticles are very scarce. Finally, the toxicity of metallic NPs should consistently be compared to the toxicities of corresponding metal ionic forms. Similarly, the effects observed *via* the trophic route should be compared and discussed in light of the effects, or lack of effects, observed *via* direct exposure.

There is an urgent need to assess the fates and effects of nanomaterials in the environment. However, an important gap remains between the specific needs that result from the intrinsic properties and the methods used to assess NP behavior and potential toxicity in situations that approach environmentally realistic conditions. The development of methods for easier detection and quantification of NPs in natural environments is also an important challenge for assessments of the fates and effects of NPs.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French National Research Agency (ANR) for its financial support, which allowed the establishment of the MESONNET project (ANR-10-NANO-006-04). This work is also integrated in the international research group ICEINT (International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology). The English language of the manuscript has been corrected by Elsevier™ language editing services.

References

[1] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, B. Nowack, Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, J. Nanoparticle Res. 14 (2012) 1–11.

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

[3] A.A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva, S. Suh, Global life cycle releases of engineered nanomaterials, J. Nanoparticle Res. 15 (2013) 1–17.

[4] N.C. Mueller, B. Nowack, Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4447–4453.

[5] B. Nowack, T.D. Bucheli, Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment, Environ. Pollut. 150 (2007) 5–22.

[6] V. Kumar, A. Kumari, P. Guleria, S.K. Yadav, Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 215 (2012) 39–121.

[7] A. Kahru, H.-C. Dubourguier, From ecotoxicology to nanoecotoxicology, Toxicology. 269 (2010) 105–119.

[8] J.R. Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J.L. Gardea-Torresdey, Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010, J. Hazard. Mater. 186 (2011) 1–15.

[9] A. Menard, D. Drobne, A. Jemec, Ecotoxicity of nanosized TiO2. Review of in vivo data, Environ. Pollut. 159 (2011) 677–684.

[10] Panyala, Peña-Méndez, Havel, Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?, J. Appl. Biomed. (2008).

[11] A. Ruus, M. Schaanning, S. Øxnevad, K. Hylland, Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments, Aquat. Toxicol. 72 (2005) 273–292.

[12] DeForest, Brix, Adams, Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration., Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 84 (2007) 236–46.

[13] E. Lapied, J.Y. Nahmani, E. Moudilou, P. Chaurand, J. Labille, J. Rose, et al., Ecotoxicological effects of an aged TiO2 nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm Lumbricus terrestris after exposure through water, food and soil, Environ. Int. 37 (2011) 1105–1110.

[14] C.S. Ramsden, T.J. Smith, B.J. Shaw, R.D. Handy, Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain, Ecotoxicol. Lond. Engl. 18 (2009) 939–951.

[15] M. Fouqueray, P. Noury, L. Dherret, P. Chaurand, K. Abbaci, J. Labille, et al., Exposure of juvenile Danio rerio to aged TiO_2 nanomaterial from sunscreen, Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 20 (2013) 3340–3350.

[16] P.-E. Buffet, L. Poirier, A. Zalouk-Vergnoux, C. Lopes, J.-C. Amiard, P. Gaudin, et al., Biochemical and behavioural responses of the marine polychaete Hediste diversicolor to cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs): Waterborne and dietary exposure, Chemosphere. 100 (2014) 63–70.

[17] J.D. Judy, J.M. Unrine, P.M. Bertsch, Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 776–781.

[18] J.M. Unrine, W.A. Shoults-Wilson, O. Zhurbich, P.M. Bertsch, O.V. Tsyusko, Trophic transfer of Au nanoparticles from soil along a simulated terrestrial food chain, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 9753–9760.

[19] R.D. Holbrook, K.E. Murphy, J.B. Morrow, K.D. Cole, Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web, Nat. Nanotechnol. 3 (2008) 352–355.

[20] P.-E. Buffet, J.-F. Pan, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, P. Gaudin, et al., Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve Scrobicularia plana to silver nanoparticles in seawater and microalgal food, Ecotoxicol. Environ. Saf. 89 (2013) 117–124.

[21] S. Renault, M. Baudrimont, N. Mesmer-Dudons, P. Gonzalez, S.

Mornet, A. Brisson, Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (Scenedesmus subspicatus) and a benthic bivalve (Corbicula fluminea), Gold Bull. 41 (2008) 116–126.

[22] J.L. Bouldin, T.M. Ingle, A. Sengupta, R. Alexander, R.E. Hannigan, R.A. Buchanan, Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots^{TM} in freshwater algae and Ceriodaphnia dubia, Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 1958–1963.

[23] M. Fouqueray, B. Dufils, B. Vollat, P. Chaurand, C. Botta, K. Abacci, et al., Effects of aged TiO2 nanomaterial from sunscreen on Daphnia magna exposed by dietary route, Environ. Pollut. Barking Essex 1987. 163 (2012) 55–61.

[24] C.-M. Zhao, W.-X. Wang, Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in Daphnia magna, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 7699–7704.

[25] J. McTeer, A.P. Dean, K.N. White, J.K. Pittman, Bioaccumulation of silver nanoparticles into Daphnia magna from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability, Nanotoxicology. 8 (2014) 305–316.

[26] M.-N. Croteau, A.D. Dybowska, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures, Nanotoxicology. 5 (2011) 79–90.

[27] M.-N. Croteau, S.K. Misra, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 6600–6607.

[28] T.A. Jarvis, R.J. Miller, H.S. Lenihan, G.K. Bielmyer, Toxicity of ZnO nanoparticles to the copepod Acartia tonsa, exposed through a phytoplankton diet, Environ. Toxicol. Chem. SETAC. 32 (2013) 1264–1269.

[29] B.P. Jackson, D. Bugge, J.F. Ranville, C.Y. Chen, Bioavailability, Toxicity, and Bioaccumulation of Quantum Dot Nanoparticles to the Amphipod Leptocheirus plumulosus, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 5550–5556.

[30] X. Zhu, Y. Chang, Y. Chen, Toxicity and bioaccumulation of TiO2 nanoparticle aggregates in Daphnia magna, Chemosphere. 78 (2010) 209–215.

[31] T. Cedervall, L.-A. Hansson, M. Lard, B. Frohm, S. Linse, Food Chain Transport of Nanoparticles Affects Behaviour and Fat Metabolism in Fish, PLoS ONE. 7 (2012) e32254.

[32] T. Debenest, A.-N. Petit, F. Gagné, M. Kohli, N. Nguyen, C. Blaise, Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays, Chemosphere. 85 (2011) 50–55.

[33] A. Campos, P. Araújo, C. Pinheiro, J. Azevedo, H. Osório, V. Vasconcelos, Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga Chlorella vulgaris exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin, Ecotoxicol. Environ. Saf. 94 (2013) 45–53.

[34] L. Garay-Narváez, R. Ramos-Jiliberto, Induced defenses within food webs: The role of community trade-offs, delayed responses, and defense specificity, Ecol. Complex. 6 (2009) 383–391.

[35] V. Nogueira, I. Lopes, T. Rocha-Santos, A.L. Santos, G.M. Rasteiro, F. Antunes, et al., Impact of organic and

inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure, Sci. Total Environ. 424 (2012) 344–350.

[36] S. Frenk, T. Ben-Moshe, I. Dror, B. Berkowitz, D. Minz, Effect of Metal Oxide Nanoparticles on Microbial Community Structure and Function in Two Different Soil Types, PLoS ONE. 8 (2013) e84441.

[37] Y. Ge, J.H. Priester, L.C. Van De Werfhorst, J.P. Schimel, P.A. Holden, Potential Mechanisms and Environmental Controls of TiO2 Nanoparticle Effects on Soil Bacterial Communities, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 14411–14417.

[38] B. Shrestha, V. Acosta-Martinez, S.B. Cox, M.J. Green, S. Li, J.E. Cañas-Carrell, An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning, J. Hazard. Mater. 261C (2013) 188–197.

[39] L. Vittori Antisari, S. Carbone, A. Gatti, G. Vianello, P. Nannipieri, Toxicity of metal oxide (CeO2, Fe3O4, SnO2) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil, Soil Biol. Biochem. 60 (2013) 87–94.

[40] A. Pradhan, S. Seena, C. Pascoal, F. Cássio, Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams?, Microb. Ecol. 62 (2011) 58–68.

[41] B.P. Colman, S.-Y. Wang, M. Auffan, M.R. Wiesner, E.S. Bernhardt, Antimicrobial effects of commercial silver nanoparticles are attenuated in natural streamwater and sediment, Ecotoxicol. Lond. Engl. 21 (2012) 1867–1877.

[42] K. Doiron, E. Pelletier, K. Lemarchand, Impact of polymer-coated silver nanoparticles on marine microbial communities: a microcosm study, Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 124-125 (2012) 22–27.

[43] A. Bradford, R.D. Handy, J.W. Readman, A. Atfield, M. Mühling, Impact of Silver Nanoparticle Contamination on the Genetic Diversity of Natural Bacterial Assemblages in Estuarine Sediments, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 4530–4536.

[44] P. Zhang, X. He, Y. Ma, K. Lu, Y. Zhao, Z. Zhang, Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model, Chemosphere. 89 (2012) 530–535.

[45] K.J. Kulacki, B.J. Cardinale, A.A. Keller, R. Bier, H. Dickson, How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores, Environ. Toxicol. Chem. SETAC. 31 (2012) 2414–2422.

[46] J.L. Ferry, P. Craig, C. Hexel, P. Sisco, R. Frey, P.L. Pennington, et al., Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web, Nat. Nanotechnol. 4 (2009) 441–444.

[47] M.-K. Yeo, D.-H. Nam, Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: a comparison of TiO2 nanoparticles and nanotubes, Environ. Pollut. Barking Essex 1987. 178 (2013) 166–172.

[48] D. Cleveland, S.E. Long, P.L. Pennington, E. Cooper, M.H. Fulton, G.I. Scott, et al., Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products, Sci. Total Environ. 421–422 (2012) 267–272.

[49] F. Gottschalk, B. Nowack, The release of engineered nanomaterials to the environment, J. Environ. Monit. 13 (2011) 1145–1155.

[50] R. Kaegi, A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, et al., Synthetic TiO2 nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment, Environ. Pollut. Barking Essex 1987. 156 (2008) 233–239.

[51] M.A. Kiser, P. Westerhoff, T. Benn, Y. Wang, J. Pérez-Rivera, K. Hristovski, Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 6757–6763.

[52] B.P. Colman, C.L. Arnaout, S. Anciaux, C.K. Gunsch, M.F. Hochella Jr, B. Kim, et al., Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario, PloS One. 8 (2013) e57189.

[53] S. Pakrashi, S. Dalai, Ritika, B. Sneha, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, A temporal study on fate of Al2O3 nanoparticles in a fresh water microcosm at environmentally relevant low concentrations, Ecotoxicol. Environ. Saf. 84 (2012) 70–77.

[54] G.V. Lowry, B.P. Espinasse, A.R. Badireddy, C.J. Richardson, B.C. Reinsch, L.D. Bryant, et al., Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 7027–7036.

[55] B.P. Colman, B.P. Espinasse, C.J. Richardson, C.W. Matson, G. Lowry, D. Hunt, et al., Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems, Environ. Sci. Technol. (2014).

[56] P.-E. Buffet, A. Zalouk-Vergnoux, A. Châtel, B. Berthet, I. Métais, H. Perrein-Ettajani, et al., A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm Hediste diversicolor and the bivalve mollusc Scrobicularia plana, Sci. Total Environ. 470-471 (2014) 1151–1159.

[57] P.-E. Buffet, M. Richard, F. Caupos, A. Vergnoux, H. Perrein-Ettajani, A. Luna-Acosta, et al., A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (Scrobicularia plana, Hediste diversicolor), Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 1620–1628.

[58] R. Dinesh, M. Anandaraj, V. Srinivasan, S. Hamza, Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity, Geoderma. 173–174 (2012) 19–27.

[59] S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts, Waste Manag. 30 (2010) 504–520.

[60] S. Eduok, B. Martin, R. Villa, A. Nocker, B. Jefferson, F. Coulon, Evaluation of engineered nanoparticle toxic effect on wastewater micro-organisms: Current status and challenges, Ecotoxicol. Environ. Saf. 95 (2013) 1–9.

[61] E.P. Odum, The Mesocosm, BioScience. 34 (1984) 558–562.

[62] F. Ramade, Introduction à l'écotoxicologie: fondements et applications, Tec & Doc : Lavoisier, Paris, 2007.

[63] E.J. Petersen, T.B. Henry, J. Zhao, R.I. MacCuspie, T.L. Kirschling, M.A. Dobrovolskaia, et al., Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 4226–4246.

[64] A. Boxall, Q. Chaudhry, C. Sinclair, A. Jones, R. Aitken, B. Jefferson, et al., Current and future predicted

environmental exposure to engineered nanoparticles, Cent. Sci. Lab. Dep. Environ. Rural Aff. Lond. OK. (2007).

[65] E. Kadar, P. Rooks, C. Lakey, D.A. White, The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures, Sci. Total Environ. 439 (2012) 8–17.

[66] A.-J. Miao, K.A. Schwehr, C. Xu, S.-J. Zhang, Z. Luo, A. Quigg, et al., The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances, Environ. Pollut. Barking Essex 1987. 157 (2009) 3034–3041.

[67] A. Baun, S.N. Sørensen, R.F. Rasmussen, N.B. Hartmann, C.B. Koch, Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60, Aquat. Toxicol. 86 (2008) 379–387.

[68] L. Verneuil, J. Silvestre, F. Mouchet, E. Flahaut, J.-C. Boutonnet, F. Bourdiol, et al., Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: “A sticky story,” Nanotoxicology. (2014) 1–11.

[69] H. Weinberg, A. Galyean, M. Leopold, Evaluating engineered nanoparticles in natural waters, TrAC Trends Anal. Chem. 30 (2011) 72–83.

Références bibliographiques

ADIT, Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International, 2014. Opportunités et risques des nanotechnologies par rapport à l'environnement aquatique.

Artells, E., Issartel, J., Auffan, M., Borschneck, D., Thill, A., Tella, M., Brousset, L., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiéry, A., 2013. Exposure to Cerium Dioxide Nanoparticles Differently Affect Swimming Performance and Survival in Two Daphnid Species. PLoS ONE 8, e71260. doi:10.1371/journal.pone.0071260

Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., Rose, J., 2014. Long-term aging of a CeO2 based nanocomposite used for wood protection. Environ. Pollut. 188, 1–7. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.016

Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 186, 257–271. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014

Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicol. Lond. Engl. 17, 387–395. doi:10.1007/s10646-008-0208-y

Bello, D., Hart, A.J., Ahn, K., Hallock, M., Yamamoto, N., Garcia, E.J., Ellenbecker, M.J., Wardle, B.L., 2008. Particle exposure levels during CVD growth and subsequent handling of vertically-aligned carbon nanotube films. Carbon 46, 974–977. doi:10.1016/j.carbon.2008.03.003

Bottero, J.-Y., Auffan, M., Rose, J., Mouneyrac, C., Botta, C., Labille, J., Masion, A., Thill, A., Chaneac, C., 2011. Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. Comptes Rendus Geosci. 343, 168–176. doi:10.1016/j.crte.2011.01.001

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. J. Hazard. Mater. In press.

Boxall, A., Chaudhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B., Watts, C., 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Cent. Sci. Lab. Dep. Environ. Rural Aff. Lond. OK.

Commission particulière du débat public nanotechnologies, 2010. Débat public : nanotechnologies.

Diot, 2012. Etude du vieillissement et de l'altération de nanocomposites de la vie courante.

European Commission, 2008. Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH). CA/59/2008 rev. 1.

Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. Mar. Environ. Res. 76, 114–121. doi:10.1016/j.marenvres.2011.10.003

Fang, X., Yu, R., Li, B., Somasundaran, P., Chandran, K., 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO2 and anatase TiO2 nanoparticles on the Nitrosomonas europaea. J. Colloid Interface Sci. 348, 329–334. doi:10.1016/j.jcis.2010.04.075

FDA, 2012a. Guidance for Industry. Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

FDA, 2012b. Guidance for Industry. Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Feynman, 1959. Plenty of Room at the Bottom.

FOREGS, 2005. Atlas Géochimique Européen.

France Culture, 2014. Les nanos sont-elles toxiques? Sci. Publique Fr. Cult.

France Soir, 2010. Nanotechnologies : Attention danger! Fr. Soir.

Fujitani, Y., Kobayashi, T., Arashidani, K., Kunugita, N., Suemura, K., 2008. Measurement of the physical properties of aerosols in a fullerene factory for inhalation exposure assessment. J. Occup. Environ. Hyg. 5, 380–389. doi:10.1080/15459620802050053

Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M.A., Lead, J.R., Tyler, C.R., Baalousha, M., Biswas, A., Britton, G.J., Cole, P.A., Johnston, B.D., Ju-Nam, Y., Rosenkranz, P., Scown, T.M., Stone, V., 2012. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 144–154. doi:10.1002/etc.703

Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M., Lead, J.R., Tyler, C.R., Stone, V., 2009. Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. Environ. Health Glob. Access Sci. Source 8 Suppl 1, S2. doi:10.1186/1476-069X-8-S1-S2

García, A., Delgado, L., Torà, J.A., Casals, E., González, E., Puntes, V., Font, X., Carrera, J., Sánchez, A., 2012. Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment. J. Hazard. Mater. 199-200, 64–72. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.057

García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puntes, V., Barata, C., Font, X., Sánchez, A., 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. Desalination 269, 136–141. doi:10.1016/j.desal.2010.10.052

García-Saucedo, C., Field, J.A., Otero-Gonzalez, L., Sierra-Álvarez, R., 2011. Low toxicity of HfO2, SiO2, Al2O3 and CeO2 nanoparticles to the yeast, Saccharomyces cerevisiae. J. Hazard. Mater. 192, 1572–1579. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.06.081

Geranio, L., Heuberger, M., Nowack, B., 2009. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. Environ. Sci. Technol. 43, 8113–8118. doi:10.1021/es9018332

Gottschalk, Nowack, B., Gawlik, B., 2010. Report on exposure scenarios and release of nanomaterials to the environment. Nanex Project (WP5).

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 155, 344–357. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004

Hu, J., Wang, D., Wang, J., Wang, J., 2012. Toxicity of lead on Ceriodaphnia dubia in the presence of nano-CeO(2) and nano-TiO(2). Chemosphere 89, 536–541. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.045

ISO, 2011. ISO/TS 80004:2011. Nanotechnologies - Vocabulary - Part 4: Nanostructured materials.

Jemec, A., Djinović, P., Tišler, T., Pintar, A., 2012. Effects of four CeO2 nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish Danio rerio and crustacean Daphnia magna. J. Hazard. Mater. 219-220, 213–220. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.080

Jing, H., Mezgebe, B., Aly Hassan, A., Sahle-Demessie, E., Sorial, G.A., Bennett-Stamper, C., 2014. Experimental and modeling studies of sorption of ceria nanoparticle on microbial biofilms. Bioresour. Technol. 161, 109–117. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.015

Johnson, A.C., Park, B., 2012. Predicting contamination by the fuel additive cerium oxide engineered nanoparticles within the United Kingdom and the associated risks. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 2582–2587. doi:10.1002/etc.1983

Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci. Total Environ. 400, 396–414. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., Boller, M., 2008. Synthetic TiO2 nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 156, 233–239. doi:10.1016/j.envpol.2008.08.004

Kahru, A., Dubourguier, H.-C., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. Toxicology 269, 105–119. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016

Kahru, A., Ivask, A., 2013. Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. Acc. Chem. Res. 46, 823–833. doi:10.1021/ar3000212

Kim, B., Murayama, M., Colman, B.P., Hochella, M.F., 2012. Characterization and environmental implications of nano- and larger TiO2 particles in sewage sludge, and soils

amended with sewage sludge. J. Environ. Monit. 14, 1128–1136. doi:10.1039/C2EM10809G

Kim, C.K., Kim, T., Choi, I.-Y., Soh, M., Kim, D., Kim, Y.-J., Jang, H., Yang, H.-S., Kim, J.Y., Park, H.-K., Park, S.P., Park, S., Yu, T., Yoon, B.-W., Lee, S.-H., Hyeon, T., 2012. Ceria Nanoparticles that can Protect against Ischemic Stroke. Angew. Chem. Int. Ed. 51, 11039–11043. doi:10.1002/anie.201203780

Kiser, M.A., Westerhoff, P., Benn, T., Wang, Y., Pérez-Rivera, J., Hristovski, K., 2009. Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. Environ. Sci. Technol. 43, 6757–6763. doi:10.1021/es901102n

Kurzweil, R., 2014. Des nanorobots pour rendre disponible nos cerveaux dans le Cloud ? Nouvelle prédiction de Ray Kurzweil, directeur de l'ingénierie chez Google. developpez.com.

Le Monde, 2013. La toxicité des nanomatériaux confirmée par une étude américaine. Le Monde.fr. http://www.lemonde.fr/planete/article/2013/05/07/la-toxicite-des-nanomateriaux-confirmee-par-une-etude-americaine_3172367_3244.html. Consulté le 07/06/14.

Le Monde, 2014. Les nanomatériaux : ennemis invisibles et omniprésents. Le Monde.fr. http://www.lemonde.fr/planete/article/2014/05/15/les-nanomateriaux-ces-ennemis-invisibles-mais-omnipresents_4418874_3244.html. Consulté le 07/06/14.

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 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. Environ. Toxicol. Pharmacol. 28, 86–91. doi:10.1016/j.etap.2009.03.001

Lenglet, R., 2014. Nanotoxiques - Une enquête. ACTES SUD, Arles.

LOI n° 2009-967 du 3 août 2009 - Article 42, 2009. , 2009-967.

LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 - Article 185, 2010. , 2010-788.

López-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2010. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO2 Nanoparticles on Soybean (Glycine max) Plants. Environ. Sci. Technol. 44, 7315–7320. doi:10.1021/es903891g

Lorenz, C., Windler, L., von Goetz, N., Lehmann, R.P., Schuppler, M., Hungerbühler, K., Heuberger, M., Nowack, B., 2012. Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. Chemosphere 89, 817–824. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.04.063

Ma, J., Quan, X., Si, X., Wu, Y., 2013. Responses of anaerobic granule and flocculent sludge to ceria nanoparticles and toxic mechanisms. Bioresour. Technol. 149, 346–352. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.080

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70. doi:10.1016/j.envpol.2013.04.040

Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests. J. Phys. Conf. Ser. 304, 012058. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012058

Marcoux, M.-A., Matias, M., Olivier, F., 2012. Substances émergentes, polluants émergents dans les déchets. Analyse et prospective. Ne3LS.

Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., Zhao, Y., Chai, Z., 2010. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. Chemosphere 78, 273–279. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.050

Methner, M.M., Birch, M.E., Evans, D.E., Ku, B.-K., Crouch, K., Hoover, M.D., 2007. Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. J. Occup. Environ. Hyg. 4, D125–130. doi:10.1080/15459620701683871

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ. Int. 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014

NanOpinion, 2014. www.nanopinion.eu. Consulté le : 26/10/14.

NanoWiki, 2007. http://nanowiki.info. Consulté le 26/10/14.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicol. Lond. Engl. 17, 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Niu, J., Azfer, A., Rogers, L.M., Wang, X., Kolattukudy, P.E., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. Cardiovasc. Res. 73, 549–559. doi:10.1016/j.cardiores.2006.11.031

O'Brien, N., Cummins, E., 2010. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 45, 992–1007. doi:10.1080/10934521003772410

OECD, 2010a. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27, Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2010b. Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme; first revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 25, Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2010c. Toxicological Review of Nano Cerium Oxide. Ecotoxicology Test Protocols for Representative Nanomaterials in Support of the OECD.

OECD, INN, 2013. Symposium on Assessing the Economic Impact of Nanotechnology - Synthesis Report.

Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.-P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., Martin, P., 2008. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive - a case study. Inhal. Toxicol. 20, 547–566. doi:10.1080/08958370801915309

Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7981–7989. doi:10.1128/AEM.00650-10

Peralta-Videa, J.R., Hernandez-Viezcas, J.A., Zhao, L., Diaz, B.C., Ge, Y., Priester, J.H., Holden, P.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. Plant Physiol. Biochem. 80, 128–135. doi:10.1016/j.plaphy.2014.03.028

Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements. Environ. Sci. Technol. 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14, 1–11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9

Programme Boréal, 2014. Les nanoparticules dans les produits de la vie quotidienne: une nouvelle approche de la toxicologie?

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.062

Rao, C.N.R., Cheetham, A.K., 2001. Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects. J. Mater. Chem. 11, 2887–2894. doi:10.1039/B105058N

Règlement (UE) N° 1169/2011 du Parlement Européen et du Conseil du 25 Octobre 2011.

Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.-Y., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Rice: A Study Involving the Antioxidant Defense System and In Vivo Fluorescence Imaging. Environ. Sci. Technol. 47, 5635–5642. doi:10.1021/es401032m

Roco, M.C., 2011. The Long View of Nanotechnology Development: The National Nanotechnology Initiative at 10 Years, in: Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020, Science Policy Reports. Springer Netherlands, pp. 1–28.

Rodea-Palomares, I., Gonzalo, S., Santiago-Morales, J., Leganés, F., García-Calvo, E., Rosal, R., Fernández-Piñas, F., 2012. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 122-123, 133–143. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.005

Rogers, N.J., Franklin, N.M., Apte, S.C., Batley, G.E., Angel, B.M., Lead, J.R., Baalousha, M., 2010. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO2 in freshwater. Environ. Chem. 7, 50. doi:10.1071/EN09123

Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29, 167–172. doi:10.1016/j.etap.2009.12.003

SCENIHR /002 /05, 2005. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products.

Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L.K., Stark, W., Bürge, D., Nowack, B., 2013. Influence of two types of organic matter on interaction of CeO2 nanoparticles with plants in hydroponic culture. Chemosphere 91, 512–520. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.025

Shao, Gao, Yan, 2011. Semiconductor Quantum Dots for Biomedicial Applications. Sensors.

Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S., Seal, S., 2005. Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage. Nano Lett. 5, 2573–2577. doi:10.1021/nl052024f

The Project on Emerging Nanotechnologies, 2014. http://www.nanotechproject.org.

The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.

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

Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hassellov, M., 2008. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 25, 795–821. doi:10.1080/02652030802007553

Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A.R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO2 nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (Raphanus sativus) seedlings. J. Hazard. Mater. 263 Pt 2, 677–684. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.030

US EPA, 2008. TSCA Inventory Status of Nanoscale Substances - General Approach.

Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D.V., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y., Veillard, M., 1995. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. J. Controlled Release 36, 49–61. doi:10.1016/0168-3659(95)00053-B

Wang, Q., Ma, X., Zhang, W., Pei, H., Chen, Y., 2012. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (Solanum lycopersicum L.) and its implications for food safety. Met. Integr. Biometal Sci. 4, 1105–1112. doi:10.1039/c2mt20149f

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.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Jones, K.L., Hochella, J., Michael F., Di Giulio, R.T., Casman, E., Bernhardt, E.S., 2009. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials†‡. Environ. Sci. Technol. 43, 6458–6462. doi:10.1021/es803621k

WikiNanos, 2009. http://wikinanos.fr. Consulté le 26.10.14.

Windler, L., Lorenz, C., von Goetz, N., Hungerbühler, K., Amberg, M., Heuberger, M., Nowack, B., 2012. Release of Titanium Dioxide from Textiles during Washing. Environ. Sci. Technol. 46, 8181–8188. doi:10.1021/es301633b

Xia, J., Zhao, H.Z., Lu, G.H., 2013. Effects of selected metal oxide nanoparticles on multiple biomarkers in Carassius auratus. Biomed. Environ. Sci. BES 26, 742–749. doi:10.3967/0895-3988.2013.09.005

Yeganeh, B., Kull, C.M., Hull, M.S., Marr, L.C., 2008. Characterization of airborne particles during production of carbonaceous nanomaterials. Environ. Sci. Technol. 42, 4600–4606.

Zeyons, O., 2008. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO2 Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 45, 3725–3730. doi:10.1021/es103309n

Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Peng, B., Bandyopadhyay, S., Corral-Diaz, B., Osuna-Avila, P., Montes, M.O., Keller, A.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Alginate modifies the physiological impact of CeO2 nanoparticles in corn seedlings cultivated in soil. J. Environ. Sci. 26, 382–389. doi:10.1016/S1001-0742(13)60559-8

Chapitre II

Présentation des modèles biologiques

1. Les diatomées *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa*

Les diatomées sont des algues unicellulaires eucaryotes, dont la taille peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres. Leur principale particularité est la présence d'un frustule siliceux, formant la paroi cellulaire de l'algue. Cette « coque » est composée de deux valves s'emboitant l'une dans l'autre, et comportant de nombreux pores à leur surface. Ces pores forment des ornements propres à chaque espèce de diatomées. Certaines espèces présentent également une fente longitudinale, le raphé, qui permet les échanges avec le milieu extérieur. Les diatomées sécrètent du mucilage de nature complexe impliqué dans l'adhésion aux substrats, dans la mobilité des cellules et dans la formation des colonies (Bertrand, 1999; Bourrelly, 1968; Van Den Hoek, 1995). Comme la plupart des végétaux, les diatomées se reproduisent par multiplication végétative. Cependant, une particularité de la division cellulaire de ces micro-algues réside dans la synthèse, par chacune des cellules filles, d'une nouvelle valve au sein de chaque valve héritée de la cellule mère. De ce fait, la taille d'une des cellules filles est inférieure à celle de la cellule mère, et la réduction de taille s'amplifie au cours des générations. Lorsqu'un seuil minimal est atteint, la reproduction devient alors sexuée et la taille originelle de la cellule est rétablie (Debenest, 2007).

Les diatomées sont très représentatives des milieux marins et d'eau douce du fait de leur importante faculté d'adaptation et de survie. On distingue les diatomées pélagiques, qui vivent en suspension dans la colonne d'eau, et les diatomées benthiques, qui vivent à la surface du sédiment ou des objets immergés, à une profondeur où la lumière est suffisante pour assurer la photosynthèse. Les diatomées se développent alors au sein d'une matrice biologique complexe, le biofilm, qui comprend également d'autres algues, des bactéries et des champignons, l'ensemble étant lié par des Substances Extracellulaires Polymériques (SEP, comprenant notamment des polysaccharides) secrétées par ces micro-organismes (Debenest, 2007). Ces substances représentent une source importante de matière et d'énergie au sein des écosystèmes, faisant des diatomées benthiques un organisme clé à la base du réseau trophique de nombreux hydrosystèmes en tant que producteurs primaires (Ghosh et Gaur, 1998; Round *et al*., 1990; Stevenson et Pan, 1999). En effet, les diatomées peuvent représenter jusqu'à 90% de la biomasse des cours d'eau à certaines périodes de l'année ; elles jouent un rôle majeur dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques d'eau douce et marins.

Les diatomées sont très utilisées en écologie pour l'évaluation de la qualité de l'eau, basée sur l'utilisation d'indices biologiques. En effet, ce sont des bioindicateurs reconnus de

pollution des cours d'eau (Coste *et al*., 2009; Debenest *et al*., 2008). Ces micro-algues sont également très utilisées en écotoxicologie pour l'étude de l'impact des herbicides (Debenest *et al*., 2008) et des métaux lourds (Branco *et al*., 2010; Corcoll *et al*., 2012; Guo *et al*., 2013; Pandey *et al*., 2014). La toxicité observée chez ces espèces peut avoir des effets sur le cytosquelette, des effets génotoxiques (Desai *et al*., 2006), entraîner des anomalies du frustule ou des perturbations des processus bioénergétiques (activités photosynthétique et respiratoire) ou de synthèse (protéines, lipides, glucides). Enfin, les effets observés à l'échelle de la population sont des inhibitions de croissance et une diminution de la biomasse (Debenest, 2007).

Dans le cadre de ce travail, le choix s'est porté sur deux espèces dulçaquicoles benthiques, *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa* (figure 3), du fait de leur importance dans le réseau trophique. Ainsi que nous l'avons expliqué précédemment, les diatomées benthiques sont à la base des réseaux trophiques en tant que producteurs primaires et sont susceptibles d'être ingérées par de nombreux macroorganismes benthiques. *N. palea* est de taille supérieure à *N. pelliculosa* (~15 µm et de 3 à 4 µm respectivement), et est fortement benthique, contrairement à *N. pelliculosa* qui est de nature benthique à tendance légèrement planctonique. On peut noter également que *N. palea* est fortement silicifiée alors que *N. pelliculosa* est très peu silicifiée et que son frustule est très fin.

Culture

La culture des diatomées et l'ensemble des expériences sur ce modèle sont réalisés dans le cadre de la thèse de Laurent Verneuil (directeurs de thèse : Eric Pinelli et Jérôme Silvestre, laboratoire EcoLab).

Des souches axéniques de *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa* ont été fournies par le centre canadien de culture phycologique (Canadian Phycological Culture Center, CPCC). Elles ont pour références respectives CPCC-160 et CPCC-552. Les souches de diatomées sont cultivées en conditions axéniques au laboratoire, dans le milieu de culture CHU-10 basique, modifié par J. Acreman (Canadian Phycological Culture Centre), et contenant du Fe-EDTA comme source de fer ($6,4 < pH < 6,6$). La culture est réalisée en flasques en plastique, sous faible agitation, à 21 ±1°C, et sous un éclairement de 5500 lux fournis par une lampe à sodium. Le milieu de culture est renouvelé toutes les semaines, et systématiquement renouvelé 72h avant les expériences et la préparation de l'inoculum.

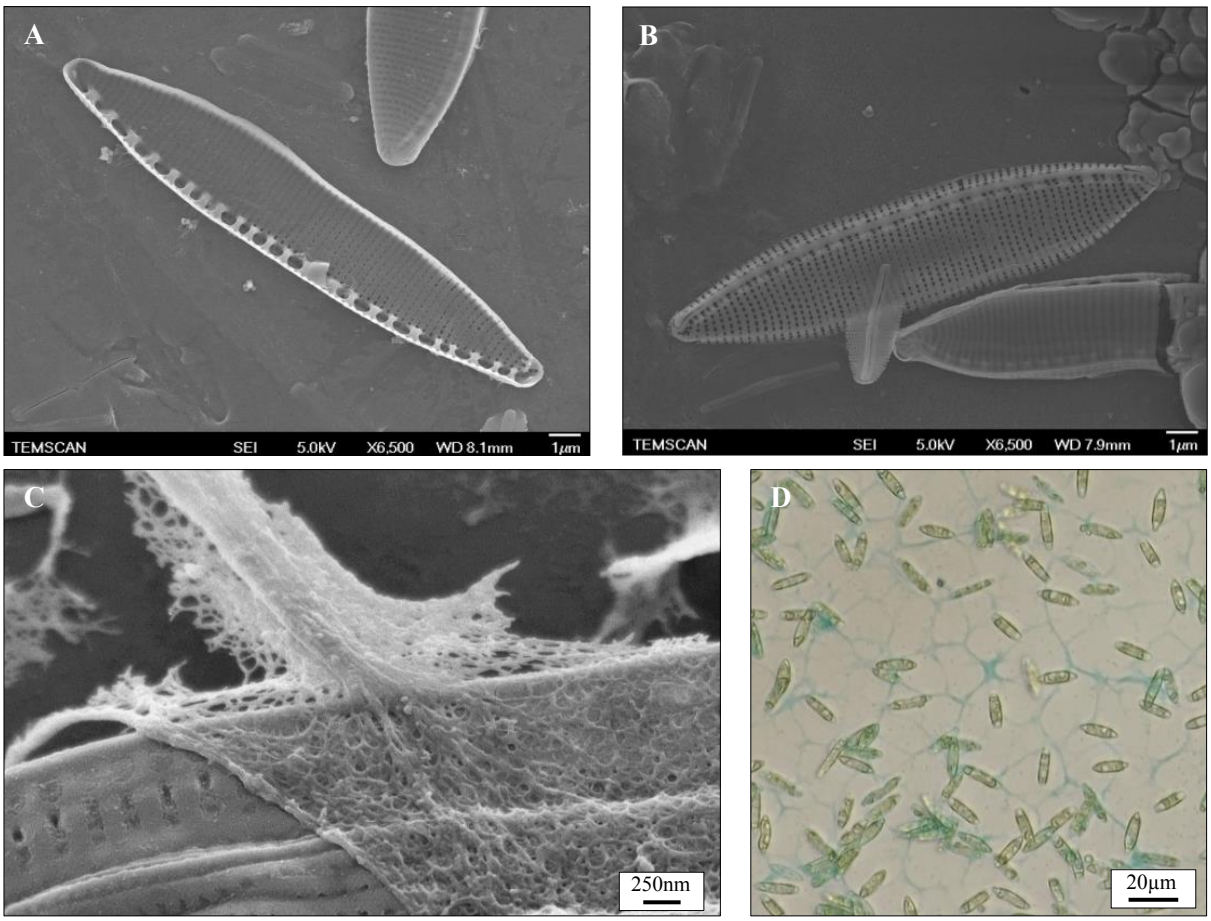


Figure 3 : Biofilm de diatomées. Observation en microscopie électronique à transmission de (A) *N. palea* et (B) *N. pelliculosa* (source : L. Verneuil, EcoLab). (C) *N. palea* entourée de SEP (observation en Microscopie Electronique à Balayage, MEB). (D) Biofilm de *N. palea* (observation en Microscopie Photonique, MP) après coloration au bleu Alcian : les SEP sont colorées en bleu (source : Verneuil *et al*., 2014).

2. Le diptère *Chironomus riparius*

Les *Chironomidae* sont un groupe de diptères holométaboles : les formes larvaire et adulte diffèrent radicalement. En effet, les larves de chironome évoluent dans les sédiments des cours d'eau (elles sont communément appelées « vers de vase rouges »), alors que les adultes sont des mouches non piqueuses qui évoluent en milieu aérien. Les chironomes sont présents dans de très nombreux écosystèmes, notamment en Amérique du nord et en Europe. La famille des *Chironomidae* est le groupe d'insecte le plus ubiquiste et le plus abondant parmi les insectes dulçaquicoles (Environnement Canada, 1997; Griffiths, 1992). Ainsi, les ruisseaux de petite et moyenne tailles peuvent abriter jusqu'à 50 000 individus par mètre carré. Les chironomes sont une composante majeure des réseaux trophiques, étant des consommateurs primaires importants (les larves benthiques broutent la surface des sédiments) mais également la proie de nombreuses espèces : oiseaux, poissons, amphibiens, ainsi que d'autres invertébrés aquatiques.

Le cycle de vie de *Chironomus riparius* dure entre 20 et 30 jours à 21°C et se compose de quatre phases (figure 4) : l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago, ou phase adulte. Trois de ces phases sont inféodées au milieu aquatique et les larves évoluent presque uniquement dans le sédiment.

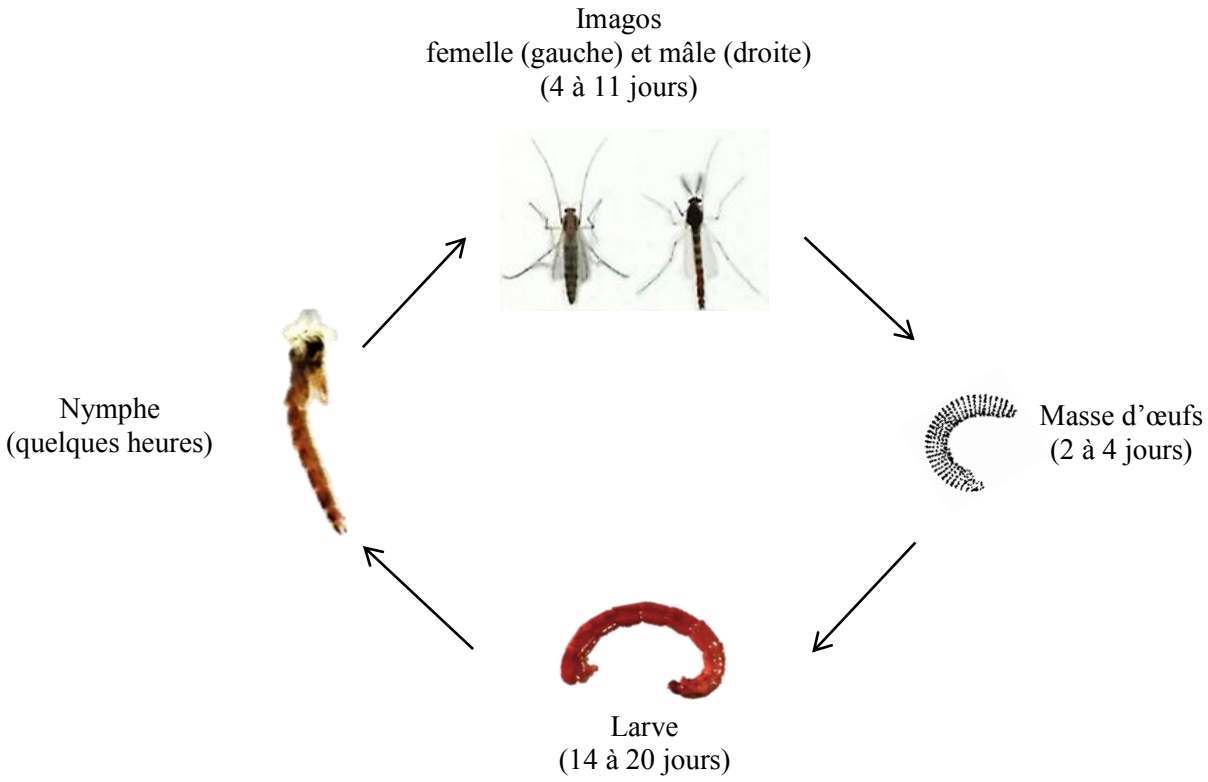


Figure 4 : Cycle de vie de *Chironomus riparius*.

Les femelles pondent une série d'œufs enrobés d'un manteau mucilagineux appelé « masse ». Les masses d'œufs sont en forme de C caractéristique et contiennent de 200 à 400 œufs en moyenne. Elles sont déposées par la femelle sur un support solide à la surface de l'eau. Après éclosion des œufs, les larves consomment le matériel mucilagineux puis s'enfouissent rapidement dans le sédiment, compartiment dans lequel elles vont principalement évoluer. Elles exercent une importante activité de bioturbation et de remaniement du sédiment sur les premiers centimètres de profondeur, ce qui nécessite l'ingestion de fines particules de sédiment. Les larves de chironome sont donc particulièrement exposées aux contaminants présents dans les sédiments et sont susceptibles de les accumuler de façon importante (Oberholster *et al.*, 2011), devenant ainsi un vecteur potentiel de contamination dans les réseaux trophiques. Ce sont des organismes brouteurs qui remontent régulièrement à la surface du sédiment pour se nourrir. Ce mode de nourrissage fait donc de la larve de chironome un organisme présent dans le sédiment ainsi qu'à l'interface sédiment/eau, caractéristique particulièrement intéressante en écotoxicologie pour l'étude du milieu aquatique. La phase larvaire se compose de quatre stades distincts, séparés par une mue et caractérisés par la taille de la capsule céphalique (Environnement Canada, 1997) :

- les larves de stade I (durée 2 - 4 jours) sont couleur crème, difficilement visibles à l'œil nu. La capsule céphalique mesure de 0,07 à 0,12 mm.

- durant le stade II (durée 2 - 4 jours), la larve initie la production d'hémoglobine et devient rose. La capsule céphalique mesure de 0,13 à 0,24 mm.

- au stade III (durée 2 - 4 jours), les larves prennent une couleur rouge vif typique. La capsule céphalique mesure de 0,26 à 0,40 mm.

- au stade IV (durée 5 - 7 jours), les larves ont un corps rouge vif alors que la tête est brun jaunâtre et les ocelles noirs. La capsule céphalique mesure de 0,43 à 0,60 mm. Lorsque les larves ont atteint leur taille maximale (12 et 14 mm pour les mâles et les femelles respectivement) elles consacrent les derniers jours de ce stade larvaire à l'accumulation de réserves énergétiques nécessaires à l'émergence. C'est à la fin de ce stade que la larve mue en nymphe.

Les nymphes de chironome quittent ensuite le sédiment pour remonter la colonne d'eau et atteindre la surface, où le processus d'émergence est rapide (quelques minutes). Particulièrement exposé aux prédateurs, le chironome est très vulnérable durant cette période. L'émergence des imagos est bimodale : les mâles, facilement reconnaissables grâce à leurs

antennes plumeuses, se développent plus vite que les femelles (Pascoe *et al*., 1989). Les adultes vivent quelques jours pendant lesquels ils cherchent à se reproduire et se disperser.

Les chironomes sont très utilisés en écotoxicologie pour l'étude des sédiments contaminés, mais également lors d'essais de contamination de la colonne d'eau. Les principaux polluants étudiés sont les métaux lourds (Bisthoven *et al*., 1992; Pascoe *et al*., 1989; Péry *et al*., 2008; Postma and Davids, 1995; Wentsel *et al*., 1978; Williams *et al*., 1987), les pesticides (Faria *et al*., 2007), les radionucléides (Dias *et al*., 2008; Lagauzère *et al*., 2009) et plus récemment les nanoparticules (Nair *et al*., 2013; Oberholster *et al*., 2011). Plusieurs bioessais sur chironome ont été normalisés au niveau français (AFNOR, 2004) et international (Environnement Canada, 1997; OECD, 2004a, 2004b) et permettent l'étude de plusieurs paramètres, tels que mortalité, croissance, développement et reproduction. Bien que ne faisant pas l'objet de tests normalisés, de nombreux autres paramètres sont étudiés sur les chironomes (asymétrie fluctuante, génotoxicité, tératogénicité, activité enzymatique, expression génique).

L'importance écologique du chironome, la courte durée de son cycle de vie, la connaissance poussée de sa physiologie et de ses réponses aux polluants, ainsi que sa facilité relative d'élevage font de cet organisme un modèle biologique particulièrement intéressant en écotoxicologie. De plus, sa position dans les réseaux trophiques et sa capacité potentielle à accumuler les contaminants en font un organisme de choix pour les études écotoxicologiques sur des chaînes trophiques.

Elevage

L'élevage est réalisé au sein du laboratoire EcoLab sur le site de l'ENSAT d'après les normes AFNOR (2004) et Environnement Canada (1997), grâce à une souche initiale provenant de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE, Vaulx-en-Velin, France). Il est réalisé en aquariums contenant un fond de sable de Fontainebleau et du milieu de culture adapté à l'élevage des chironomes (annexe 1), placés à 21 ± 1°C et soumis à une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit. L'apport de nourriture consiste en 400 mg de nourriture pour poisson (Tétramin®, composition analytique présentée en annexe 1) par aquarium et par jour. Une description détaillée de la méthode d'élevage est présentée en annexe 2.

Obtention des larves avant exposition

Quelques jours avant le début des expériences, toutes les masses présentes en aquarium d'élevage sont récupérées et placées individuellement en piluliers contenant du milieu de culture. Les masses ayant éclos le même jour sont gardées et placées en cristallisoir (annexe 2), à raison de deux à quatre masses par cristallisoir. Cette technique permet de réaliser des expositions de larves du même âge (décalage inférieur à 24h) et donc de s'affranchir du biais de l'âge des larves. Les jeunes larves sont récupérées 48h après éclosion.

3. L'amphibien *Pleurodeles waltl.*

L'amphibien *Pleurodeles waltlii* Michah. (ou *Pleurodeles waltl.*) appartient à l'ordre des Urodèles, famille des Salamandridae. Comme toutes les espèces urodèles, et à l'inverse des Anoures, les pleurodèles conservent leur queue à l'état adulte (figure 5). Ils vivent en milieux d'eau douce et leur répartition géographique se limite à la Péninsule Ibérique et à la partie occidentale de l'Afrique du Nord. Leur phase de développement pré-métamorphique est relativement longue (par comparaison aux xénopes notamment) : elle dure 110 jours à 18°C et se décompose en 56 stades, décrits par Gallien et Durocher (1957) dans la table chronologique du développement chez *P. waltl.*. Durant cette période de pré-métamorphose, de nombreuses modifications morphologiques et anatomiques ont lieu, entraînant la mise en place des différents organes internes, l'apparition de branchies externes et des pattes, et un accroissement important de la taille. Lors de la métamorphose, les branchies régressent au bénéfice de poumons, et la peau s'épaissit et devient rugueuse.

Les pleurodèles sont utilisés en écotoxicologie du fait de leur grande sensibilité aux contaminants environnementaux. En effet, une partie importante de leur cycle de vie se déroule en milieu aquatique, pendant laquelle des échanges gazeux ont lieu à travers leur peau très perméable à l'eau et par les branchies externes présentes chez les larves, favorisant une entrée directe des contaminants dans le flux sanguin. Les premiers stades de vie (de l'œuf à la métamorphose) sont particulièrement sensibles. Leur pertinence d'un point de vue écotoxicologique a donc conduit à de nombreuses études portant sur l'impact de polluants sur leur développement (Calevro *et al*., 1999; Flament *et al*., 2003), et de manière plus importante sur l'étude de la génotoxicité des polluants (Fernandez *et al*., 1993; Gauthier, 1996; Gauthier *et al*., 1993; Le Curieux *et al*., 1995; Siboulet *et al*., 1984; Zoll-Moreux and Ferrier, 1999). Le test de détection des micronoyaux chez le pleurodèle, ou test de Jaylet (Jaylet *et al*., 1986), étendu au xénope *X. laevis,* est notamment le seul test de génotoxicité *in vivo* existant sur

vertébré aquatique actuellement validé et normalisé (AFNOR, 2000; ISO, 2006). De plus, les pleurodèles sont des espèces carnivores, situées à un niveau élevé des réseaux trophiques, et sont donc susceptibles d'être exposés aux contaminants de manière indirecte par voie trophique. Ils constituent donc une espèce modèle particulièrement intéressante pour les études d'écotoxicité sur les chaînes trophiques.

Les tests de toxicité sont réalisés sur des larves au stade de développement 53 de la table de Gallien et Durocher (1957). En effet, le test de détection des micronoyaux doit être pratiqué au moment où l'index mitotique chez l'organisme est le plus élevé (*cf.* chap. III, part. 1.4.2.1), soit le stade 53 de développement chez le pleurodèle, qui correspond à une période d'érythropoïèse intense.



Figure 5 : Couple de *Pleurodeles waltl.* adultes (femelle à gauche ; mâle à droite).

Elevage et obtention des larves pour l'expérimentation

L'élevage et l'obtention de larves ont lieu au laboratoire EcoLaB sur le site de l'ENSAT. Les reproducteurs mâles et femelles sont élevés séparément et sont regroupés aux périodes de reproduction uniquement (septembre à octobre et janvier à mars). L'élevage se fait en aquariums contenant de l'eau de ville déchlorée, maintenue à une température de 18°C ± 1°C et soumis à une photopériode de 8h de jour et 16h de nuit. Le nourrissage consiste en du cœur de bœuf cru.

La fécondation *in vivo* est naturelle (sans injection hormonale) et a lieu aux saisons propices à la reproduction. Après la ponte, les œufs sont placés dans des récipients isolés, où l'éclosion aura lieu une dizaine de jours plus tard. Les premiers jours, l'apport énergétique des jeunes larves provient des réserves contenues dans leur sac vitellin. Elles sont ensuite quotidiennement nourries avec des nauplies d'artémies (*Artemia salina*), petits crustacés vivant en eaux salées, puis dès que leur taille le permet, avec des larves de chironomes congelées. L'obtention de larves au stade 53 de développement, auquel doit débuter l'exposition, survient environ deux mois après la ponte. Le stade 53 est caractérisé par la présence de quatre doigts sur les membres postérieurs des larves, et à l'ébauche du cinquième doigt (figure 6).

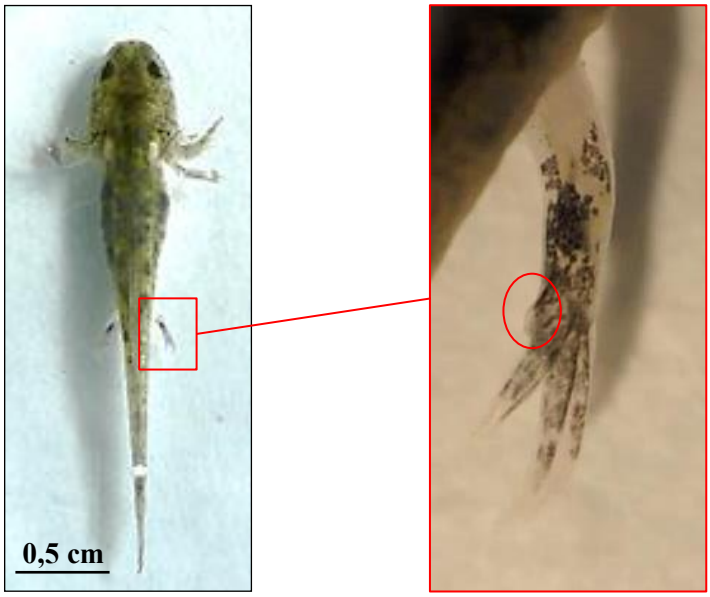


Figure 6 : Larve de *Pleurodeles waltl.* au stade 53 de développement de la table de Gallien et Durocher (1957). L'agrandissement met en évidence l'ébauche du cinquième doigt, caractéristique de ce stade de développement.

4. L'amphibien *Xenopus laevis*

Originaire d'Afrique australe, l'amphibien *Xenopus laevis*, aussi connu sous le nom de crapaud d'Afrique ou Dactylèthre du Cap, appartient à l'ordre des Anoures, dont la caractéristique commune est l'absence de queue chez les organismes adultes. Son développement rapide (58 jours à 23°C) se divise en 66 stades (Nieuwkoop et Faber, 1956) durant lesquels de nombreuses modifications morphologiques et anatomiques ont lieu, permettant le passage de l'organisme de l'état d'embryon à celui de larve. Enfin, la métamorphose, ou passage au stade adulte, se caractérise par la régression et disparition totale de la queue (figure 7).



Figure 7 : Couple de *Xenopus laevis* adultes (femelle à gauche ; mâle à droite).

Xenopus laevis présente des avantages qui font de cette espèce un modèle de choix pour les études menées en laboratoire. La disponibilité des pontes très nombreuses (jusqu'à 2000 œufs par ponte) tout au long de l'année par stimulation hormonale des reproducteurs, ainsi que la rapidité de développement des larves permettent l'obtention rapide d'une grande quantité de matériel biologique. De plus, l'élevage en laboratoire des adultes reproducteurs et l'entretien des larves sont relativement aisés. Cette espèce est classiquement utilisée en embryologie et

en biologie moléculaire, et de nombreuses avancées dans le domaine ont été rendues possibles par l'étude de ce modèle. Mais sa pertinence d'un point de vue écotoxicologique en fait également un modèle de choix pour cette discipline. En effet, le mode de vie exclusivement aquatique des xénopes et la perméabilité de leur peau entraînent une exposition directe et constante aux contaminants présents dans les milieux aquatiques, auxquels ils s'avèrent particulièrement sensibles. De nombreuses études ont notamment montré la sensibilité de cette espèce aux contaminants génotoxiques (Fernandez *et al*., 1993; Mouchet *et al*., 2008, 2007, 2006, 2005; Zoll-Moreux et Ferrier, 1999). Ainsi, de même que *P. waltl.*, *X. laevis* est référencé comme organisme modèle dans le test normalisé ISO 21427-1 (2006) pour l'évaluation de la génotoxicité par mesure de l'induction de micronoyaux. Comme indiqué précédemment (partie 3 : L'amphibien *P. waltl.*), ce test doit être réalisé au moment où l'index mitotique chez l'organisme est le plus élevé. Pour cela, le début des expositions a lieu au stade 50 de développement chez le xénope (Nieuwkoop et Faber, 1956).

Elevage et obtention des larves pour l'expérimentation

L'élevage et l'obtention de larves ont lieu au laboratoire EcoLaB sur le site de l'ENSAT. Les reproducteurs mâles et femelles sont élevés séparément, en aquarium acclimatés à 22 ± 1°C et soumis à une photopériode de 8h de jour et 16h de nuit. Ils sont nourris deux fois par semaine de granulés pour élevage piscicole (Trouw France SA) et une fois par semaine de cœur de bœuf.

L'accouplement et l'obtention de pontes sont stimulés par injection hormonale du couple de reproducteurs préalablement isolés (mâle : 50 UI de Gonadotrophine Sérique de jument 500 [Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin, PMSG ; MSD, France] ; femelle : 750 UI de Gonadotrophine Chorionique Humaine GCH 1500 [Human Chorionic Gonadotropin, HCG ; MSD, France]). Après la ponte, les adultes sont replacés en aquarium d'élevage et seront de nouveau aptes à se reproduire après trois mois. L'éclosion des œufs survient environ 48h après la ponte. Les larves sont alors transférées en aquariums isolés et nourries quotidiennement de paillettes déshydratées commercialisées pour poissons d'ornement (Tétraphyll®, composition analytique présentée en annexe 1) préalablement broyées en fines particules. Le stade 50 de développement (Nieuwkoop and Faber, 1956) survient au bout de deux à trois semaines et est caractérisé par une constriction à la base du membre postérieur (figure 8).

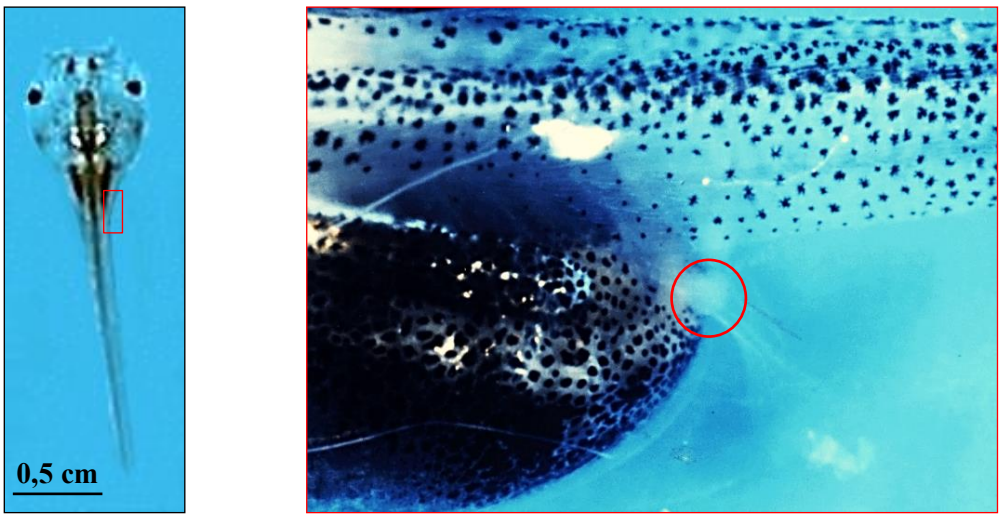


Figure 8 : Larves de *Xenopus laevis* au stade 50 de développement (Nieuwkoop et Faber, 1956). Larve entière, vue dorsale (à gauche), et agrandissement centré au niveau des membres postérieurs (cadre rouge), vue latérale (à droite). Le cercle rouge met en évidence la constriction à la base du membre postérieur, caractéristique de ce stade de développement. Source : (Mouchet, 2002).

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Bertrand, J., 1999. Mouvements des diatomées VI. Les efforts pendant le déplacement apical Mesures, analyses, relations: longueur, vitesse, force. Cryptogam. Algol. 20, 43–57. doi:10.1016/S0181-1568(99)80006-3

Bisthoven, L., Timmermans, K., Ollevier, F., 1992. The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in Chironomus gr. thummi larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. Hydrobiologia 239, 141–149. doi:10.1007/BF00007671

Bourrelly, P., 1968. Les Algues d'eau douce. Initiation à la Systématique : Tome II. Les Algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xantophycées et Diatomées. Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Branco, D., Lima, A., Almeida, S.F.P., Figueira, E., 2010. Sensitivity of biochemical markers to evaluate cadmium stress in the freshwater diatom Nitzschia palea (Kützing) W. Smith. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 99, 109–117. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.010

Calevro, F., Campani, S., Filippi, C., Batistoni, R., Deri, P., Bucci, S., Ragghianti, M., Mancino, G., 1999. Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian Pleurodeles waltl and regeneration in the planarian Dugesia etrusca. Aquat. Ecosyst. Health Manag. 2, 281–288. doi:10.1016/S1463-4988(99)00032-9

Canadian Phycological Culture Centre, n.d. CHU-10 (Modified by J. Acreman, CPCC) https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/chu-10 Consulté le 09/08/14.

Corcoll, N., Bonet, B., Morin, S., Tlili, A., Leira, M., Guasch, H., 2012. The effect of metals on photosynthesis processes and diatom metrics of biofilm from a metal-contaminated river: A translocation experiment. Ecol. Indic. 18, 620–631. doi:10.1016/j.ecolind.2012.01.026

Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F., 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). Ecol. Indic. 9, 621–650. doi:10.1016/j.ecolind.2008.06.003

Debenest, T., 2007. Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 88, 88–94. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.011

Desai, S.R., Verlecar, X.N., Nagarajappa, Goswami, U., 2006. Genotoxicity of cadmium in marine diatom Chaetoceros tenuissimus using the alkaline Comet assay. Ecotoxicol. Lond. Engl. 15, 359–363. doi:10.1007/s10646-006-0076-2

Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.-M., 2008. Exposure of Chironomus riparius larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. Chemosphere 71, 574–581. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.029

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

Faria, M.S., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2007. The use of Chironomus riparius larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 218–226. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.018

Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 292, 83–99. doi:10.1016/0165-1161(93)90010-W

Flament, S., Kuntz, S., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Tankozic, C., Penrad-Mobayed, M., Auque, G., Shirali, P., Schroeder, H., Chardard, D., 2003. Effect of cadmium on

gonadogenesis and metamorphosis in Pleurodeles waltl (urodele amphibian). Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 64, 143–153.

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

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

Gauthier, L., Van der Gaag, M.A., L'Haridon, J., Ferrier, V., Fernandez, M., 1993. In vivo detection of waste water and industrial effluent genotoxicity: use of the Newt Micronucleus Test (Jaylet Test). Sci. Total Environ. 138, 249–269.

Ghosh, M., Gaur, J.P., 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. Aquat. Bot. 60, 1–10. doi:10.1016/S0304-3770(97)00073-9

Griffiths, R.W., 1992. Effects of pH on Community Dynamics of Chironomidae in a Large River near Sudbury, Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 76–86. doi:10.1139/f92-302

Guo, R., Lee, M.-A., Ki, J.-S., 2013. Different transcriptional responses of heat shock protein 70/90 in the marine diatom Ditylum brightwellii exposed to metal compounds and endocrine-disrupting chemicals. Chemosphere 92, 535–543. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.052

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt Pleurodeles waltl to detect mutagens in fresh-water pollution. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 164, 245–257. doi:10.1016/0165-1161(86)90058-0

Lagauzère, S., Boyer, P., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of Chironomus riparius larvae (Insecta, Diptera) and Tubifex tubifex worms (Annelida, Tubificidae). Chemosphere 76, 324–334. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.062

Le Curieux, F., Giller, S., Gauthier, L., Erb, F., Marzin, D., 1995. Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles, using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. Mutat. Res. Toxicol. 341, 289–302. doi:10.1016/0165-1218(95)90100-0

Mouchet, F., 2002. Validation du test comète sur larves d'amphibiens (Xenopus laevis et Pleurodeles waltl) et application du potentiel génotoxique de sols, sédiments et déchets contaminés : comparaison avec le test micronoyau amphibien (Thèse de doctorat). Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2006. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (Xenopus laevis and Pleurodeles waltl) using

the comet assay and the micronucleus test. Environ. Toxicol. 21, 264–277. doi:10.1002/tox.20180

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Jourdain, M.J., Ferrier, V., Devaux, A., 2005. Biomonitoring of the genotoxic potential of draining water from dredged sediments, using the comet and micronucleus tests on amphibian (Xenopus laevis) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). J. Toxicol. Environ. Health A 68, 811–832. doi:10.1080/15287390590930234

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., 2007. Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian Ambystoma mexicanum. Nanotoxicology 1, 149–156. doi:10.1080/17435390701556080

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2008. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 87, 127–137. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.011

Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in Chironomus riparius. Chemosphere 92, 592–599. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.060

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland Pub. Co.

Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A.-M., Chelule, P.K., Focke, W.W., Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate Chironomus tentans larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 416–423. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.012

OECD, 2004a. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2004b. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Pandey, L.K., Kumar, D., Yadav, A., Rai, J., Gaur, J.P., 2014. Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. Ecol. Indic. 36, 272–279. doi:10.1016/j.ecolind.2013.08.002

Pascoe, D., Williams, K.A., Green, D.W.J., 1989. Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence. Hydrobiologia 175, 109–115. doi:10.1007/BF00765121

Péry, A.R.R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R., Garric, J., 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on Chironomus riparius based on cytosolic accumulation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 869–873. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.04.009

Postma, J.F., Davids, C., 1995. Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed Chironomus riparius (Diptera) during consecutive generations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 30, 195–202. doi:10.1006/eesa.1995.1024

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. The Diatoms: biology & morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge [England]; New York.

Siboulet, R., Grinfeld, S., Deparis, P., Jaylet, A., 1984. Micronuclei in red blood cells of the newt Pleurodeles waltl Michah: induction with X-rays and chemicals. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 125, 275–281. doi:10.1016/0027-5107(84)90077-0

Stevenson, R.J., Pan, Y., 1999. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms, in: The Diatoms. Cambridge University Press.

Van Den Hoek, C., 1995. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press.

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: "A sticky story." Nanotoxicology 1–11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Wentsel, R., McIntosh, A., McCafferty, W., 1978. Emergence of the midge chironomus tentans when exposed to heavy metal contaminated sediment. Hydrobiologia 57, 195–196. doi:10.1007/BF00014573

Williams, K.A., Green, D.W.J., Pascoe, D., Gower, D.E., 1987. Effect of cadmium on oviposition and egg viability in Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 86–90. doi:10.1007/BF01606563

Zoll-Moreux, C., Ferrier, V., 1999. The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in Xenopus : Two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Res. 33, 2301–2314.

Chapitre III

Ecotoxicité des NP de CeO_2 – Etudes monospécifiques

Les essais monospécifiques (*i.e.* exposition d'une seule espèce) standardisés permettent d'évaluer la toxicité de contaminants de manière relativement rapide et sur de larges gammes de concentrations. Ces tests hautement spécifiques et la plupart du temps réalisés en conditions standardisées et contrôlées au laboratoire, permettent de limiter la variabilité des réponses observées. Ils représentent donc un outil particulièrement intéressant dans le cadre d'une première approche d'évaluation de la toxicité de contaminants.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Chemosphere* (Bour *et al*., 2015). Il présente les effets de deux types de NP de CeO_2 sur quatre espèces, *N. palea*, *C. riparius*, *X. laevis* et *P. waltl.*, en conditions standardisées.

La description des Matériels et Méthodes dans les publications des journaux de revue scientifiques doit être concise. Par conséquent, certains éléments non indispensables sont décrits de manière succincte dans la publication suivante, et le lecteur est invité à se référer à des publications antérieures pour des méthodes plus détaillées. Un complément méthodologique est donc présenté en première partie de ce chapitre afin d'apporter plus de détails sur les méthodes et principes des essais réalisés.

1. Matériels et méthodes

1.1 Caractérisation des NP

La caractérisation des NP en suspension est effectuée grâce à plusieurs paramètres. Le potentiel zêta (ζ) permet de déterminer la susceptibilité des NP à s'agréger. Il s'agit du potentiel électrique des NP mesuré au niveau de leur plan de cisaillement (annexe 3). Le diamètre hydrodynamique des NP, ou agrégats de NP, présents en suspension est déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). Il s'agit du diamètre des agrégats, mesuré au niveau de leur plan de cisaillement. Le potentiel ζ et le diamètre hydrodynamique des NP sont donc indicatifs de la stabilité des NP en suspension. Les principes régissant la stabilité des suspensions de NP, ainsi que les principes des mesures de potentiel ζ et de diamètre hydrodynamique, sont présentés de manière plus détaillée en annexe 3.

La forme et la taille primaire des NP en suspension sont déterminées par observation directe, en Microscopie Electronique à Transmission (MET). Les observations sont réalisées au Service Commun de Microscopie Electronique TEMSCAN de Toulouse (L. Datas). Comme son nom l'indique, le principe de la MET est basé sur l'obtention d'une image par transmission d'éléctrons suite à leur passage à travers l'échantillon. Brièvement, la partie

supérieure de l'appareil comprend un canon à électrons qui génère un faisceau d'électrons. Celui-ci est accéléré et orienté sur l'échantillon, très fin (50 – 100 nm). Les électrons traversent alors l'échantillon différemment suivant sa densité et sa nature chimique. Les électrons transmis sont ensuite analysés et transformés en image photonique et en signal analogique, permettant un traitement numérique des images.

La concentration en NP d'une suspension est déterminée par mesure de la concentration en Ce, par spectrométrie de masse quadripolaire par plasma à couplage inductif (ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Cette technique est basée sur la séparation, l'identification et la quantification d'éléments chimiques en fonction de leur charge et de leur masse. Le principe d'ICP-MS est présenté en annexe 4.

1.2 Détermination de la toxicité chez *C. riparius*

1.2.1 Inhibition de croissance et retard de développement

L'inhibition de croissance et le retard de développement des larves de chironome sont déterminés à la fin d'une exposition de 7 jours (AFNOR, 2004). Les larves sont photographiées sous loupe binoculaire (Olympus SZX7) équipée d'un appareil photographique (Olympus E-620) et mesurées grâce au logiciel ImageJ® afin d'évaluer l'inhibition de croissance. Les larves sont ensuite décapitées à la base de la capsule céphalique. Celle-ci est alors photographiée et mesurée dans sa largeur (figure 9). La taille de la capsule céphalique permet de déterminer le stade de développement des larves (Environnement Canada, 1997), indiquant alors un éventuel retard de développement.

Le traitement statistique des données est effectué avec le logiciel SigmaPlot 12.0. Les tailles des larves sont comparées par analyse de la variance. L'égalité des variances et la normalité de distribution de la population sont vérifiées en premier lieu (test de Shapiro-Wilk). En cas de distribution non normale, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (ou ANOVA à un facteur sur les rangs) est réalisé, suivi du test de Dunn afin d'analyser les différences entre groupes. La taille de la capsule céphalique permet de déterminer le stade de développement des larves. Celles-ci sont alors réparties en deux groupes suivant qu'elles ont atteint le stade IV de développement ou non (*i.e.* retard de développement) et les répartitions des différentes conditions d'exposition sont comparées grâce au test du χ^2.



Figure 9 : Mesure de la largeur de la capsule céphalique d'une larve de chironome. Le trait rouge indique le niveau où la mesure est effectuée.

1.2.2 Tératogénicité

Les substances tératogènes sont susceptibles d'induire des malformations des pièces buccales chez les larves de chironome. Celles-ci peuvent apparaître au moment de la formation d'une nouvelle capsule céphalique chitineuse, lors de chaque mue. La probabilité d'observer de telles déformations est donc plus importante chez des larves de stade IV, chez qui le nombre de mues effectuées est le plus important.

L'évaluation de l'impact tératogène des NP est donc réalisée sur les capsules céphaliques des larves au stade IV de développement, suite à une exposition de 7 jours. Pour cela, les capsules sont récupérées après décapitation des larves et stockées en éthanol (70%). Les capsules céphaliques sont décolorées par traitement avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 15%) (Sigma, France) chauffée à 95°C pendant 12 minutes. La réaction est stoppée en remplaçant la solution par de l'éthanol à 70% durant 12h. Les capsules sont alors montées sur lame de microscope avec du milieu de montage Eukitt® (Fluka, France).

L'observation microscopique des capsules céphaliques permet ensuite d'évaluer les malformations des parties buccales (mentum et mandibules) chez le chironome. En 1988, Warwick et Tisdale décrivent dans leurs travaux les parties buccales de chironome ne présentant pas d'anomalies, ainsi que l'ensemble des anomalies observées jusqu'alors. Dix ans plus tard, Vermeulen *et al*. (1998) proposent une méthode de notation des malformations en fonction de leur gravité. Brièvement, chaque dent est virtuellement découpée en quarts, et chaque quart atteint d'une anomalie entraîne un score de 1. La somme des anomalies donne alors le score final de la capsule céphalique étudiée. L'analyse que nous faisons des malformations des parties buccales est basée sur l'ensemble de ces travaux, et prend en compte la fréquence d'apparition de chacune des malformations, la fréquence d'apparition globale, et le score moyen de gravité obtenu pour chaque traitement. Quelques exemples de malformations sont présentés en figure 10.

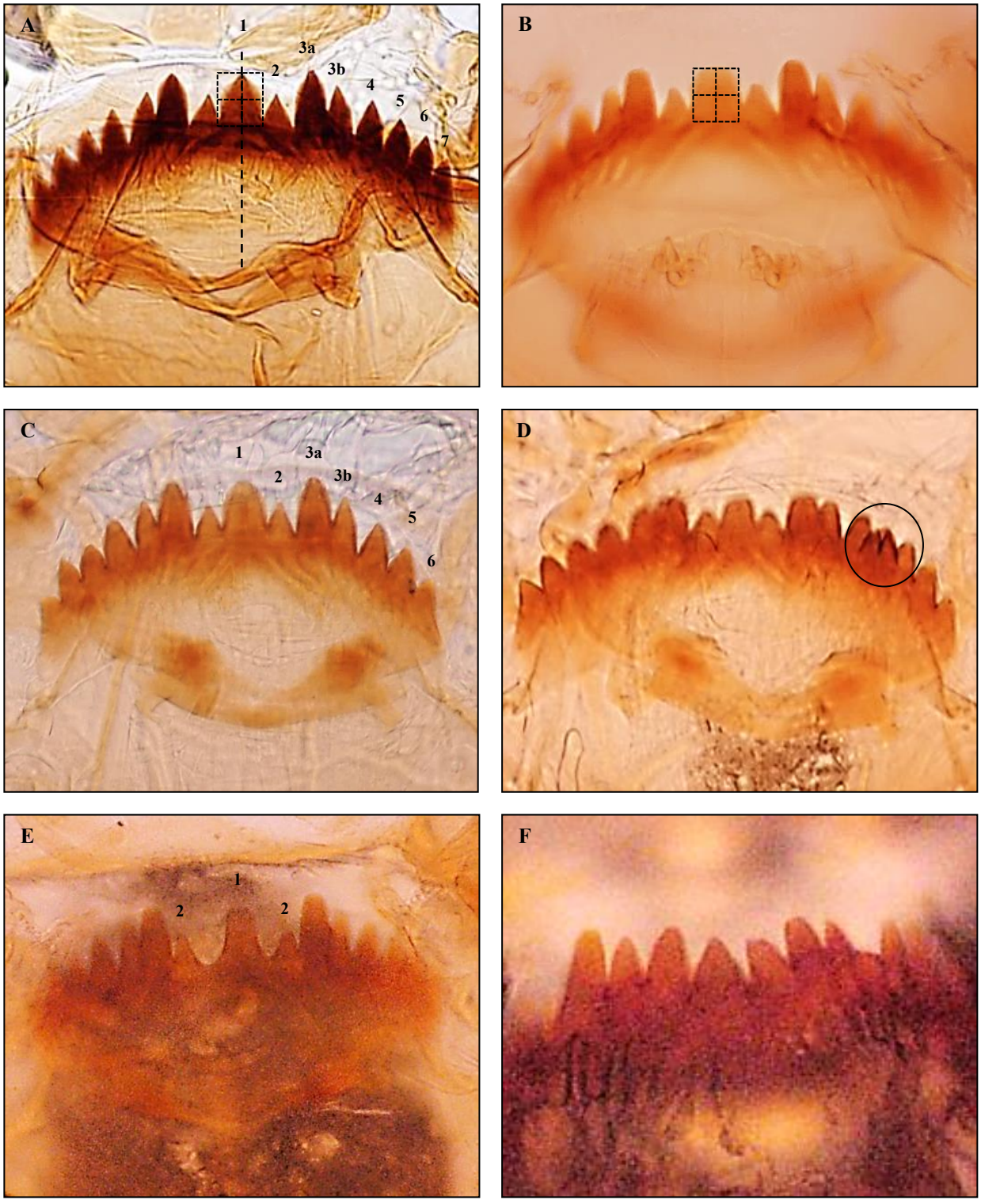


Figure 10 : Exemples de malformations du mentum chez les larves de *C. riparius*. Grossissement x400. (A) Mentum non déformé. Le trait en pointillés indique l'axe de symétrie. Le cadre en pointillés indique le découpage virtuel de la dent centrale en quarts, permettant d'attribuer un score de malformation. Les dents sont numérotées de 1 à 7. (B) Dent centrale présentant une taille anormalement importante. Le découpage montre que la surface de la dent est plus importante dans les deux quarts supérieurs, par rapport à un mentum normal. (C) Dent manquante (n° 7). (D) Dents surnuméraires, indiquées par le cercle. (E) Espaces de Köhn entre la dent centrale et les dents n°2. (F) Malformation globale, l'homologie des dents ne peut pas être déterminée, un score maximal de 16 est appliqué.

Le traitement statistique des données est effectué avec le logiciel SigmaPlot 12.0. Les scores de gravité sont comparés par analyse de la variance (test non paramétrique de Kruskall-Wallis, ou ANOVA à un facteur sur les rangs). Le lien entre l'incidence des malformations et les conditions d'exposition est évalué par le test du χ^2, en comparant le nombre d'individus ayant des malformations au nombre d'individus « sains ».

1.3 Exposition des larves d'amphibiens

Les méthodes d'exposition de *X. laevis* et de *P. waltl.* sont similaires, et se déroulent selon la procédure normalisée du test micronoyau amphibiens (AFNOR, 2000 ; ISO, 2006). L'exposition débute avec des larves de stade 50 de la table normale de Nieuwkoop et Faber (1956) dans le cas de *X. laevis* et des larves de stade 53 de la table chronologique de développement (Gallien et Durocher, 1957) dans le cas de *P. waltl.*. Des lots de 15 ou 20 individus (pour *X. laevis* et *P. waltl.* respectivement) sont réalisés à partir de larves provenant d'une même ponte, afin de diminuer la variabilité génétique interindividuelle. L'exposition est réalisée en cristallisoirs contenant 100 ml de milieu (eau reconstituée ; AFNOR, 2000 ; annexe 1) par larve. Les conditions d'essai sont semi-statiques, c'est-à-dire que le milieu d'exposition (milieu + contaminant le cas échéant) est renouvelé quotidiennement. Le nourrissage est quotidien et consiste en une pincée de Tétraphyll® réduit en poudre ou des larves de chironome congelées (pour *X. laevis* et *P. waltl.* respectivement). L'exposition a lieu dans une pièce thermostatée, de façon à maintenir la température des milieux à 22°C ± 0,5°C et soumise à une photopériode de 16h. La température et le pH sont vérifiés régulièrement. Ce dernier doit être compris entre 6 et 8.

Les suspensions mères de nanoparticules sont ajoutées directement au milieu d'exposition, en volumes nécessaires à l'obtention des concentrations désirées. Sont également réalisés un témoin négatif, un témoin positif d'effet et un témoin « citrate », permettant de contrôler la toxicité de l'enrobage des NP enrobées. Le témoin négatif (T_-) consiste en du milieu d'exposition seul. Le témoin positif d'effet (T_+) consiste en du cyclophosphamide monohydrate (ISO 21427-1, 2006 ; Sigma, France) à 20 ou 2 mg/L (pour *X. laevis* ou *P. waltl.* respectivement). Il s'agit d'un mutagène indirect standard qui requiert une activation métabolique par le foie avant de devenir actif. Enfin, le témoin citrate (T_{citr}) est obtenu par ajout d'une solution de citrate d'ammonium à une concentration correspondant à la concentration en citrate la plus importante présente lors de l'exposition aux NP enrobées.

1.4 Détermination de la toxicité chez *X. laevis* et *P. waltl.*

1.4.1 Toxicité chronique : inhibition de croissance

Le paramètre étudié chez le modèle amphibien pour évaluer la toxicité chronique est l'inhibition de croissance. Pour cela, les larves sont photographiées en début (T_0) et fin (T_{12}) d'exposition et mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'images Mesurim (Madre, 2006). La comparaison des tailles des larves permet (i) de confirmer qu'il n'y a pas de différence de taille significative à T_0 entre les larves d'un même lot ni entre les différents lots (*i.e.* homogénéité des larves en début d'exposition), (ii) d'étudier la différence significative éventuelle pour un même lot entre T_0 et T_{12} (*i.e.* croissance moyenne des animaux) et (iii) d'étudier la différence significative éventuelle de taille à T_{12} entre les différents lots par rapport au témoin (*i.e.* inhibition de croissance par rapport au témoin).

Le traitement statistique des données brutes est réalisé à l'aide du logiciel SigmaStat 3.1. On teste en premier lieu la normalité de distribution de la population et l'égalité de la variance. Dans le cas où ces hypothèses sont vérifiées, les valeurs des différents groupes d'exposition sont comparées par analyse de la variance, grâce au test ANOVA à un facteur (test paramétrique). Dans le cas inverse, l'analyse de la variance est effectuée sur les rangs grâce au test non paramétrique de Kruskall-Wallis. Dans le cas où une différence significative entre les groupes est détectée, l'analyse est affinée grâce au test de Dunnett, qui permet une comparaison multiple des groupes versus un groupe témoin, afin d'isoler le(s) groupe(s) responsable(s) de cette différence. Si les groupes sont de taille différente, le test de Dunnett est remplacé par le test de Dunn, moins puissant mais assurant la même fonction. Le test statistique de Mann-Whitney est également utilisé pour effectuer une comparaison deux à deux.

Dans un souci de clarté des résultats, la représentation graphique des résultats montre les taux de croissance (τ) moyens des groupes d'exposition, calculés comme suit :

$$\tau = \frac{\bar{c} - \bar{c}_{T^-}}{\bar{c}_{T^-}} \text{ X } 100$$

Où $\bar{c}$ est la croissance moyenne d'un groupe d'exposition ($\bar{c}_{T^-}$ la croissance moyenne du groupe témoin), calculée comme la différence entre la taille moyenne du groupe à T_{12} et la taille moyenne du groupe à T_0. Le taux de croissance étant calculé sur des moyennes et non sur des valeurs individuelles, il n'est pas possible de représenter des barres d'erreur. En

revanche, les différences statistiques affichées sous forme d'astérisque (*) sont calculées à partir des valeurs brutes de tailles.

1.4.2 Génotoxicité

1.4.2.1 Principe du test « micronoyaux »

Les micronoyaux (MN) sont de petites masses intra-cytoplasmiques de chromatine ayant l'apparence de petits noyaux. Il s'agit de fragments de chromosomes, ou de chromosomes entiers n'ayant pas migré à l'un des pôles du fuseau mitotique lors de la division cellulaire (figure 11). Bien que leur formation ait lieu pendant l'anaphase de la division cellulaire, ils restent observables à l'interphase (Mouchet, 2002).

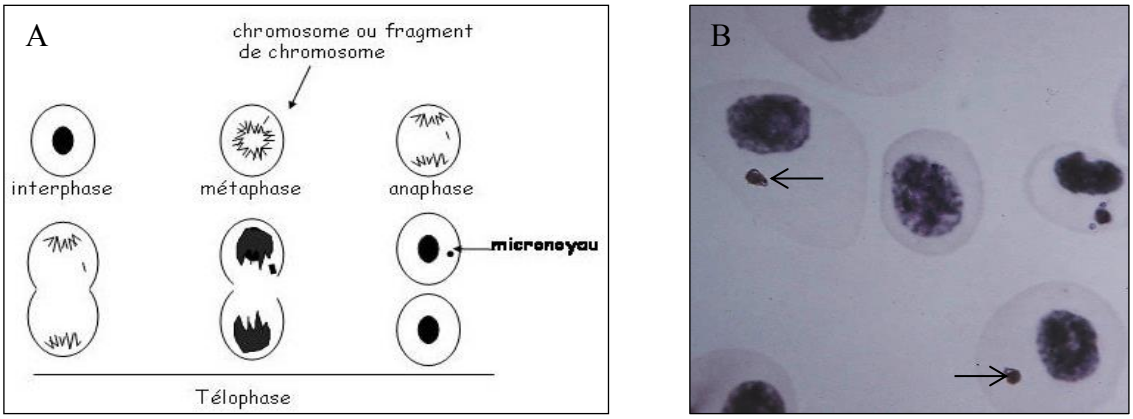


Figure 11 : (A) Schéma[1] illustrant le principe de la formation d'un micronoyau au cours d'une mitose. (B) Erythrocytes micronucléés de pleurodèles[2]. Les flèches indiquent des micronoyaux. (Sources : [1]Mouchet, 2002 ; [2]Centre de Biologie du Développement, Toulouse).

La formation des MN ayant lieu au moment de la division cellulaire, l'exposition doit avoir lieu au moment où l'index mitotique chez l'organisme est élevé. Cela correspond au stade 50 de développement de la table normale de Nieuwkoop et Faber (1956) chez *X. laevis*, ou au stade 53 de développement de la table de Gallien et Durocher (1957) chez *P. waltl.*, qui correspondent à une période d'érythropoïèse intense chez ces organismes. La fin de l'exposition survient avant la métamorphose pour les deux espèces, au-delà de laquelle l'érythropoïèse devient insuffisante pour induire un index mitotique élevé.

Deux mécanismes principaux peuvent être à l'origine de la formation des MN : (i) les cassures chromosomiques et (ii) les altérations de la structure et/ou du fonctionnement de l'appareil mitotique. Les cassures chromosomiques résultent de cassures directes ou indirectes de l'ADN (réplication d'un ADN endommagé, inhibition de la synthèse de l'ADN, ou

apoptose), qui conduisent à l'apparition de fragments chromosomiques. Ces derniers, dépourvus de centromères, ne peuvent plus contracter de liens avec les protéines du fuseau mitotique lors de l'anaphase. Des altérations du fuseau mitotique, des kinétochores ou d'autres composants protéiques de l'appareil mitotique peuvent empêcher au moment de l'anaphase la migration aux pôles d'un chromosome pourtant entier. Ce chromosome lui-même forme alors un micronoyau.

Les résultats du test micronoyau reflètent ainsi le mode d'action d'agents clastogènes (*i.e.* ayant pour cible l'ADN et induisant des cassures chromosomiques) et/ou aneugènes (*i.e* cible la plupart du temps non ADN, entraînant une aneuploidie) (Mouchet, 2002).

1.4.2.2 Détermination de la génotoxicité

A la fin de l'exposition, les larves sont immobilisées par immersion dans une solution de tricaïne méthane sulfonate (MS 222, Sandoz). Un échantillon sanguin est ensuite obtenu par ponction intracardiaque. Pour cela, une micropipette taillée en biseau et héparinée (solution d'héparine lyophilisée à 7‰ de chlorure de sodium), est introduite dans le ventricule, dont les contractions permettent la montée du sang dans la micropipette. Un frottis sanguin est alors réalisé pour chaque larve à l'aide d'une lame rodée.

Ces étalements sanguins sont immédiatement séchés sous air comprimé à pression réduite. Ils sont ensuite fixés au méthanol absolu pendant 10 mn et colorés pendant 30 mn par immersion dans une solution d'hématoxyline de Groat (solution équivolume de 10 g d'hématoxyline de Groat pour 1 litre d'alcool 95° et de 20 g d'hémalum de fer ammoniacal pour 1 litre d'eau à 1,6% d'acide sulfurique concentré). Ce colorant est spécifique du matériel nucléaire des cellules. Après rinçage à l'eau courante, les lames sont finalement séchées à l'air libre avant d'être observées.

La lecture des frottis sanguins est réalisée en microscopie à immersion (Olympus CX41). Les érythrocytes à micronoyaux sont manuellement dénombrés en examinant 1000 érythrocytes par lame. Pour chaque larve, on détermine ainsi le nombre d'érythrocytes micronucléés présentant un, deux, trois ou davantage de micronoyaux pour 1000 érythrocytes (noté EMN‰).

Le traitement statistique des résultats se fait selon le test de McGill (McGill *et al*., 1978), basé sur la comparaison des rangs de la médiane et des quartiles. Il permet en particulier le traitement de résultats obtenus sur de petits échantillons ($n > 7$) dont la distribution des valeurs n'obéit pas à une loi normale. Dans notre cas, un échantillon est constitué de n valeurs correspondant au nombre de frottis (donc de larves) réalisés par groupe d'exposition.

Pour chaque groupe, la conduite du test consiste en la détermination des rangs de la médiane (M), du quartile inférieur (QI) et du quartile supérieur (QS), dont le calcul est indiqué dans le tableau 4.

Tableau 4 : Formules de calcul des rangs de la médiane (M), du quartile inférieur (QI) et du quartile supérieur (QS).

	Echantillon comportant un nombre pair de valeurs (n = 2p)	Echantillon comportant un nombre impair de valeurs (n = 2p + 1)
Rang de M	[p + (p+1)] / 2	p + 1
Rang de QI	(p + 1) / 2	(p / 2) + 1
Rang de QS	p + [(p + 1) / 2]	(3p / 2) + 1

On déduit ensuite de ce calcul la valeur de M, QI et QS. Pour cela, les valeurs d'EMN‰ sont classées par ordre croissant, déterminant ainsi un rang à chacune des valeurs. Les valeurs de M, QI et QS sont égales aux valeurs d'EMN‰ de rang correspondant. On calcule enfin l'intervalle de confiance au seuil de sécurité de 95% (IC95) comme suit :

$$\mathrm{IC} = \mathrm{M} \pm 1{,}57 \times \frac{\mathrm{EIQ}}{\sqrt{n}}$$

où M est la valeur de la médiane, n est le nombre d'individus par groupe et EIQ la valeur de l'écart interquartile (QS – QI).

Interprétation des résultats :

La différence entre les médianes de deux échantillons est significative si leurs intervalles de confiance n'ont pas de point commun. Pour qu'un test micronoyaux soit validé, la médiane du lot témoin négatif doit être statistiquement différente de celle du lot témoin positif. Le résultat d'un lot est considéré :

- Positif, lorsque la médiane est supérieure au double de celle du lot témoin et si les intervalles de confiance ne se chevauchent pas. Le milieu d'exposition est alors considéré génotoxique pour les larves dans les conditions du test.

- Négatif, lorsque l'intervalle de confiance du lot traité n'est pas distinct de celui du lot témoin. Le milieu d'exposition n'est pas génotoxique pour les larves dans les conditions du test.

2. Toxicité de NP de CeO_2 à différents niveaux trophiques ; effets sur diatomées, chironomes et amphibiens

Cette partie fait l'objet d'un article publié dans le journal *Chemosphere* (Bour *et al*., 2015). Les principaux résultats sont présentés dans le résumé ci-dessous.

RESUME :

Cette étude a pour but de déterminer la toxicité de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2 NP) sur quatre espèces représentatives de différents niveaux trophiques : les diatomées *Nitzschia palea*, les larves du chironome *Chironomus riparius* et les larves des amphibiens *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl.*. Les deux types de CeO_2 NP testés (nommés NP1 et NP2) ont des propriétés différentes : les NP1 sont sphériques, de petite taille (2 – 5 nm), et possèdent un enrobage de citrate ; les NP2 sont des plaquettes de plus grande taille (20 – 60 nm), non enrobées. Les expositions sont réalisées sur les espèces isolées, en conditions standardisées. La toxicité aiguë a été déterminée chez les quatre espèces (mortalité à 48h pour les diatomées et les chironomes ; à 96h pour les amphibiens) à des concentrations de NP comprises entre 0,1 et 100 mg/L. L'inhibition de croissance, l'induction de malformations du mentum (tératogénicité) et les taux et temps d'émergence ont été étudiés chez *C. riparius* comme paramètres de toxicité sublétale, de 0,01 à 1 mg/L de NP. L'inhibition de croissance et l'induction de micronoyaux érythrocytaires (génotoxicité) ont été déterminées chez *X. laevis* et *P. waltl.* après 12 jours d'exposition de 0,1 à 10 mg/L. Aucune mortalité n'a été observée sur les différentes espèces à court terme (48 et 96h), et ce même aux plus fortes concentrations testées. En revanche, un taux de mortalité significatif (35%) a été observé chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition à 10 mg/L de NP2. De plus, aucune toxicité chronique n'a été mise en évidence chez *C. riparius*, malgré une importante ingestion de NP. Une inhibition de croissance a été observée chez *X. laevis* en présence de NP1 et NP2, à 1 et 10 mg/L, mais n'a été observée qu'en présence de NP2 à 10 mg/L chez *P. waltl.*. Aucune génotoxicité n'a été observée chez *X. laevis*. Des effets génotoxiques dose-dépendants ont été mis en évidence chez *P. waltl.* exposé aux NP2. Plusieurs hypothèses sont discutées pour expliquer les différences de réponses des organismes à l'exposition aux NP. Les défenses naturelles des organismes, leur physiologie et les voies d'expositions aux NP sont autant de paramètres variables d'une espèce à l'autre, pouvant expliquer les différences observées. Enfin, les propriétés des NP, telles que leur taille, leur forme ou encore l'enrobage de citrate des NP1, peuvent expliquer les différences d'effets mises en évidence entre NP1 et NP2.

Toxicity of CeO_2 nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians

Agathe Bour, Florence Mouchet*, Laurent Verneuil, Lauris Evariste, Jérôme Silvestre, Eric Pinelli and Laury Gauthier

Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France
CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

HIGHLIGHTS

- The ecotoxicity of two types of CeO_2 nanoparticles was studied.
- No toxicity was observed on diatoms or chironomid larvae.
- Amphibian larvae exhibited mortality, growth inhibition and genotoxicity.
- Toxicities were different depending on the species and the type of NP.

ABSTRACT

The aim of the present work is to provide wider information on the toxicity of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) in aquatic environments, by studying the toxicity of two types of CeO_2 NPs for four species (diatoms *Nitzschia palea*, the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius,* and the amphibian larvae *Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl.*). The two types of CeO_2 NPs have different intrinsic properties: some of them are small citrate-coated spheres (2 – 5 nm), and the others are larger uncoated plates (20 – 60 nm). Acute toxicity (mortality at 48 or 96h, depending on the test-organism) was assessed for the four species, from 0.1 to 100 mg/L of NPs. Sub-lethal effects were assessed on chironomids exposed between 0.01 and 1 mg/L of NPs. Mortality, growth inhibition and genotoxic effects were evaluated on amphibian larvae from 0.1 to 10 mg/L. Results reveal that no acute toxicity occurs on any species after short exposures, even at the highest concentrations. Mortality (35%) is observed on *Xenopus* larvae after 12 days of exposure at the highest concentration of one type of NPs. No significant effects were observed on chironomids during chronic exposure. *Xenopus* larvae growth was inhibited from 1 mg/L of both NPs while growth inhibition is observed on *Pleurodeles* only at the highest concentration of one type of NPs. No genotoxicity was observed on *Xenopus* but *Pleurodeles* exhibited dose-dependent genotoxic effects when exposed to one type of NPs. Observed differences in toxicity are discussed focusing on the studied compartment, routes of exposure, species and NPs.

1. Introduction

In recent years, an explosion in nanoparticles (NPs) production and use has taken place. These particles of less than 100 nm have unique physical and chemical properties, making them extremely attractive for applications in many consumer products (The Royal Society, 2004) or for military or medical purposes (Huang *et al*., 2011; Shao *et al*., 2011). It is thus very likely that a non-negligible part, directly released during their life cycle, enters the environment (Keller *et al*., 2013). However, environmental impacts of such releases are still relatively unknown. If no strict regulations are currently effective concerning NPs, several recommendations are already available for industry and toxicological testing (FDA, 2012a, 2012b; OECD, 2010a). The OECD also published a priority list for the testing of representative manufactured nanomaterials (OECD, 2010b), on which cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) appear.

Indeed, despite their important volume of production and use (fuel additives, coating, catalysis, cosmetics, *etc.*), there is a lack of information concerning their toxicity. Studies on CeO_2 NP ecotoxicity have been emerging these last few years, with different biological models: bacteria (Thill *et al*., 2006), terrestrial invertebrates (Roh *et al*., 2010), plants (Zhao *et al*., 2012), algae (Manier *et al*., 2013) and other aquatic organisms (Jemec *et al*., 2012). Authors also studied CeO_2 NP behavior in different aquatic environments and found that they tend to aggregate and sediment quickly (Keller *et al*., 2010; Quik *et al*., 2010), ending up in the sediment or at the sediment/water interface. This suggests that in the case of water contamination, exposure would affect not only organisms from the water column but also benthic organisms. These organisms are of prime importance from an ecological point of view, as they represent the base of the trophic chain.

Among them, diatoms are a valuable source of food for many aquatic organisms and are representative of numerous freshwater ecosystems. These benthic microalgae are well known bio-indicators for river pollution and are used for the evaluation of water quality (Debenest *et al*., 2008). Most of ecotoxicological studies on diatoms focus on heavy metals (Pandey *et al*., 2014) or pesticides (Debenest *et al*., 2010). Impacts of NPs on *Nitzschia palea* have so far been studied only once, with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (Verneuil *et al*., 2014). *Chironomidae* is an important group of benthic macroinvertebrates. Due to their short life cycle, small size and high density, different species of chironomids have been used in ecotoxicology. Among them, *Chironomus riparius* is commonly used to assess water and sediment quality. This species plays an important role in sediment reworking and is likely to bioaccumulate contaminants by sediment ingestion (Oberholster *et al*., 2011). To our knowledge, a few authors (Nair *et al*., 2013; Oberholster *et al*., 2011) have investigated NP toxicity on chironomids. Amphibian species are often used in ecotoxicity studies as representative species of the aquatic compartment. Among them, the anuran *Xenopus laevis* is widely used due to its high sensitivity to water contaminants, and a few authors have already tested different types of NPs (multi and double-walled CNTs, ZnO and TiO_2 NPs) effects on this organism (Mouchet *et al*. 2010; Nations *et al*. 2011; Zhang *et al*. 2012). *Xenopus* larvae are filter-feeders; contamination can therefore occur *via* skin contact and water filtration, but larvae can also graze biofilms at the surface of the sediment. As far as we know, this is the first

time the newt *Pleurodeles waltl.* is being used for the evaluation of NP toxicity.

The aim of the present work is to provide wider information on CeO_2 NP toxicity in aquatic environments. CeO_2 NP toxicity was studied on the four species cited above: *N. palea* (acute toxicity), *C. riparius* (teratogenicity, chronic and acute toxicities), *X. laevis* and *P. waltl.* (acute, chronic and genetic toxicities). Primary characterization of NPs was also undertaken in order to investigate basic characteristics.

2. Materials and methods

2.1 Nanoparticle preparation and characterization

A suspension of CeO_2 NPs was purchased (Nanobyk® 3810). These particles of 2 – 5 nm in size are coated with a tri-ammonium citrate layer. Non-coated CeO_2 NPs from Umicore Company (Nanograin®, Umicore) were provided as a powder preparation. NPs were suspended in ultrapure water at 10g/L (pH 3.1, homogenization in ultrasonic bath (Bioblock, typ 570 HF Freq 35 KHz) for 1 hour). Their primary sizes are comprised between 20 and 60 nm. These two types of CeO_2 NPs are further referred to as NP1 and NP2 respectively.

A Malvern zetasizer (Malvern Instruments Ltd) was used to control hydrodynamic diameter distribution (Dynamic Light Scattering method) and zeta potential. Transmission Electron Microscopy (TEM, Jeol Jem 2100, 200Kv, HR) was also performed for primary size and shape determination.

2.2 Organisms, breeding and toxicity assessment

2.2.1 Diatoms

N. palea algal cells (Canadian Phycological Culture Center, ref. CPCC-160) were axenically cultured in CHU 10 medium with Fe EDTA as iron source ($6.4 < pH < 6.6$). Medium was renewed 72h before the experiments and prior to inoculum preparation. Experiments were performed at 20 ± 1°C on a rotary shaker at 90 rpm under 16:8 light-dark cycles, with an illumination of 5500 lux. Exposure was realized according to Verneuil *et al.* (2014) in 12-well plastic plates. Each well was inoculated with $2.5x10^5$ cells/mL of *N. palea*, and diatoms were then grown for 24 h in experimental conditions, without agitation, to allow cell adherence and resumption of an exponential growth recovery. Afterward, CeO_2 NP suspensions were added to get the desired concentrations up to 100 mg/L. Plates were then placed in test conditions. Living cells were counted daily, and growth rate was assessed after 48h of exposure.

2.2.2 Chironomids

C. riparius larvae were obtained and grown at ECOLAB laboratory following standardized procedure (AFNOR, 2004).

Acute toxicity assessment consisted in 48h of exposure to CeO_2 NPs. Ten larvae per condition were exposed in 300 mL glass beakers (Pyrex®) containing reconstituted water (RW, AFNOR, 2004). Contamination was made *via* the water column, up to 100 mg/L. Negative control consisted in reconstituted water (RW) only. Mortality was recorded after 48h.

Growth inhibition and developmental delay are evaluated as chronic toxicity endpoints, following standardized procedures (AFNOR, 2004; OECD, 2004). Briefly, 48h old larvae are exposed to CeO_2 NPs up to 1 mg/L for 7 days, in static conditions. Glass beakers containing sediment and RW are contaminated *via* the water column and placed at 21±1°C, with gentle aeration, under 16:8 light-dark cycles (10 larvae per beaker, 7 beaker per condition). A citrate control was also carried out to exclude the role of citrate coating in

toxicity. Citrate concentration was chosen to correspond to the concentration present in 1 mg/L of CeO_2 NPs (*i.e.* the highest concentration tested). The larvae were fed every day with fish food solution (Tetramin®, France). At the end of the exposure, mortality was recorded and growth inhibition was determined by measuring surviving larvae (ImageJ® software). Cephalic capsule of each larvae were also measured in order to determine larval instars (Environnement Canada, 1997) and assess potential delays in development.

Teratogenicity was evaluated on cephalic capsules as described by Dias *et al.* (2008). Mouth part deformities were assessed and rated according to Warwick and Tisdale (1988) and Vermeulen *et al.* (1998). Treatment groups were compared based on their rating (seriousness of deformities) and on probability of occurrence of deformities (individual or total deformities).

Life-cycle toxicity was assessed by studying the emergence of chironomids. Exposure was realized in the same conditions as previously, according to the OECD standardized procedure (OECD, 2004). The number of adults was recorded every day until no emergence occurred for 4 consecutive days in control condition.

Mortality, organism sizes and emergence rates were compared with a Kruskall-Wallis test, followed by Dunn's test to analyze differences between groups. Probability of occurrence of mouth part deformities in chironomids was determined with the chi square test. All analyses were performed using SigmaPlot 12.0 software.

2.2.3 Amphibians

X. laevis and *P. waltl.* amphibian larvae were obtained and grown at ECOLAB laboratory as described in Mouchet *et al.* (2007, 2011).

Acute toxicity test was performed on *Xenopus* at larval stage 50 (Nieuwkoop and Faber, 1956) after 96h of exposure adapted from the 96h LC50 acute fish toxicity test (OECD, 1992). Groups of 10 larvae (three replicates per condition) were exposed for 96h under static conditions to CeO_2 NPs up to 100 mg/L, in 1L of RW. The number of dead larvae was recorded every day. Mortality, growth inhibition and genotoxicity were assessed on both amphibian species after twelve days of exposure, according to standardized procedures (ISO 21427-1, 2006). Groups of 20 *Xenopus* (Stage 50, Nieuwkoop and Faber, 1956) and 15 *Pleurodeles* (Stage 53, Gallien and Durocher, 1957) were exposed to CeO_2 NPs up to 10 mg/L in semi-static conditions. Positive control (cyclophosphamide (CP) (ISO 21427-1, 2006), a standard mutagen) and citrate control were also realized. The larvae were fed every day (Tetraphyll®). At the end of exposure, mortality was examined by counting dead animals and expressed as percentage. Chronic toxicity (growth inhibition) was evaluated by measuring the total body length of each larva at the beginning of the exposure and at the end of the exposure (analysis software (Madre, 2006)). Statistical analyses were performed on organisms' size using a Kruskall-Wallis test, followed by Dunn's test to analyze differences between groups. For the sake of clarity, graphic representation is based on growth rates (GR), calculated for each group as follows:

$$GR = (((AG) - (\text{negative control AG})) / \text{negative control AG})*100$$

with AG: average growth within a treatment group, determined as the difference between the average size at the end and the average size at the beginning of the experiment.

Genotoxicity was performed on blood samples obtained from anesthetized larvae

(tricaine methane sulfonate, Sigma, France). The number of erythrocytes containing one micronucleus or more (micronucleated erythrocytes, MNE) was determined in a sample of 1000 erythrocytes per larva. Results were expressed as number of MNE per thousand (MNE‰). The statistical method used is based on comparisons of medians, by determining the theoretical median for each group (McGill *et al*., 1978). The difference between the theoretical medians of the test groups and the theoretical median of the negative control group is significant if there is no overlap (95% certainty). In this case, the induction of micronucleus in exposed larvae is considered as a significant genotoxic response.

3. Results

3.1 Nanoparticle characterization

NP1 have a zeta potential in stock suspension of -28 ±8 mV and a hydrodynamic diameter of 8.5 ±0.2 nm. TEM characterization shows spherical NPs with diameter around 2 – 5 nm. NP2 are non-coated plates. Their zeta potential in stock suspension is +42 ±2 mV and they have a hydrodynamic diameter of 90 ±2 nm. TEM characterization shows heterogeneous sizes, ranging from 20 to 60 nm. TEM images of both types of CeO_2 NPs are shown in supporting information (SI, figure S1).

3.2 Toxicity on diatoms

Cell counting revealed similar growth rates among groups after 48h of exposure and up to 100 mg/L, showing no acute toxicity of CeO_2 nanoparticles on *N. palea* (figure S2).

3.3 Toxicity on chironomids

During the 48h exposure to NP2, visual observation of the larvae revealed white aggregates in digestive tracts (figure 1A), corresponding to ingested NPs. Despite this considerable ingestion, no mortality was observed up to 100 mg/L. Chironomids exposed to NP1 were not visually different from control. However, it cannot be concluded that NP1 were not ingested by the larvae.

The study of mouthpart deformities revealed no teratogenicity on *C. riparius*. Group comparison based on ratings revealed no teratogenicity, whatever the concentration or the types of CeO_2 NPs. Groups were also compared based on probability of deformity occurrence, and no difference between groups was highlighted either with this method.

No growth inhibition was observed on larvae after 7 days of exposure (figure S3), whatever the type of CeO_2 NP or the concentration. Similarly, cephalic capsule measurement revealed no significant differences between treatments groups, meaning no delay in larval development compared to control.

Total emergence was not significantly different between groups, ranging from 55% to 72% for negative control. Emergence kinetic was also similar among treatments, with the first emergences starting at day 16 post hatching, and last emergences occurring 6 days later, which corresponds to the standard kinetic of development of *C. riparius* (figure 2).

3.4 Toxicity on amphibians

When NP2 is added to the exposure medium, it becomes slightly milky and small white aggregates are quickly visible. White “masses” were observed in *Xenopus’* digestive tract (figure 1B) and were not observed in control or NP1 exposure conditions. It was thus concluded that these “masses” were NP2 aggregates ingested by the larvae.

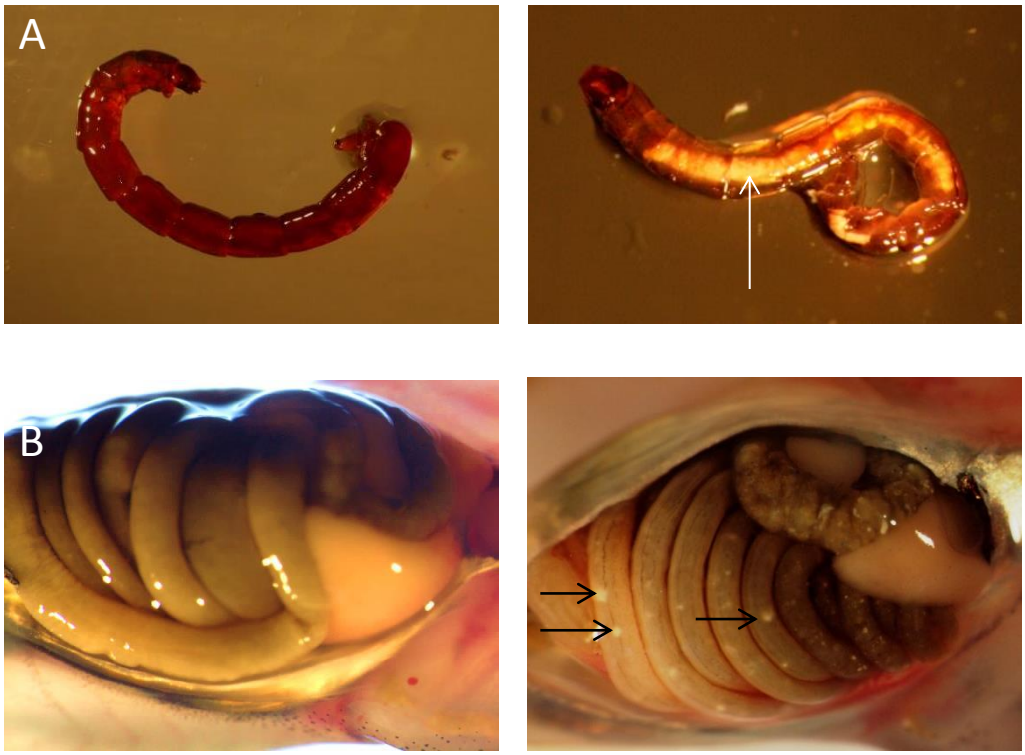


Fig. 1. (A) Macro observation (x8, white light) of *C. riparius* after 48h of exposure to NP2 (right) compared to negative control larvae (left). White arrow shows the content of the digestive tract in the exposed larvae. (B) Macro observation (x8, white light) of *X. laevis* after 12 days of exposure to NP2 (right) compared to negative control larvae (left). Black arrows show NP aggregates in the digestive tract.

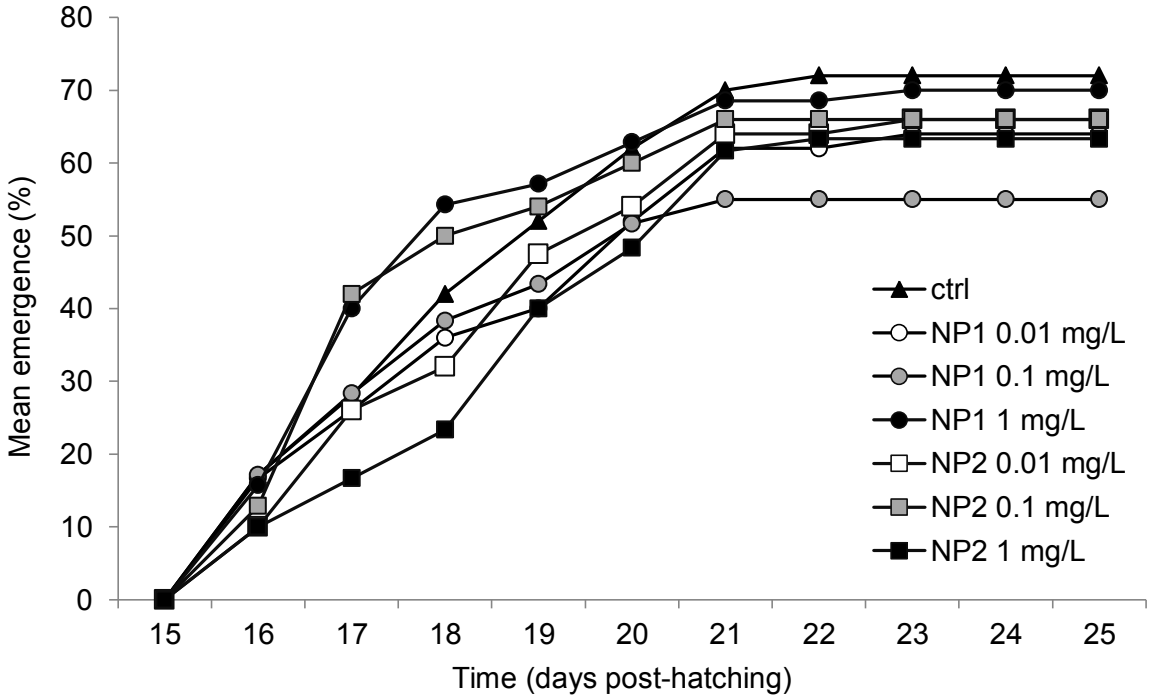


Fig. 2. Emergence of *C. riparius* exposed to NPs. Mean emergence is calculated on 70 individuals. Error bars are not represented for clarity purposes. ctrl: control.

The observation of the gills showed no differences between exposure (NP1 and NP2) and control groups.

Significant mortality (35%) was observed on *Xenopus* larvae exposed to the highest concentration of NP2 (10 mg/L). No mortality was observed at lower concentrations or with NP1. Consequently, a 96h acute toxicity assay was realized on *Xenopus* with NP2, with up to 100 mg/L of NPs. No toxicity was observed during this 96h exposure. No mortality was observed on *Pleurodeles* during the 12d exposure (Table 1). Significant growth inhibition was observed on *Xenopus* larvae exposed to NP1 and NP2 at 1 and 10 mg/L, and on *Pleurodeles* exposed to 10 mg/L of NP2 (table S1, figure 3).

Concerning genotoxicity assessment, median values of MNE ‰ for negative controls were 1 ± 0.7 and 3 ± 1.0, for *Xenopus* and *Pleurodeles* respectively. Results were significantly higher for positive controls, with median values of 6 ± 3.3 and 9 ± 3.8 for *Xenopus* and *Pleurodeles* respectively. *Xenopus* larvae exposed to CeO_2 NPs or citrate control showed no significant genotoxicity, whatever the concentration or the type of CeO_2 NP. On the contrary, a dose-dependent and significant genotoxicity was observed on *Pleurodeles* larvae exposed to NP2 only. Median values of MNE ‰ were 7 ± 1.4 and 9 ± 1.4 for larvae exposed to 1 and 10 mg/L of NPs, showing a significant MNE induction. No genotoxicity was observed on *Pleurodeles* exposed to NP1 or citrate control solution (figure 4).

4. Discussion

4.1Diatoms and chironomid larvae: two benthic species

No toxicity was observed on diatoms after NP exposure in the present study. It has been shown that diatoms produce extracellular polymeric substances (EPS) when exposed to nanoparticles, presumably as a protection against NPs (Miao *et al*., 2009; Verneuil *et al*., 2014). Indeed, MWCNTs were shown to aggregate significantly on the EPS net but not directly at the surface of the diatoms, highlighting that EPS can prevent direct contact between particles and the diatoms. Another major protection for diatoms is the silica frustule, that acts as a shield against some predators or substances (Hamm *et al*., 2003). Verneuil *et al.* (2014) showed that *N. palea* frustules have nanometric pores, less than 100 nm in diameter. Then NPs or NP aggregates would not be able to go through the frustule. Branco *et al*. (2010) also showed that *N. palea* produces phytochelatins when exposed to cadmium, thus playing an important role in metal and metalloids detoxication in cells. Frustule, EPS and phytochelatin production represent three important barriers that could explain the absence of toxicity in diatoms in our exposure conditions.

Contrarily, other studies have shown that NPs induced growth inhibition on diatoms. It has been reported that marine diatoms were sensitive to TiO_2 and ZnO NPs (Clément *et al*., 2013; Peng *et al*., 2011). Miao *et al.* (2009) found that Ag NP aggregates were not toxic for diatoms, but Ag NP dissolution led to toxic free ions.

Toxicity of CeO_2 NPs on *C. riparius* larvae was assessed with a panel of endpoints covering the whole developmental phase of the larvae, including time and rate of emergence. The larvae had an important reworking activity on the CeO_2 NPs, and ingested large amounts of materials. Chironomid larvae feeding and burrowing activity involve particle ingestion and mucus

secretion, leading to the production of mucus bounded pellets (Lagauzère *et al*., 2009; Leuchs and Neumann, 1990). This explains the very large aggregates observed during the 48h exposure to NP2. However, these large aggregates were not observed with NP1. One possible explanation is that the coating of NP1 prevents their aggregation, making them more stable in suspension and less available for the larvae. Despite chironomids exposure *via* water and the important ingestion of NPs, no mortality was observed during experiments in short or long term exposures, whether at low or high concentrations. On the contrary, Lee *et al*. (2009) and Oberholster *et al*. (2011) reported mortality on chironomids exposed to 1 mg/L of CeO_2 NPs and silica NPs respectively. Furthermore, no growth inhibition or development impairment was observed, similarly to Lee *et al.* study (2009). Oberholster *et al.* (2011) reported growth inhibition in *C. tentans* exposed to silica and alumina NPs. Emergence impairment has been shown with heavy metals (Pascoe *et al*., 1989), but this is the first time emergence time and rate are studied on *C. riparius* after exposure to NPs.

Table 1

Acute toxicity (% of mortality) in amphibian larvae exposed to NPs.

	NP1			**NP2**		
	0.1 mg/L	**1 mg/L**	**10 mg/L**	**0.1 mg/L**	**1 mg/L**	**10 mg/L**
X. laevis	0	0	0	0 (12d exposure) 0 (96h exposure)	0 (12d exposure) 0 (96h exposure)	35 (12d exposure) 0 (96h exposure)
P. waltl.	0	0	0	0	0	0

4.2 Amphibian larvae: two species exposed via the water column

A few authors have investigated the toxicity of nanoparticles on amphibian species, but no study on CeO_2 NPs has been conducted. In our study, we exposed *P. waltl.* and *X. laevis* larvae in standardized conditions.

Mortality among *X. laevis* larvae varied depending on the mode of exposure. These results are not surprising though, and highlight the importance of the mode of exposure in ecotoxicology, especially where nanoparticles are concerned. Indeed, this new kind of contaminant does not behave like chemical contaminants, such as metals or pesticides. NPs may tend to aggregate and sediment. Thus, time of exposure, medium renewal and other exposure parameters are crucial in terms of toxicity. The observed mortality is in accordance with studies on *Xenopus* exposed to nanoparticles (Nations *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2012).

Toxicity on amphibian larvae also differed depending on the species. Studies showed similar results when comparing different species (Baker *et al*., 2013). If *Xenopus* seem more sensitive than *Pleurodeles* when assessing mortality or growth inhibition, the opposite response was observed for genotoxicity. No genotoxicity was observed on *Xenopus* exposed to CeO_2 NPs, while a clear dose-dependent genotoxic effect was induced in *Pleurodeles* in presence of NP2. Two hypotheses could be put forward to explain the differences in genotoxicity between these two species: (i) a difference in CeO_2 pharmacokinetic into the organism, associated to the physiology of these organisms (different feeding behavior, external or internal gills) and (ii) different hematopoiesis localization in *Xenopus* and *Pleurodeles*. Micronuclei result from

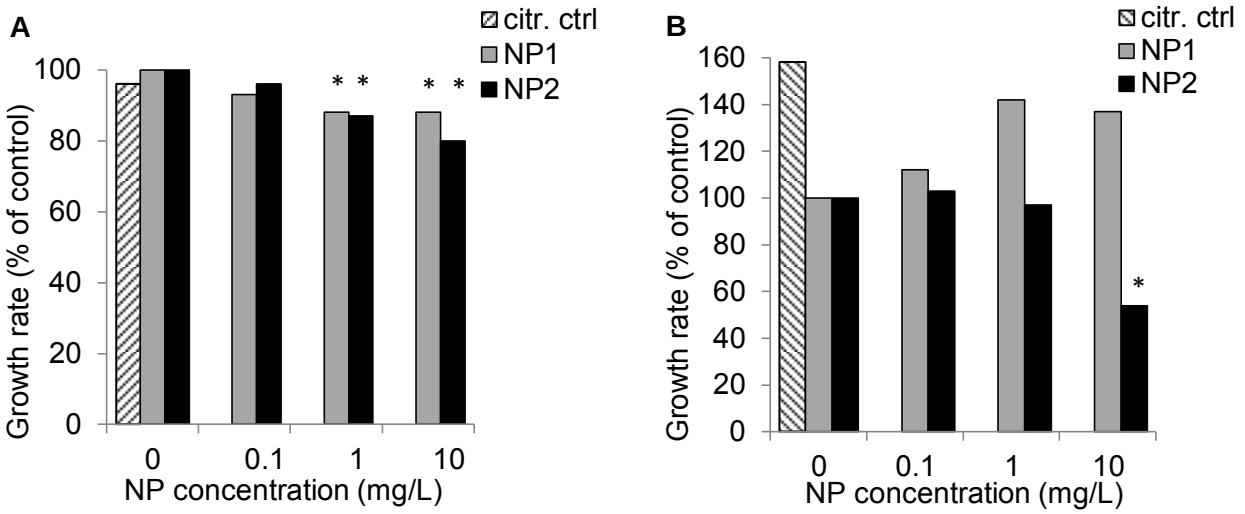


Fig. 3. Growth rate of amphibian larvae (A: *X. laevis;* B: *P. waltl.*) exposed to NPs. citr. ctrl: citrate control. *: significantly different from control.

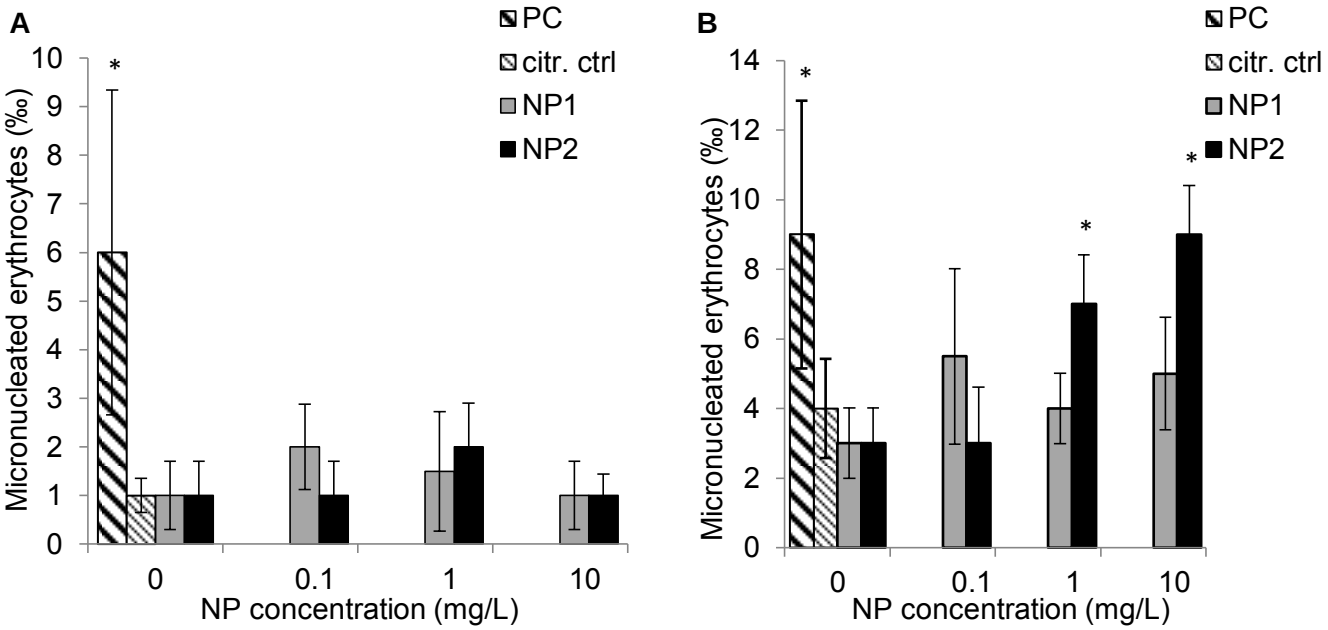


Fig. 4. Genotoxicity of amphibian larvae (A: *X. laevis;* B: *P. waltl.*) exposed to NPs. Error bars show the 95% confidence interval of median values. PC: positive control. citr. ctrl: citrate control. *: significantly different from control.

chromosome breaks (or mitotic anomalies) that require a passage through mitosis (hematopoiesis) to be recognizable (Pourrut *et al*., 2011). So, the induction of MN depends on the sensitivity of the organs where hematopoiesis takes place.

Finally, toxicity appeared slightly higher in presence of NP2 than NP1 for amphibians. Several parameters could explain this difference. Size, surface area and shape are commonly mentioned to explain differences in toxicity. George *et al*., (2012) found that silver nanoplates are more toxic than nanospheres because of defects presents on the NPs, more likely to occur on plates rather than on nanospheres. Dissolution and free ions are also mentioned to explain toxicity.

4.3 Different exposure routes, different toxicities

This study highlighted different forms of toxicities in presence of CeO_2 NPs, depending on the studied species. Despite the broad range of concentrations tested, from 0.01 mg/L to the extremely high concentration of 100 mg/L, no toxicity was observed on diatoms or chironomid larvae. Different responses in term of acute, chronic or genotoxic effects were observed on amphibian larvae, depending on the species. As discussed above, the toxicity observed seems to be highly species-dependent. Several parameters can influence toxicity. The route of exposure is a major parameter impacting toxicity, and all the four species studied present different routes of exposure. *N. palea* are benthic diatoms, only exposed to particles that sediment at the bottom of the aquatic compartment, at the interface between sediment and the water column. *C. riparius* have considerable sediment reworking activity, making contact with contaminated sediment an important route of exposure. Moreover, they present two feeding behaviors: they are filter-feeders and deposit-feeders, meaning that they both pump water with food particles and graze the particles at the surface of the sediment (Leuchs and Neumann, 1990). Waterborne exposure and ingestion of contaminated sediment or direct ingestion of NPs are thus very likely to occur. Finally, amphibian larvae live in the water column, so water is their main route of exposure in the present experiment.

Species present different natural defense systems. Diatoms were shown to produce EPS and phytochelatins as a protection when exposed to contaminants. Chironomid larvae secrete mucus for their reworking activity, but this mucus is also a protective substance for the larvae, as shown in *T. tubifex* larvae exposed to uranium (Lagauzère *et al*., 2009). No such natural defense system is known in amphibian species at the stage of development studied. Bacchetta *et al.* (2012) showed that 96h-old *X. laevis* larvae secreted mucus when exposed to high concentrations of carbon nanopowder, as a response of a pre-inflammation status, but not as a preventive defense secretion. The presence of internal or external protective substances, as phytochelatins and EPS for diatoms and mucus for chironomids, is a possible explanation to the absence of toxicity for these species. On the contrary, the absence of preventive systems of protection in amphibian species could explain the observed toxicity. While the present study focuses on single species exposures, it offers the first elements for consideration and studies on a larger scale, including possible trophic relation between species. As discussed above, chironomid and amphibian larvae ingested nanoparticles, and several authors observed similar ingestion during experiments (Auffan *et al*., 2013; Mouchet *et al*., 2011). It was also shown that

NPs could aggregate on the surface of diatoms or on their EPS (Morelli *et al*., 2013; Verneuil *et al*., 2014). These observations are of prime importance in our study. The possible aggregation on diatoms, which are the base of the trophic chain, and the important ingestion by primary consumers (*i.e.* chironomid and *Xenopus* larvae) would suggest that effects of NPs *via* the trophic route could be considerable. The combination of the extreme resistance of chironomid larvae, their significant ingestion of CeO_2 NPs and their widespread distribution in many aquatic systems make chironomid larvae a potentially important vector for biomagnification. Furthermore, the sensitivity observed on *Pleurodeles*, which are secondary consumers, suggests possible drastic consequences in case of biomagnification. Thus, this work highlights the importance of a better understanding of nanoparticle impacts on aquatic organisms, through future studies using experimental or natural trophic chains.

5. Conclusion

Both types of CeO_2 NPs were shown to be not toxic for *N. palea* or *C. riparius*. On the contrary, both amphibian larvae exhibited toxicity, with different sensitivities depending on species or the type of NPs. Mortality and growth inhibition were observed on *X. laevis* at the highest concentration of NP2, but no genotoxicity was evidenced. No mortality was recorded among *P. waltl.* and growth inhibition was observed at the highest concentration of NP2 only. A dose-dependent genotoxic response was observed in presence of NP2, while NP1 had no effects. Several factors could explain the differences observed between the species, such as different routes of exposure, different defense systems of the organisms, or different sensitivities inherent to each species, including their feeding behavior. Moreover, the different responses induced by the two types of CeO_2 NPs could be explained by their distinct characteristics, such as size, shape or coating.

This study provides wider information on CeO_2 NP toxicity on species representative of the different aquatic compartments, and also representative of different trophic levels, from primary producer to secondary consumer. This work on single species is the first step in the study of CeO_2 NP toxicity through the trophic chain, which is an essential exposure route to take into account in ecotoxicology.

Acknowledgments

The authors are grateful to the French National Research Agency (ANR) for its financial support, which allowed the establishment of the MESONNET project, in which this study was conducted. The authors also thank Annie Perrault (ECOLAB, Toulouse, France) for her helpful technical assistance and Mélanie Auffan (CEREGE, Aix en Provence, France), Sophie Caissaignon and Corinne Chaneac (Collège de France, Paris, France) for CeO_2 NPs preparation. The English language of the manuscript has been corrected by the native English Rashard Khadaroo (Université Paul Sabatier, Toulouse, France).

References

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiery, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO2 nanoparticles within Daphnia pulex. Water Res. 47, 3921–3930. doi:10.1016/j.watres.2012.11.063

Bacchetta, R., Tremolada, P., Di Benedetto, C., Santo, N., Fascio, U., Chirico, G., Colombo, A., Camatini, M., Mantecca, P., 2012. Does carbon nanopowder threaten amphibian development? Carbon 50, 4607–4618. doi:10.1016/j.carbon.2012.05.047

Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. Sci. Total Environ. 449, 150–156. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.056

Branco, D., Lima, A., Almeida, S.F.P., Figueira, E., 2010. Sensitivity of biochemical markers to evaluate cadmium stress in the freshwater diatom Nitzschia palea (Kützing) W. Smith. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 99, 109–117. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.010

Clément, L., Hurel, C., Marmier, N., 2013. Toxicity of TiO(2) nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants - effects of size and crystalline structure. Chemosphere 90, 1083–1090. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.013

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 88, 88–94. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.011

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 203, 87–103. doi:10.1007/978-1-4419-1352-4_2

Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.-M., 2008. Exposure of Chironomus riparius larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. Chemosphere 71, 574–581. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.029

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

FDA, 2012a. Guidance for Industry. Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

FDA, 2012b. Guidance for Industry. Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano 6, 3745–3759. doi:10.1021/nn204671v.

Hamm, C.E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., Smetacek, V., 2003. Architecture and material properties ACS Nano 6, 3745–3759. doi:10.1021/nn204671v

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 155, 344–357. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Jemec, A., Djinović, P., Tišler, T., Pintar, A., 2012. Effects of four CeO2

nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish Danio rerio and crustacean Daphnia magna. J. Hazard. Mater. 219-220, 213–220. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.080

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15, 1–17. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967. doi:10.1021/es902987d

Lagauzère, S., Pischedda, L., Cuny, P., Gilbert, F., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Influence of Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) and Tubifex tubifex (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 157, 1234–1242. doi:10.1016/j.envpol.2008.12.004

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 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. Environ. Toxicol. Pharmacol. 28, 86–91. doi:10.1016/j.etap.2009.03.001

Leuchs, H., Neumann, D., 1990. Tube texture, spinning and feeding behaviour of Chironomus larvae. Zool. Jahrb. Abt. Für Syst. Ökol. Geogr. Tiere 117, 31–40.

Madre, JF, 2006. Logiciel Mesurim. Académie d'Amiens. http://svt.ac-amiens.fr/archives_svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm.

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70. doi:10.1016/j.envpol.2013.04.040

McGill, R., Tukey, J.W., Larsen, W.A., 1978. Variations of Box Plots. Am. Stat. 32, 12. doi:10.2307/2683468

Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 157, 3034–3041. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.047

Morelli, E., Salvadori, E., Bizzarri, R., Cioni, P., Gabellieri, E., 2013. Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom Phaeodactylum tricornutum and the green alga Dunaliella tertiolecta: A biophysical approach. Biophys. Chem. doi:10.1016/j.bpc.2013.06.007

Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (Xenopus laevis and Pleurodeles waltl) using the comet assay and the micronucleus test. Environ. Toxicol. 22, 422–435. doi:10.1002/tox.20267

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2011. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. Environ. Toxicol. 26, 136–145. doi:10.1002/tox.20537

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2010. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomed. 5, 963–974. doi:10.2217/nnm.10.60

Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in Chironomus riparius. Chemosphere 92, 592–599. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.060

Nations, S., Long, M., Wages, M., Canas, J., Maul, J.D., Theodorakis, C., Cobb, G.P., 2011. Effects of ZnO nanomaterials on Xenopus laevis growth and development. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 203–210. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.018

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland Pub. Co.

Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A.-M., Chelule, P.K., Focke, W.W., Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate Chironomus tentans larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 416–423. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.012

OECD, 1992. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

OECD, 2004. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2010a. Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme; first revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 25, Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2010b. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27, Organisation for Economic Co-operation and Development.

Pandey, L.K., Kumar, D., Yadav, A., Rai, J., Gaur, J.P., 2014. Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. Ecol. Indic. 36, 272–279. doi:10.1016/j.ecolind.2013.08.002

Pascoe, D., Williams, K.A., Green, D.W.J., 1989. Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence. Hydrobiologia 175, 109–115. doi:10.1007/BF00765121

Peng, X., Palma, S., Fisher, N.S., Wong, S.S., 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 102, 186–196. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.014

Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., Pinelli, E., 2011. Lead-induced DNA damage in Vicia faba root cells: Potential involvement of oxidative stress. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 726, 123–128. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.001

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.062

Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29, 167–172. doi:10.1016/j.etap.2009.12.003

Shao, Gao, Yan, 2011. Semiconductor Quantum Dots for Biomedicial Applications. Sensors.

The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.

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

Vermeulen, A.C., Dall, P.C., Lindegaard, C., Ollevier, F., Goddeeris, B., 1998. Improving the methodology of

chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/60272 (accessed 9.4.12).

Verneuil, L, Silvestre, J, Mouchet, F, Flahaut, E, Boutonnet, JC, Bourdiol, F, Baqué, D, Gauthier, L, Pinelli, E, 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter and the benthic diatom Nitzschia palea: "a sticky story". Nanotoxicology 1-11. doi: 10.3109/17435390.2014.918202

Warwick, Tisdale, 1988. Morphological Deformities in Chironomus, Cryptochironomus, and Procladius Larvae (Diptera: Chironomidae) from Two Differentially Stressed Sites in Tobin Lake, Saskatchewan. Can J Fish Aquat Sci 45.

Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano 6, 3745–3759. doi:10.1021/nn204671v

Zhang, J., Wages, M., Cox, S.B., Maul, J.D., Li, Y., Barnes, M., Hope-Weeks, L., Cobb, G.P., 2012. Effect of titanium dioxide nanomaterials and ultraviolet light coexposure on African clawed frogs (Xenopus laevis). Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 176–183. doi:10.1002/etc.718

Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C., Zhang, J., Aguilera, R.J., Keller, A.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2012. Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO2 NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. J. Hazard. Mater. 225-226, 131–138. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.008

Appendix A. Supplementary material

Fig. S1. TEM (Jeol Jem 2100, 200Kv HR) images of NP1 (left) and NP2 (right) in stock suspensions.

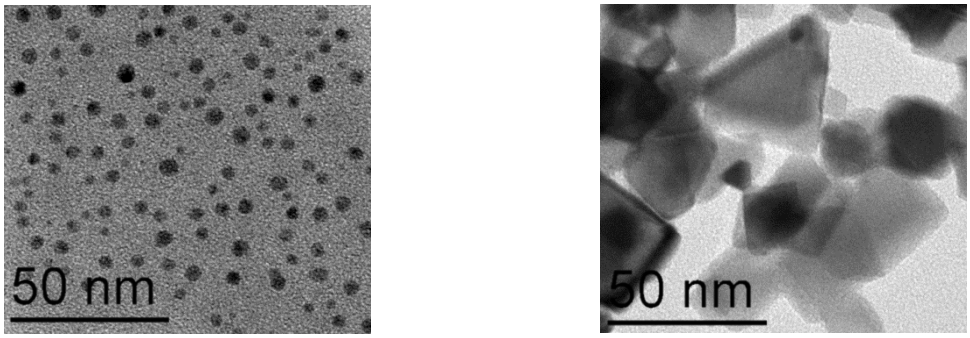


Fig. S2. Acute toxicity (growth rate) of NP1 and NP2 to the algae *N. palea*. Error bars show standard deviation of the mean (n = 3).

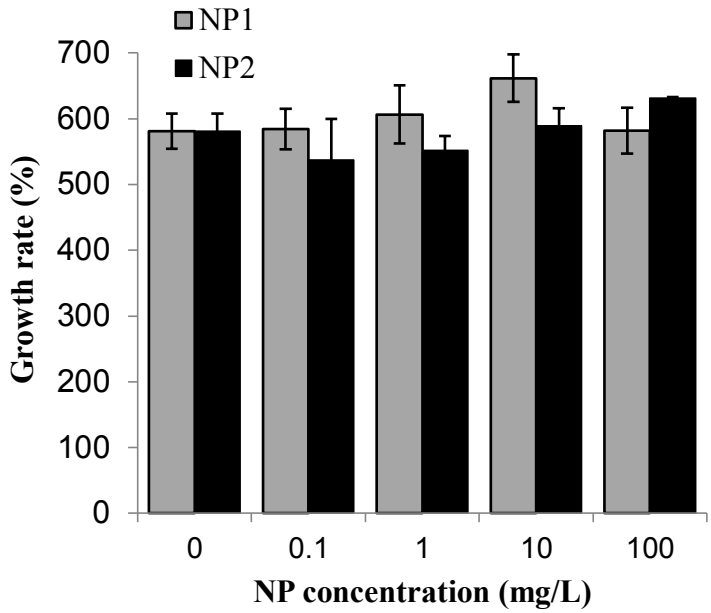


Fig. S3. Growth inhibition of *C. riparius* larvae exposed to NPs. Error bars show standard deviation of the mean (n = 70). cit. ctrl: citrate control.

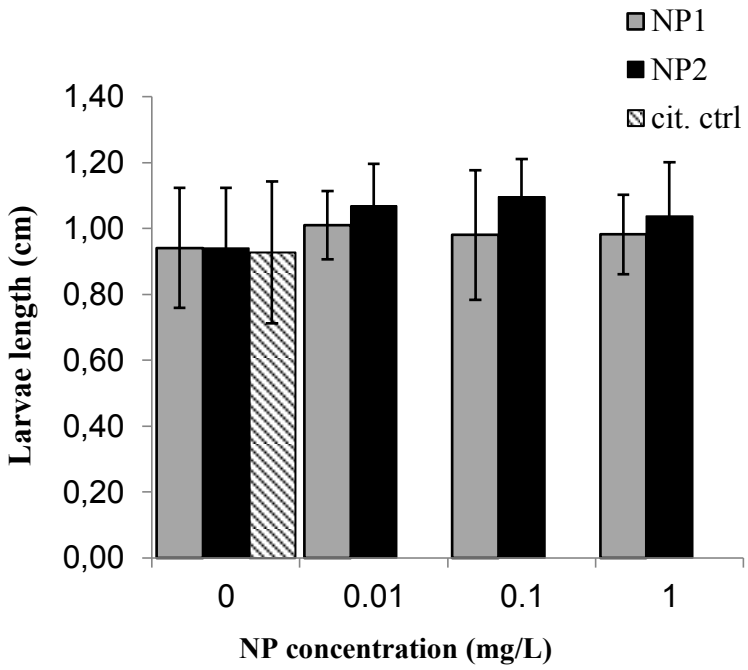


Table S1

Amphibian larvae mean size at the beginning (T_0) and at the end (T_{12}) of NPs exposure.

	***Xenopus* larvae length[1] (cm ±SD)**		***Pleurodeles* larvae length[2] (cm ±SD)**	
	T_0	**T_{12}**	**T_0**	**T_{12}**
Negative Control	2.50 ±0.16	6.44 ±0.24	2.62 ±0.22	3.08 ±0.49
NP1 0.1 mg/L	2.51 ±0.01	6.18 ±0.30	2.42 ±0.25	2.93 ±0.52
NP1 1 mg/L	2.50 ±0.20	5.99 ±0.39 *	2.27 ±0.22	2.92 ±0.50
NP1 10 mg/L	2.51 ±0.19	5.98 ±0.40 *	2.35 ±0.25	2.97 ±0.38
NP2 0.1 mg/L	2.50 ±0.21	6.28 ±0.32	2.49 ±0.27	2.96 ±0.42
NP2 1 mg/L	2.50 ±0.17	5.92 ±0.33 *	2.53 ±0.33	2.97 ±0.37
NP2 10 mg/L	2.51 ±0.18	5.67 ±0.61 *	2.20 ±0.28	2.63 ±0.26 *
Citrate Control	2.50 ±0.20	6.31 ±0.30	2.43 ±0.21	3.15 ±0.34

[1]Mean values (n = 20)

[2] Mean values (n = 15)

* Significantly different from Negative Control

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

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

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Madre, JF, 2006. Logiciel Mesurim. Académie d'Amiens. http://svt.ac-amiens.fr/archives_svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm.

McGill, R., Tukey, J.W., Larsen, W.A., 1978. Variations of Box Plots. Am. Stat. 32, 12. doi:10.2307/2683468

Mouchet, F., 2002. Validation du test comète sur larves d'amphibiens (Xenopus laevis et Pleurodeles waltl.) et application du potentiel génotoxique de sols, sédiments et déchets contaminés: comparaison avec le test micronoyau amphibien (Thèse de doctorat). Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland Pub. Co.

Vermeulen, A.C., Dall, P.C., Lindegaard, C., Ollevier, F., Goddeeris, B., 1998. Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams. https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/60272 Consulté le 09/04/12.

Warwick, Tisdale, 1988. Morphological Deformities in Chironomus, Cryptochironomus, and Procladius Larvae (Diptera: Chironomidae) from Two Differentially Stressed Sites in Tobin Lake, Saskatchewan. Can J Fish Aquat Sci 45

Chapitre IV

Ecotoxicité des NP de CeO_2 – Etudes en microcosmes

L'utilisation de microcosmes permet d'étudier des systèmes complexes comprenant plusieurs espèces. Dans cette étude, l'utilisation de microcosmes (détaillés en annexe 5) a permis d'évaluer la toxicité des NP de CeO_2 sur une chaîne trophique expérimentale. Celle-ci comprend des micro-organismes (bactéries, hyphomycètes, diatomées) à la base de la chaîne trophique et jouant le rôle de décomposeurs de la litière (cas des bactéries et hyphomycètes), des larves de chironomes comme consommateurs primaires se nourrissant principalement du biofilm, et des larves de pleurodèles comme consommateurs secondaires, maillon supérieur de la chaîne se nourrissant des larves de chironome.

L'obtention d'une chaîne trophique autosuffisante durant plusieurs semaines nécessite un important travail de détermination d'un équilibre entre les espèces. La première partie de ce chapitre est donc consacrée aux travaux réalisés en amont des expositions aux NP qui ont permis de développer une chaîne trophique autosuffisante durant toute la période d'exposition. Par la suite, l'étude de l'impact des NP de CeO_2 en microcosme s'articule autour de trois articles scientifiques. Le premier vise à étudier la distribution des NP dans les différents compartiments du milieu aquatique (colonne d'eau, sédiment, matrices biologiques) ainsi que leur toxicité sur les deux maillons supérieurs de la chaîne trophique ; le deuxième article est focalisé sur les mécanismes impliqués dans la toxicité des NP sur le maillon supérieur de la chaîne trophique ; enfin, le troisième article étudie l'impact des NP au niveau fonctionnel en se focalisant principalement sur le compartiment microbien, grâce à des bioindicateurs de fonctionnement d'un écosystème tels que la décomposition de la litière.

1. Mise en place d'une chaîne trophique fonctionnelle

L'utilisation de microcosmes permet l'exposition simultanée de plusieurs espèces et donc l'établissement d'interactions entre elles, notamment de relations écologiques complexes telles que les relations de prédation (« interactions verticales ») et/ou de compétition (« interactions horizontales »). Le choix des espèces et la mise en place de systèmes biologiques fonctionnels sont primordiaux dans ce type d'étude. Une attention particulière a donc été portée à ces deux aspects, et une partie des travaux en amont des expositions aux NP dans les microcosmes a ainsi consisté au choix des espèces, de la quantité d'organismes à introduire et des périodes d'acclimatation nécessaires.

1.1 Développement d'une chaîne trophique expérimentale herbivore

Le choix du consommateur primaire pour les expositions en microcosme s'est porté sur l'espèce *Chironomus riparius* du fait des nombreux avantages qu'elle présente dans le domaine de l'écotoxicologie (*cf.* chap. II), sa position clé dans les réseaux trophiques en tant que consommateur primaire et proie potentielle de nombreux invertébrés carnivores, ainsi que sa disponibilité au sein du laboratoire EcoLab.

Plusieurs espèces algales sont disponibles au sein du laboratoire et peuvent jouer le rôle de producteur primaire : les diatomées benthiques *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa* et l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Des essais ont été réalisés afin de déterminer la ou les espèce(s) la (les) plus pertinente(s) en termes de chaîne trophique.

- **Protocole expérimental**

La mortalité, la croissance et l'émergence de larves de chironome ont été étudiées selon un protocole adapté de la norme AFNOR (2004). Les expositions ont été réalisées en béchers contenant du sable et du milieu CHU 10 adapté à la culture d'algues (figure 12), soumis à une photopériode de 16h de jour (5500 lux) et à une température de 20 ± 1°C. Aucun contaminant n'a été introduit durant l'exposition ; les larves de chironomes ont été soumises à différentes conditions d'alimentation :

- Aucun apport de nourriture. Cette condition est un « témoin négatif » de nourrissage.
- Apport de nourriture préconisé par la norme AFNOR (2004), sous forme de Tétramin®. Cette condition est un « témoin positif » de nourrissage.
- Présence de *N. palea*.
- Présence de *N. pelliculosa*.
- Présence de *P. subcapitata*.
- Présence des deux espèces de diatomées *N. palea* et *N. pelliculosa*
- Présences des trois espèces d'algues *N. palea*, *N. pelliculosa* et *P. subcapitata*.

Le matériel utilisé (béchers, sable, système de bullage, milieu de culture) est stérilisé avant le début de l'expérience afin de limiter les contaminations par des souches algales ou bactériennes non désirées.

Le sable et le milieu d'exposition sont introduits dans les béchers et le système de bullage mis en place. Les différentes souches algales sont introduites dans les systèmes et laissées à développer afin d'obtenir un biofilm conséquent avant l'introduction des chironomes ; les

béchers sont recouverts de parafilm afin d'éviter les contaminations entre conditions. Une semaine plus tard, dix larves de chironomes âgées de 72h sont introduites dans chaque bécher. Un tiers du milieu de culture est renouvelé tous les quatre jours durant toute la durée de l'exposition afin d'éviter un épuisement des éléments nutritifs du milieu par les algues.

Dans un premier temps, la moitié des béchers de chaque condition est sacrifiée à J8 après introduction des chironomes et la seconde moitié à J15, afin d'étudier la croissance des larves. Ces deux temps correspondent à la moitié et à la fin de la phase larvaire respectivement.
Dans un second temps, les chironomes sont laissés jusqu'à émergence et le nombre d'adultes est comptabilisé tous les jours, en distinguant les mâles des femelles.



Figure 12 : Systèmes d'exposition des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.

- **Résultats**

On observe chez les larves de chironome une inhibition de croissance significative à J8 pour les conditions « *P. subcapitata* » et « pas de nourrissage » (figure 13). De plus, aucune larve de ces deux conditions ne survit jusqu'à J15. Une inhibition de croissance est également observée à J15 pour le mélange des trois souches d'algues. En revanche, aucune inhibition statistiquement significative n'est observée en présence des diatomées.

L'étude de l'émergence des chironomes (figure 14) montre que le nourrissage par l'une ou l'autre des espèces de diatomées ne permet pas un développement complet des chironomes, mais que la présence simultanée des deux espèces conduit à un taux d'émergence comparable à celui du témoin, malgré l'observation d'un retard initial. Le ratio entre mâles et femelles est également équilibré. Notons que les conditions comprenant *P. subcapitata* ont été supprimées lors de cette deuxième expérience.

Ces expériences permettent donc d'orienter le choix des espèces algales pour les expériences en microcosme vers un mélange des deux espèces *N. palea* et *N. pelliculosa*.

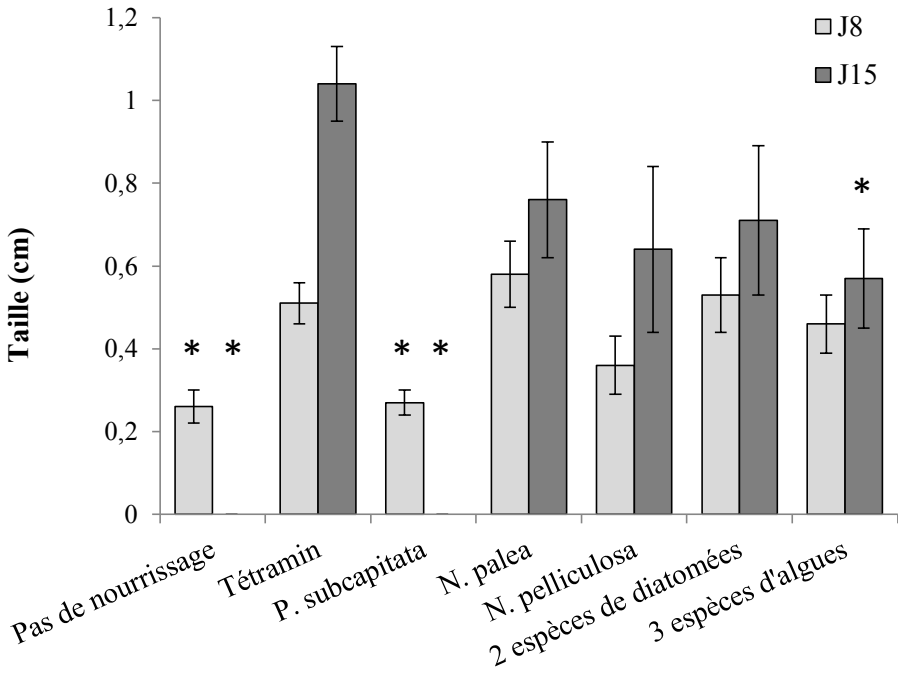


Figure 13 : Croissance des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.
* : significativement différent du contrôle Tétramin.

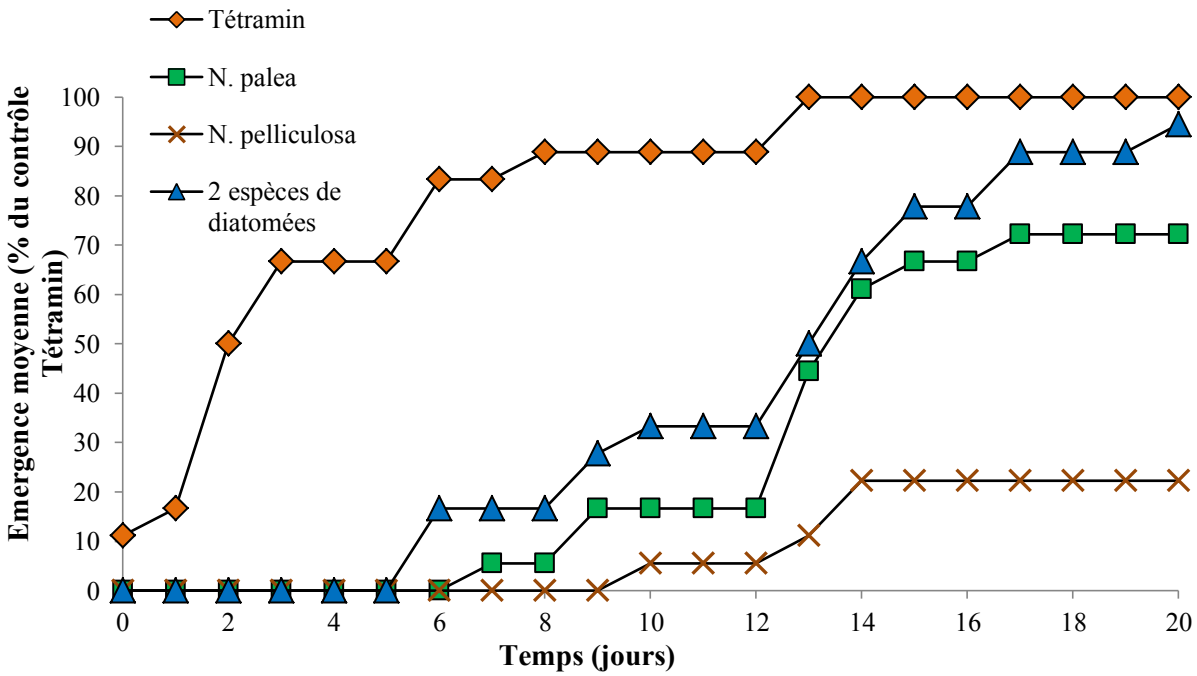


Figure 14 : Emergence cumulée des larves de *C. riparius* soumises à différentes conditions d'alimentation.
Le premier point (T0) correspond à la première émergence observée.

1.2 Etablissement d'un équilibre entre les différentes espèces

La mise en place d'une chaîne trophique expérimentale carnivore s'est révélée plus directe, les larves de pleurodèle se nourrissant de larves de chironomes (figure 15). Des essais ont montré que le nombre de chironomes ingérés peut augmenter au cours du temps et atteindre jusqu'à 12 chironomes par pleurodèle et par jour, mais qu'une plus faible quantité est suffisante au nourrissage des pleurodèles. Leur croissance dépend de la quantité de nourriture ingérée ; une ingestion de 3 à 4 chironomes par pleurodèle et par jour entraîne une croissance modérée mais pas de signes d'altération physiologique.

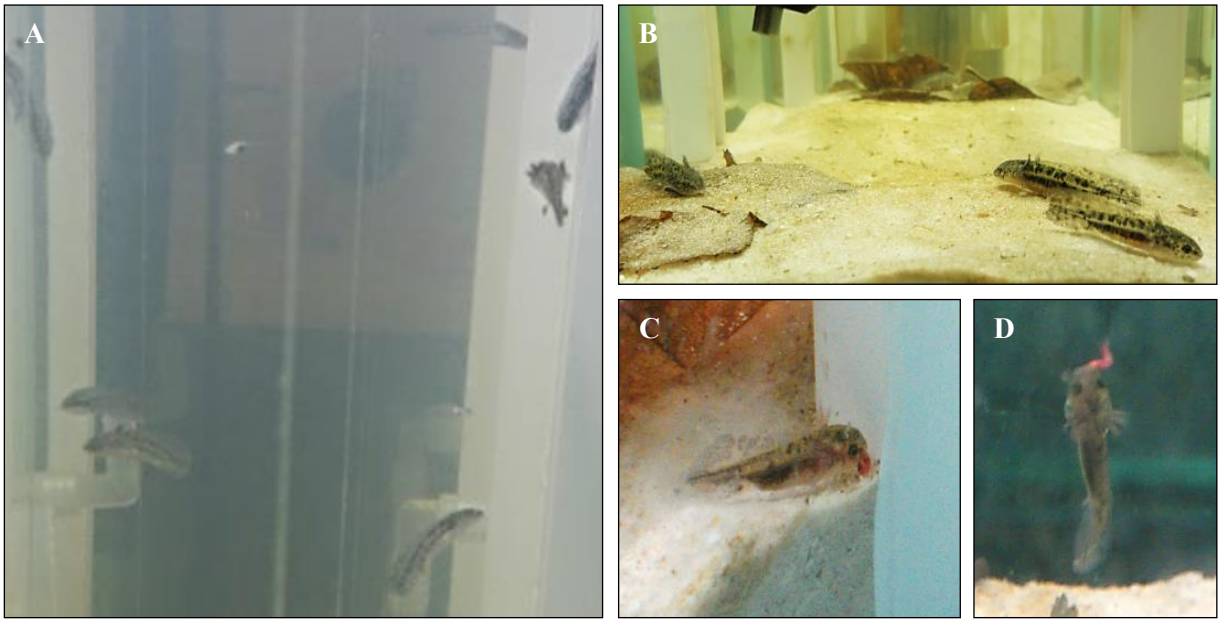


Figure 15 : Comportement des larves pleurodèles et validation de la chaîne trophique carnivore en microcosme.
Les larves alternent les périodes de nage (A) et de repos à la surface du sédiment (B). La prédation des chironomes s'effectue à la surface du sédiment lorsque ceux-ci remontent à la surface pour brouter (C). Pleurodèle remontant la colonne d'eau une fois sa proie capturée (D).

Le nombre d'organismes de chaque espèce présents dans les microcosmes est déterminant pour le bon fonctionnement du système. En effet, un trop grand nombre de consommateurs primaires ou secondaires risque d'entraîner un rapide épuisement du maillon inférieur et donc un manque de nourriture. A l'inverse, un nombre insuffisant d'organismes peut être limitant pour la réalisation des essais de toxicité.

L'évaluation de la génotoxicité sur pleurodèle nécessite un nombre minimum de 15 larves par microcosme afin d'assurer la robustesse de l'analyse statistique des résultats (AFNOR,

2000; ISO, 2006). Le nombre de pleurodèles par microcosme a donc été fixé à 17 pour pallier d'éventuelles pertes, tout en limitant la pression de prédation exercée sur les chironomes.

Le nombre de larves de chironomes a été choisi pour qu'une quantité maximale d'individus soient présents, tout en tenant compte de la nécessité de ne pas épuiser le biofilm trop rapidement du fait d'un surnombre de consommateurs primaires. L'introduction de 700 larves par microcosme correspond à une moyenne de 3,4 chironomes disponibles par pleurodèle et par jour. Cette quantité est donc suffisante au nourrissage des pleurodèles et permet d'envisager la présence de chironomes non consommés en fin d'expérience, sur lesquels seront évalués les paramètres de toxicité. En outre, l'introduction d'un plus grand nombre de chironomes aurait été difficile à mettre en œuvre, compte tenu de la quantité limitée de matériel biologique disponible. La présence de 700 chironomes par microcosme correspond à une densité de larves plus de deux fois supérieure à celle observée en test normalisé, mais bien inférieure à la densité observée en milieux naturels (4666 larves/m² contre 2000 en test normalisé et 30 à 50 000 en milieux naturels).

Des essais préliminaires ont montré qu'une période de trois semaines est nécessaire pour un développement suffisant du biofilm avant introduction des consommateurs primaires (figure 16). De plus, cette période permet d'éviter que les consommateurs primaires et secondaires soient exposés à des concentrations de nitrite, hautement toxique, trop importantes. En effet, lors de la mise en place d'un microcosme aquatique, un « cycle de l'azote » se met en place du fait de la présence de bactéries nitrifiantes. Les composés azotés, initialement sous forme d'ammoniaque (NH_3) ou d'ammonium (NH_4^+) sont oxydés en nitrites (NO_2^-), eux-mêmes oxydés en nitrates (NO_3^-) par la suite (figure 17). La succession des phases qui se déroulent lors de la mise en place de microcosmes prend plusieurs semaines et peut varier d'un système à l'autre, il est donc important d'effectuer un suivi régulier des différents composés azotés cités précédemment. Le suivi des composés azotés a montré que dans nos conditions, une période de trois semaines est suffisante à la stabilisation du système et à l'obtention de concentrations en NH_3, NO_2^- et NO_3^- non détectables.

Ces essais ont également montré que lorsque le biofilm atteint son état de développement maximum, il est encore insuffisant pour nourrir les larves de chironomes durant toute leur période d'exposition (19 jours). Des feuilles d'aulne préalablement séchées et autoclavées ont donc été ajoutées au système afin de complémenter la nourriture des chironomes. La quantité de feuilles d'aulne a été évaluée pour permettre de recouvrir environ un tiers de la surface du sédiment ; cette quantité représente en moyenne 3,2 g de matière sèche.



Figure 16 : Développement du biofilm et validation de la chaîne trophique herbivore en microcosme. Compartiment primaire dans les microcosmes avant l'introduction des chironomes (A). Le biofilm microbien, de couleur brune du fait de la présence des diatomées, ne se développe pas sous les feuilles d'aulne, phénomène visible lorsque celles-ci sont déplacées et laissent apparaître le sédiment non colonisé (B). Chironomes broutant le biofilm quelques jour après leur introduction (C).

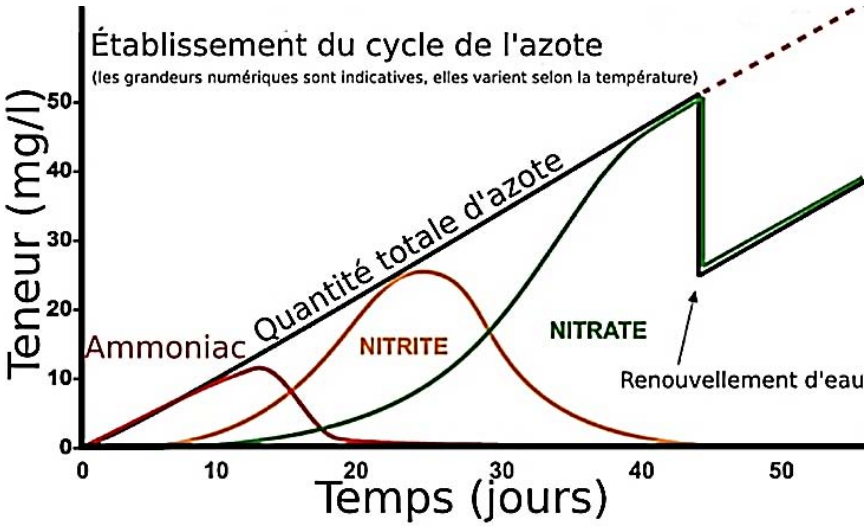


Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution temporelle des différentes phases du cycle de l'azote. L'échelle des temps est indicative et dépend des volumes considérés ainsi que de la quantité de micro-organismes initialement présents. Source : d'après aquaponie.org

L'objectif de cette étude en microcosme étant d'étudier des chaînes trophiques expérimentales, il est nécessaire que les maillons inférieurs soient préalablement exposés aux NP lorsqu'ils sont ingérés par les organismes de niveau trophique supérieur. Ceci conditionne donc les cinétiques d'introduction des organismes et de contamination avec les NP. Celle-ci débute lors de la troisième semaine d'établissement du biofilm afin que son développement se fasse en partie en présence des NP et que des phénomènes de « piégeage » des NP puissent

avoir lieu. Ainsi, lorsque les larves de chironomes sont introduites, elles se nourrissent de biofilm potentiellement déjà contaminé. De plus, ces larves sont introduites quelques jours après éclosion et le maillon supérieur – les larves de pleurodèle – n'est introduit qu'une semaine plus tard. Ce délai permet, d'une part, le développement des larves de chironomes pour qu'elles représentent un apport de nourriture plus conséquent pour les pleurodèles que ne l'auraient fait de jeunes larves. D'autre part, il leur permet d'être au contact des NP par voie directe ou voie trophique durant cette période et d'avoir déjà potentiellement accumulé des NP lors de leur ingestion par les pleurodèles. Cette cinétique d'introduction des organismes et de contamination permet par conséquent d'optimiser l'expérience, en se plaçant dans des conditions les plus proches possibles d'une exposition à long terme où le contact se fait par voies directe et trophique, tout en assurant un apport de nourriture suffisant sur toute la période d'exposition. Enfin, la durée d'exposition des larves de pleurodèle a été fixée à 12 jours. Cette période correspond en effet au temps préconisé par les normes ISO 21427-1 (2006) et AFNOR 90-325 (2000) pour réaliser l'évaluation de la génotoxicité (induction de micronoyaux) dans les meilleures conditions chez le pleurodèle.

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

ISO 21427-1, 2006: Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

2. Evaluation intégrative de l'écotoxicicité de NP de CeO_2 à l'échelle d'une chaîne trophique expérimentale

La mise en place de chaînes trophiques autosuffisantes sur une période de six semaines, décrite dans la partie précédente, permet d'étudier le comportement et la toxicité des NP de CeO_2 en microcosme selon un protocole de contamination qui vise à mimer un apport régulier de NP sur une période de quatre semaines. Ce protocole de contamination, commun aux trois laboratoires CEREGE, LIEC et EcoLab, a été mis en œuvre dans le cadre de l'ANR MESONNET afin d'étudier le devenir et la toxicité de deux types de NP de CeO_2 (enrobées de citrate et non-enrobées, respectivement) sur différents systèmes biologiques. Cette étude se focalise principalement sur l'accumulation et la toxicité des NP chez les larves de chironome et de pleurodèle, ainsi que sur la distribution des NP dans les différents compartiments du microcosme développé au laboratoire, et fait l'objet d'un article en cours de préparation.

RESUME :

Le comportement et la toxicité de deux types de nanoparticules de CeO_2 ($nCeO_2$) ont été étudiés en microcosme aquatique. La chaîne trophique expérimentale étudiée comporte trois maillons de niveaux trophiques différents : un biofilm microbien, des larves de diptère *Chironomus riparius* se nourrissant du biofilm, et des larves d'amphibien *Pleurodeles waltl.*, prédatrices des chironomes. L'étude de l'accumulation et de la toxicité des NP se focalise sur les larves de chironome et de pleurodèle. La contamination des microcosmes consiste en l'ajout successif de $nCeO_2$ (enrobées d'une couche de citrate ou brutes) dans la colonne d'eau, réparti sur quatre semaines et permettant d'atteindre la concentration finale de 1 mg/L. Les résultats montrent que les $nCeO_2$ s'accumulent préférentiellement dans le sédiment, à 86,5% et 95,5% pour les NP enrobées et brutes respectivement. Le transfert des NP depuis le sédiment jusqu'au maillon supérieur de la chaîne trophique a également été mis en évidence, avec des concentrations en Ce chez les larves de pleurodèles de 9,73 ± 5,61 et 9,47 ± 3,76 mg/kg, pour les NP enrobées et brutes respectivement. Malgré la très forte concentration en Ce mesurée chez les larves de chironomes, aucune toxicité n'a été observée chez cette espèce. Des effets génotoxiques ont cependant été observés chez les larves de pleurodèles, mettant en évidence le danger potentiel des $nCeO_2$ pour les espèces de niveau trophique supérieur. Ces travaux en microcosme se situent à une échelle intermédiaire entre les études en laboratoire et sur les écosystèmes naturels, et représentent une étape essentielle dans l'évaluation de l'écotoxicité des $nCeO_2$ en système complexe.

Evaluation intégrative de l'écotoxicité de NP de CeO_2 à l'échelle d'une chaîne trophique expérimentale (diptères et amphibiens) en microcosmes

1. Introduction

La décennie passée a été témoin des premières synthèses, puis de la production et de l'utilisation exponentielles des nanoparticules (NP). Ces particules possèdent en effet des propriétés particulières que leur confère leur taille nanométrique. Elles sont actuellement utilisées dans des domaines variés (Keller *et al.*, 2013) et sont présentes dans de nombreux produits du quotidien, recensés sur le site « Project on Emerging Nanotechnologies » (www.nanotechproject.org). Les nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2) sont notamment utilisées pour leurs propriétés catalytiques comme additif dans le carburant diésel ou comme agent bloquant des rayons ultra-violets dans certains produits cosmétiques, peintures et revêtements (Quik *et al.*, 2010). Leur production importante, estimée entre 100 et 1000 tonnes par an en Europe (Piccinno *et al.*, 2012), ainsi que leur utilisation dans des produits de consommation courante, font craindre un relargage de plus en plus important dans l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques (Gottschalk *et al.*, 2010). Les conséquences environnementales de tels rejets étant encore relativement méconnues, l'évaluation de la toxicité des $nCeO_2$ devient primordiale.

Des études d'écotoxicité des $nCeO_2$ ont été menées chez les invertébrés aquatiques, tels que la daphnie *Daphnia magna* (Gaiser *et al.*, 2009; García *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Manier *et al.*, 2011) et le chironome *Chironomus riparius* (Bour *et al.*, 2015b; Lee *et al.*, 2009). D'autres études portent sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Roh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011) et sur le poisson *Carassius auratus* (Xia *et al.*, 2013). Enfin, des travaux ont également été menés en plus grand nombre chez des souches bactériennes (Fang *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011; Pelletier *et al.*, 2010; Rodea-Palomares *et al.*, 2012; Thill *et al.*, 2006). Cependant, les études en laboratoire réalisées chez les espèces isolées (essais monospécifiques) ne permettent pas d'appréhender les paramètres complexes liés aux milieux naturels (phénomènes de compétition, prédation, interactions inter-espèces) et pouvant influer sur le devenir et la toxicité des NP. Récemment, certains auteurs ont étudié le devenir et l'impact des NP en microcosmes et mésocosmes afin de se rapprocher des conditions environnementales. Mais de tels travaux sont cependant encore très peu nombreux, notamment du fait de leur complexité de mise en œuvre. Ainsi, une seule étude porte sur le devenir des $nCeO_2$ dans un système aquatique modèle (Zhang *et al.*, 2012). D'autres sont menées avec des NP d'or (Au) (Ferry *et al.*, 2009), de dioxyde de titane (TiO_2) (Yeo and Nam, 2013), d'oxyde de cuivre (CuO) (Buffet *et al.*, 2013b), et la plupart du temps concernent l'étude de NP d'argent (Ag) (Buffet *et al.*, 2014b; Cleveland *et al.*, 2012; Colman *et al.*, 2014, 2013; Lowry *et al.*, 2012). Ces études permettent d'une part l'analyse du comportement et du devenir des NP dans les matrices naturelles (eau, sédiment, accumulation dans les organismes), d'autre part une évaluation de leur toxicité chez les

différentes espèces exposées simultanément. Malgré l'exposition simultanée de plusieurs espèces, les études sur l'accumulation et les effets des NP le long de chaînes trophiques sont rares (Bour *et al.*, 2015a; Kulacki *et al.*, 2012). Le transfert trophique des NP est cependant un facteur à ne pas négliger. En effet, plusieurs études montrent qu'en milieu aquatique les NP ont tendance à s'agréger et à sédimenter (Baker *et al.*, 2014; Keller *et al.*, 2010; Quik *et al.*, 2010), entraînant une exposition potentiellement importante des organismes benthiques, dont la plupart sont la proie de nombreuses espèces évoluant dans la colonne d'eau. Un transfert trophique entre proies et prédateurs pourrait alors entraîner la contamination de nombreuses espèces et une toxicité accrue chez les maillons supérieurs des chaînes trophiques, comme cela a été montré dans le cas de certains métaux lourds (Croteau *et al.*, 2005) et de polluants organiques (Nfon *et al.*, 2008).

Parmi les organismes benthiques, les larves du chironome *Chironomus riparius* sont présentes dans de nombreux milieux aquatiques, où elles jouent un rôle de bioturbation important. Elles se déplacent également en surface du sédiment, où elles se nourrissent des biofilms microbiens (Lagauzère *et al.*, 2009) et sont la proie de nombreuses espèces carnivores. Les larves de chironome sont donc représentatives du compartiment sédimentaire ainsi que de l'interface sédiment – colonne d'eau. De par leur mode de nourrissage et leur contact permanent avec le sédiment, l'exposition de ces organismes est particulièrement importante en cas de contamination des sédiments. Une espèce prédatrice des chironomes est l'amphibien *Pleurodeles waltl.*. Les amphibiens sont particulièrement exposés aux contaminants environnementaux du fait de la perméabilité de leur peau et de leurs branchies. De plus, leur grande sensibilité aux polluants en fait des bioindicateurs de choix pour les milieux aquatiques. Les larves de pleurodèle sont étudiées depuis de nombreuses années en écotoxicologie pour leur sensibilité particulière aux contaminants génotoxiques (Le Curieux *et al.*, 1995; Gauthier, 1996; Mouchet *et al.*, 2007, 2006; Zoll-Moreux and Ferrier, 1999). La génotoxicité des $nCeO_2$ sur *P. waltl.* a notamment été évaluée lors d'une précédente étude (Bour *et al.*, 2015b).

La présente étude vise à déterminer le devenir de deux types de $nCeO_2$ (enrobées ou non) en milieu aquatique, ainsi que leur accumulation et toxicité potentielles le long d'une chaîne trophique expérimentale. Celle-ci comprend plusieurs niveaux trophiques : un biofilm microbien, des larves de *C. riparius* et des larves de *P. waltl.*, maillon supérieur de la chaîne. L'analyse de l'accumulation et de la toxicité des NP est focalisée sur les larves de chironome et de pleurodèle. En effet, le biofilm microbien (consortium bactérien et diatomées benthiques) est considéré ici uniquement comme source de nourriture des larves de chironome et ne fait pas l'objet d'analyses de toxicité. Les essais sont réalisés en microcosmes d'une capacité de 56 L, qui permettent une étude à échelle intermédiaire entre les essais standardisés en laboratoires et les études de terrain.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Nanoparticules

Les deux types de $nCeO_2$ étudiées sont de taille (2 – 5 nm) et de forme (sphères) identiques. L'un d'eux correspond à des NP enrobées de citrate de tri-ammonium (Nanobyk® 3810, Byk) et l'autre à des NP brutes.

La taille et la forme des deux types de $nCeO_2$ (figure 1) ont été déterminées par Microscopie Electronique à Transmission (MET, Jeol Jem 2100, 200Kv, HR).

2.2 Organismes et litière

La litière présente dans les microcosmes, composée de feuilles d'aulne, joue dans cette étude le rôle de source complémentaire de nourriture pour les larves de chironome. Les feuilles d'aulne ont été récupérées en période de défeuillaison (mois de novembre ; vallon de Ramade, Haute-Garonne, France, 43°31'04.2"N 1°25'32.1"E) puis séchées à l'étuve (72h, 50°C, Thermo Jouan EB 170) au laboratoire. Des lots de 3,2 g (poids sec) sont constitués, placés en eau déionisée et stérilisés avant introduction dans les microcosmes afin de limiter l'apport de micro-organismes non intentionnels.

Un consortium microbien a été isolé des filtres des bassins d'eau douce du Muséum-Aquarium de Nancy (France) par le LIEC (UMR 7360, Metz, France). Les micro-organismes ont été centrifugés et suspendus dans du glycérol à 50% ($2{,}7.10^{10}$ bactéries/mL), puis conservés à -80°C au LIEC avant leur envoi. Avant introduction dans les microcosmes, 1 mL de consortium microbien a été mis à incuber dans 1 L d'eau minérale Volvic® (72h, 21°C). Un volume de 50 mL a ensuite été introduit dans chaque microcosme.

Les diatomées *Nitzschia palea* et *Navicula pelliculosa* sont cultivées au laboratoire EcoLab (France) en milieu de culture CHU 10 contenant du Fe-EDTA comme source de fer ($6{,}4 < pH < 6{,}6$), comme décrit dans Verneuil *et al.* (2014).

Les larves de *Chironomus riparius* proviennent de l'élevage maintenu au laboratoire EcoLab (France) sur le site de l'ENSAT, suivant la norme AFNOR XP T 90-339-1 (2004).

Les larves de *Pleurodeles waltl*. sont également obtenues et élevées au laboratoire EcoLab (France), comme décrit dans Mouchet *et al.* (2007). Elles sont introduites dans les microcosmes au stade 53 de développement de la table de Gallien et Durocher (1957) et exposées durant 12 jours afin de respecter les conditions nécessaires à l'évaluation de l'induction de micronoyaux (ISO, 2006).

2.3 Exposition en microcosmes

Les systèmes (neuf microcosmes en verre, 75 x 20 x 60 cm, L x l x h) d'exposition sont identiques à ceux présentés par Auffan *et al*. (2014) et Tella *et al*. (2014). Le déroulement de l'expérience a été légèrement adapté pour les besoins des espèces présentes. Brièvement, chaque microcosme contient 6,5 L de sédiment reconstitué (79% silice, 10% kaolin, 1% carbonate de calcium) et 56 L d'eau minérale Volvic®. Des systèmes de pompe individuelles assurent une recirculation d'eau en circuit fermé (Eheim universal, 600 L/h) et un éclairage naturel (16 : 8 ; jour : nuit) est assuré par des tubes T8 (18W, 5500K, Vivalite®). La température est maintenue à 21°C. Un suivi horaire des paramètres physico-chimiques (température, conductivité, pH, potentiel rédox, oxygène dissous) est assuré (kit de sondes Ponsel Odeon open X), et les taux de nitrate, nitrite et ammonium (NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+) sont mesurés tous les trois jours pour vérification de leur teneur. Chaque condition expérimentale est réalisée en triplicats.

Cinétique d'introduction des organismes : les feuilles d'aulne (3,2 g, poids sec), les diatomées (2.10^2 et 2.10^4 cellules/mL, pour *N. palea* et *N. pelliculosa* respectivement) et le consortium microbien sont introduits en premier lieu. On laisse le biofilm se développer durant deux semaines

avant le premier ajout de NP. La contamination aux NP consiste en des ajouts successifs de NP répartis sur quatre semaines, pour atteindre la concentration finale de 1 mg/L. Pour cela, 12 ajouts de 50 mL d'une suspension de NP fraîchement préparée (93,4 mg/L) sont effectués régulièrement (figure 2). La suspension de NP est remplacée par un volume équivalent d'eau ultra-pure dans les conditions témoin. Après une semaine de contamination (T1), 700 larves de chironomes âgées de 72h sont introduites dans chaque microcosme. A T1, le biofilm est suffisamment développé pour nourrir les chironomes. Une semaine plus tard (T2), 17 larves de *P. waltl.* au stade 53 de développement (Gallien and Durocher, 1957) sont introduites dans chaque microcosme. L'expérience prend fin 12 jours plus tard (T4) : les larves d'amphibien sont récupérées pour une évaluation immédiate de la toxicité et le sédiment est tamisé afin de collecter les larves de chironomes restantes. Celles-ci sont alors conservées en éthanol (70%).

2.4 Evaluation de la toxicité chez les organismes

L'évaluation de la toxicité chez *C. riparius* est basée sur la détermination de l'inhibition de croissance, par mesure de la taille des larves (logiciel ImageJ®) à la fin de l'exposition. La comparaison des groupes est réalisée grâce au test statistique de Kruskall-Wallis (test non paramétrique d'analyse des variances, logiciel SigmaPlot 12.0).

Les paramètres de toxicité évalués chez *P. waltl.* sont la mortalité (toxicité aiguë), l'inhibition de croissance (toxicité chronique) et l'induction de micronoyaux érythrocytaires (génotoxicité). Le nombre de larves mortes est enregistré quotidiennement et la mortalité est exprimée en pourcentage de mortalité totale. L'inhibition de croissance est déterminée par mesure de la taille des larves lors de leur introduction et à la fin de l'exposition (logiciel Mesurim, Madre, 2006) tel que décrit dans Mouchet *et al.* (2011, 2007). La comparaison des groupes est réalisée grâce au test statistique de Kruskall-Wallis, suivi du test de Dunn (test de comparaison des moyennes des rangs, logiciel SigmaPlot 12.0). L'évaluation de la génotoxicité est effectuée suivant la norme ISO 21427-1, (2006) à partir de l'échantillon sanguin prélevé sur chaque larve préalablement anesthésiée (MS222, tricaine méthanesulfonate, Sigma, France). Le nombre d'érythrocytes micronucléés (EMN) est déterminé sur un échantillon de 1000 érythrocytes par larve (fréquence pour 1000). Les résultats sont exprimés comme le nombre d'EMN pour 1000 (EMN ‰). La comparaison statistique des groupes est réalisée d'après McGill *et al.* (1978).

2.5 Dosage du cérium

Des prélèvements d'eau sont effectués chaque semaine (10 mL prélevés à environ 15 cm de la surface et conservés en tubes à centrifuger en polypropylène, Falcon®), immédiatement acidifiés (acide nitrique, HNO_3 < 2%) et conservés à 4°C. Des échantillons de sédiment sont prélevés à la fin de l'expérience (trois carottes par microcosme de 1 cm de hauteur et 3 cm de diamètre) et congelés (-20°C). L'analyse dans les matrices biologiques est réalisée sur les organismes prélevés en fin d'expérience.

Traitement des échantillons d'eau : deux traitements sont appliqués afin d'estimer la fraction de NP dissoutes. Une moitié des échantillons est analysée sur l'ensemble du volume prélevé, renseignant sur la quantité totale de cérium (Ce). L'autre moitié des échantillons est ultra-centrifugée (1h, 396 750 g) afin de culotter les NP et de ne garder que la fraction dissoute dans le

surnageant. Les concentrations en Ce sont déterminées par ICP-MS (Perkin Elmer, NexIon 300X) au laboratoire EcoLab.

Traitement des échantillons de sédiment : les échantillons sont séchés (étuve à 50°C pendant une nuit), homogénéisés par broyage au mortier puis traités par attaque tri-acide. Pour cela, 200 mg d'échantillon sont mis en présence d'un mélange équivolumique d'acide nitrique (HNO_3 65%, Suprapur®) et d'acide fluorhydrique (HF 40%, Suprapur®) (10 mL au total) durant une nuit. Deux mL d'acide perchlorique ($HClO_4$ 40%, Suprapur®) sont ensuite ajoutés et une évaporation à sec est effectuée par chauffage à 170°C (DigiPrep) durant plusieurs jours. Enfin, une reprise acide est réalisée par ajout d'1 mL de HNO_3 chauffé à 140°C durant une heure. Une fois froid, l'échantillon est récupéré et dilué dans 10 mL d'eau ultra pure. Les concentrations en Ce sont ensuite déterminées par ICP-MS (Perkin Elmer, NexIon 300X) au CEREGE (UMR 7330, Aix-en-Provence).

Traitement des échantillons biologiques : les analyses sont réalisées sur trois lots de trois larves de pleurodèles chacun par microcosme et sur un lot de 20 larves de chironomes par microcosme. Les échantillons sont séchés (étuve à 50°C, 24h) puis 2 mL d'acide nitrique (HNO_3 65%, Suprapur®) sont ajoutés et les échantillons sont chauffés à 80°C pendant 90 minutes (DigiPREP). Deux mL de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 30%, Suprapur®) sont ajoutés, les échantillons sont chauffés à 80°C pendant 90 minutes puis récupérés et dilués dans 10 mL d'eau ultra-pure. Une analyse multi-élémentaire est ensuite effectuée par ICP-MS quadripolaire (7500ce, Agilent Technologies) au laboratoire EcoLab.

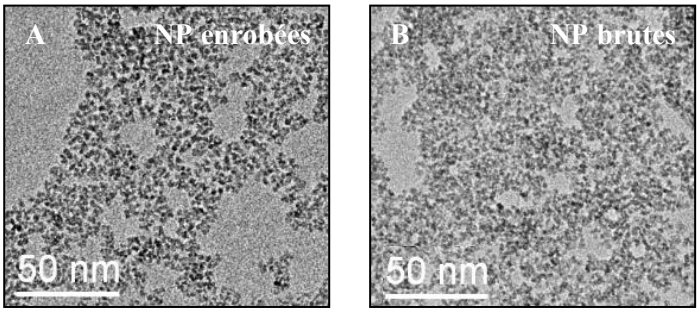


Figure 1 : Observation en MET (Jeol Jem 2100, 200Kv, HR) des NP de CeO_2. (A) NP enrobées de citrate ; (B) NP brutes.

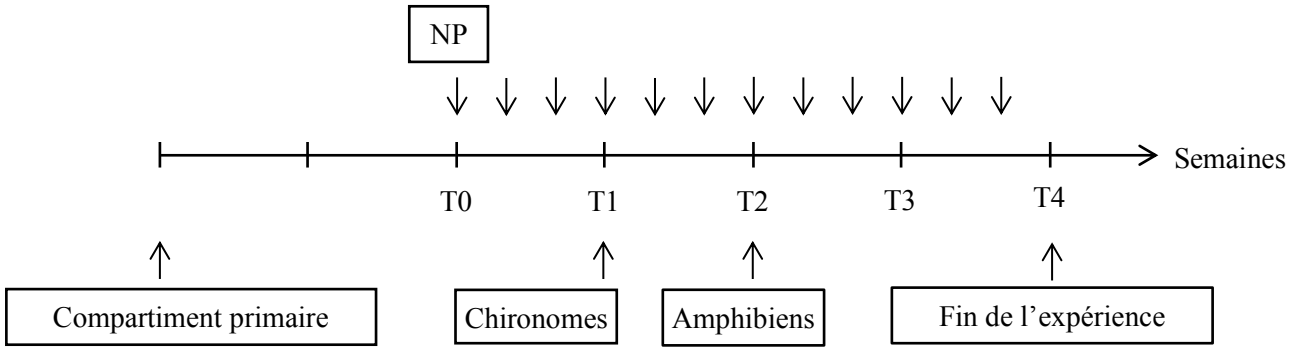


Figure 2 : Représentation schématique du déroulement de l'expérience en microcosme.

3. Résultats et Discussion

3.1 Paramètres physico-chimiques du système

Les courbes de variation de potentiel rédox, conductivité, pH et oxygène dissous sont présentées en figure 3. Après une période de stabilisation d'environ deux semaines, les variations observées sont moins importantes et ne diffèrent pas d'une condition à l'autre, notamment au moment de l'introduction des organismes. A partir de T0 (première contamination aux NP, figure 2), le potentiel rédox varie entre ~280 et 320mV, la conductivité entre ~200 et 230 $\mu S.cm^{-1}$, le pH entre ~7,8 et 8,7 et la saturation en oxygène dissous entre ~85 et 125%. A T0 et jusqu'à la fin de l'expérience, les concentrations en NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+ sont à la plus faible valeur détectable (0 ; < 0,3 et 0 mg/L respectivement). Ces résultats indiquent qu'aucune perturbation majeure du système n'a eu lieu durant l'expérience. De telles perturbations, comme une augmentation importante du pH par exemple, auraient pu avoir des conséquences néfastes sur les organismes.

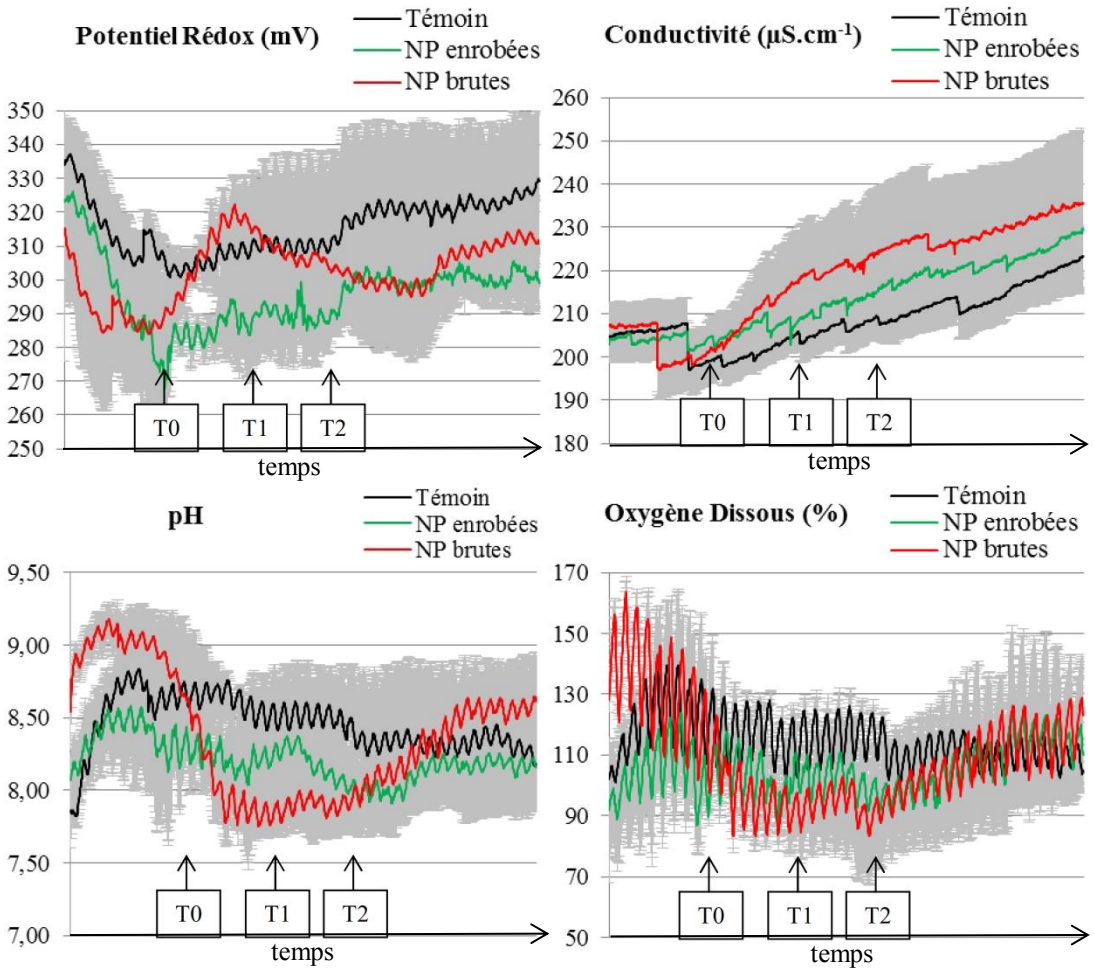


Figure 3 : Courbes de variation de potentiel rédox, conductivité, pH et oxygène dissous (valeurs moyennes) en fonction du temps. Les zones grisées représentent les valeurs d'écarts-type. T0 : première addition de NP ; T1 : introduction des larves de chironome ; T2 : introduction des larves de pleurodèle.

3.2 Distribution des NP

3.2.1 Répartition des NP entre la colonne d'eau et le sédiment

L'accumulation des $nCeO_2$ dans le sédiment et dans la colonne d'eau est présentée en figure 4. L'accumulation dans le sédiment est significativement plus importante pour les NP enrobées que pour les NP brutes (13,4 ±1,9 et 8,3 ±0,6 mg/kg respectivement). Les quantités de NP mesurées dans la colonne d'eau sont faibles, avec des valeurs en fin d'expérience de 346 ±102 et 65 ±16 µg/L, pour les NP enrobées et brutes respectivement. La dissolution des NP, mesurée en fin d'expérience, est de 7,8 ± 3,7 µg/L et 2,4 ± 1,3 µg/L pour les NP enrobées et brutes respectivement, soit 2,3% et 3,7% des quantités totales mesurées dans la colonne d'eau. Ces résultats indiquent que les NP tendent à sédimenter et s'accumuler préférentiellement dans le sédiment (86,5% et 95,5% de NP retrouvées dans le sédiment, pour les NP enrobées et brutes respectivement). De nombreux auteurs ont observé un comportement similaire, expliqué par une agrégation des NP en milieu aquatique entraînant leur sédimentation (Baker *et al*., 2014; Griffitt *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2010; Manier *et al.*, 2013; Quik *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Le comportement des deux types de $nCeO_2$ présentement utilisés a notamment été étudié dans des microcosmes identiques, mais en présence d'espèce différentes (Tella *et al*., 2014). Les auteurs observent une tendance d'accumulation identique dans le sédiment, avec des valeurs pour les NP brutes plus importantes que pour les NP enrobées. Les concentrations en Ce mesurées dans le sédiment, entre 220 et 540 mg/kg sont cependant bien plus élevées que dans notre étude. L'absence d'organismes fouisseurs pourrait être à l'origine des écarts observés. En effet, les larves de chironome présentes dans nos microcosmes ont une activité de bioturbation importante, pouvant remettre en suspension des NP adsorbées à de fines particules de sédiment. Ce phénomène peut être directement dû aux mouvements des larves ou à l'excrétion des NP après ingestion du sédiment contaminé.

Les mesures effectuées dans le sédiment et dans la colonne d'eau montrent également que la quantité totale de NP enrobées est plus importante que la quantité totale de NP brutes. Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Il peut être envisagé que les NP brutes ne sont pas réparties de façon homogène dans la colonne d'eau et se trouvent majoritairement dans une zone intermédiaire, à une profondeur supérieure à 15 cm. La quantité de NP brutes dans l'eau serait alors sous-estimée. Une perte de NP est également envisageable par fixation sur le matériel, tel que les parois des microcosmes et des tuyaux, ou encore dans les pompes. L'enrobage de citrate a pour rôle de diminuer l'agrégation des NP et pourrait donc limiter la fixation des NP sur les surfaces, entraînant une perte de NP brutes plus importante. De tels résultats lors d'exposition aux NP ont déjà été évoqués par plusieurs auteurs (Handy *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2014).

3.2.2 Accumulation des NP dans les organismes

L'accumulation des NP dans les organismes est présentée en figure 5. La quantité de Ce dosée chez les larves de chironome est très importante, avec des valeurs de 606 et 282 mg/kg (poids sec), pour les NP enrobées et brutes respectivement. L'activité de bioturbation des chironomes implique l'ingestion du sédiment dans lequel les larves évoluent,

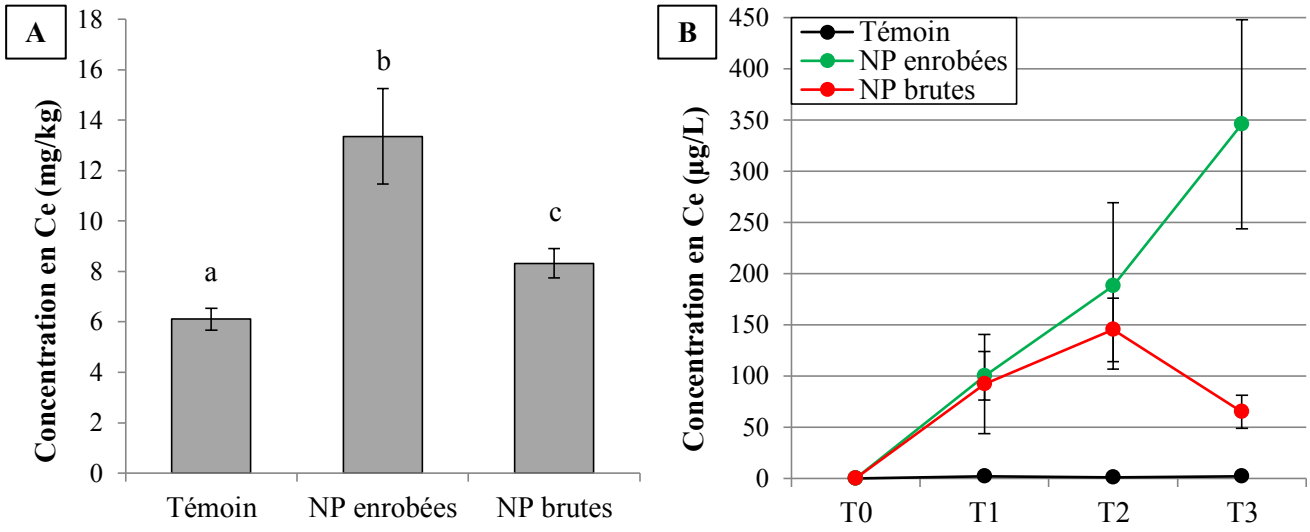


Figure 4 : Accumulation des NP de CeO_2 dans les compartiments abiotiques. (A) dans le sédiment. Les concentrations (valeurs moyennes ± erreur standard) sont mesurées en fin d'expérience. Les lettres (a,b,c) indiquent des groupes statistiques différents. (B) dans la colonne d'eau. Les concentrations (valeurs moyennes ± erreur standard) sont mesurées plusieurs fois durant l'expérience. T0 : première introduction de NP. T1 : introduction des chironomes. T2 : introduction des pleurodèles. T3 : fin de l'expérience.

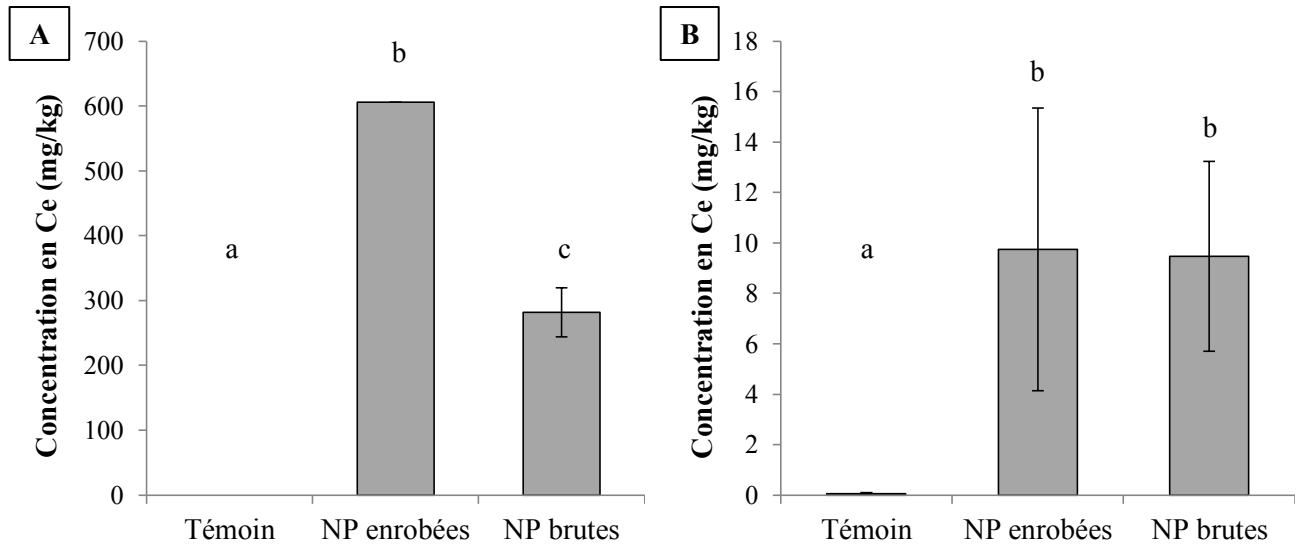


Figure 5 : Accumulation des NP de CeO_2 dans les organismes. (A) chez *C. riparius* et (B) chez *P. waltl.*. Les concentrations (valeurs moyennes ± erreur standard) sont mesurées en fin d'expérience. Les lettres (a,b,c) indiquent des groupes statistiques différents.

comme cela a été montré dans une précédente étude (Bour *et al*., 2015b). En effet, lors des expositions, les larves formaient des blocs macroscopiques de NP présentes en surface et ingéraient ces NP. En outre, le tube digestif des larves de chironome est très développé, proportionnellement à d'autres organes. Celles-ci ont donc la capacité de stocker une grande quantité de matière dans leur tube digestif. Par conséquent, l'activité de bioturbation des larves dans la présente étude entraîne la présence d'une grande quantité de sédiment contaminé dans leur tube digestif, expliquant ainsi les concentrations en Ce très élevées chez les chironomes. En outre, les quantités de Ce significativement plus importantes dans le cas des NP enrobées que dans le cas des NP brutes sont en relation avec la quantité de Ce dans le sédiment, initialement plus importante dans le cas des NP enrobées (figure 4a).

La concentration en Ce chez les larves de pleurodèle, plus faible, est de 9,73 ±5,61 et 9,47 ±3,76 mg/kg (poids sec), pour les NP enrobées et brutes respectivement. Les différences observées ici entre NP ne sont pas significatives, malgré l'écart important entre conditions observé chez les larves de chironomes, maillon inférieur dans la chaîne trophique. Ce résultat n'est pas imputable à la quantité de nourriture ingérée, l'ingestion des chironomes par les pleurodèles étant similaire dans les deux conditions. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, l'enrobage de citrate pourrait faciliter l'excrétion des NP par les pleurodèles, diminuant ainsi la quantité de Ce dosée dans les larves. Zhao et Wang (2011) ont ainsi montré que l'enrobage de NP d'Ag influence la bioaccumulation des NP chez la daphnie. Une seconde hypothèse qui pourrait expliquer l'accumulation observée chez les pleurodèles serait que l'accumulation par voie trophique n'est pas majoritaire, ou du moins que l'accumulation par voie directe (*i.e.* par la colonne d'eau) compense en partie l'accumulation trophique, diminuant ainsi les écarts observés entre conditions chez les larves de chironome.

Plusieurs études ont montré que l'accumulation de NP était plus importante par exposition directe que par voie trophique (Buffet *et al.*, 2014a; Jackson *et al.*, 2012). Cependant, Buffet *et al.* (2013a), Croteau *et al.* (2011) et Judy *et al.* (2011) ont mis en évidence la tendance inverse. En outre, à une exception près (Judy *et al.*, 2011), la majorité des études réalisées sur chaînes trophiques mettent en évidence une absence de bioamplification, c'est-à-dire une accumulation de NP plus faible dans les organismes de niveau trophique supérieur (Fouqueray *et al.*, 2013; Holbrook *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010). Ce phénomène est également observé dans la présente étude, avec en moyenne un facteur de perte de Ce de 46, entre les larves de chironome et de pleurodèle. A l'inverse, on observe une augmentation de l'accumulation du Ce d'un facteur 41 entre le sédiment et les larves de chironome. L'estimation du transfert trophique de polluants est classiquement basée sur le calcul de Facteurs de BioAccumulation (FBA). Dans la présente étude, l'estimation du transfert trophique n'est pas basée sur la bioaccumulation à proprement parler mais sur le calcul de facteurs de perte/augmentation de concentration en Ce d'un maillon à l'autre. En effet, le calcul de FBA est réalisé dans le cas de polluants distribués de manière homogène dans le milieu et lorsque le système est à son état d'équilibre. Or la répartition des NP dans un milieu aqueux est non homogène et un état d'équilibre pour de tels systèmes n'est que théorique, rendant le calcul de FBA inapproprié dans le cas de NP

(Handy *et al.*, 2012). De plus, ce calcul nécessite de doser le polluant dans l'organisme laissé à dépurer suffisamment longtemps pour ne considérer que le polluant accumulé dans les tissus, et non présent de manière temporaire dans le tube digestif. Dans la présente étude, le choix a été fait de ne pas laisser dépurer les organismes avant de doser le Ce. En effet, en conditions naturelles les espèces prédatrices se nourrissent d'organismes non dépurés. Il a donc été jugé pertinent de doser les quantités réelles de Ce ingérées par les pleurodèles, c'est-à-dire chez des larves de chironomes non dépurées. En outre, l'évaluation de la génotoxicité chez les pleurodèles doit être réalisée après 12 jours d'exposition, sans période de dépuration (AFNOR, 2000; ISO 21427-1, 2006). Les larves de pleurodèles n'ont par conséquent pas dépuré non plus avant la réalisation des dosages, afin de respecter au mieux les normes de réalisation de l'essai.

3.3 Toxicité des NP chez les organismes

3.3.1 Impacts sur les larves de C. riparius

Le nombre de larves de chironome restant à la fin de l'expérience est assez faible (< 50 en moyenne), quelles que soient les conditions étudiées. De plus, les imagos (forme adulte) et nymphes (forme intermédiaire entre la larve et l'imago) observés sont rares. Le faible nombre de larves retrouvées peut donc être dû à une mortalité liée aux NP et/ou à la prédation exercée par les pleurodèles. Or il a été montré dans une précédente étude que l'exposition des $nCeO_2$ n'entrainaît pas de mortalité chez les larves de chironome à des concentrations allant de 0,01 à 100 mg/L (Bour *et al*., 2015b). L'hypothèse privilégiée pour expliquer le peu de larves retrouvées serait donc une prédation importante par les pleurodèles. Parmi les larves restantes en fin d'expérience, aucune différence significative de croissance n'a été observée entre conditions (figure 6). La mesure des capsules céphaliques indique également qu'à de très rares exceptions près (2 ou 3 larves par condition), toutes les larves ont atteint le stade IV de développement à la fin de l'expérience, quelle que soit la condition considérée. Ces paramètres indiquent que le développement larvaire des chironomes n'est pas affecté.

Ces résultats sont en accord avec les observations faites lors d'expositions en conditions standardisées (Bour *et al.*, 2015b). Des résultats contradictoires ont cependant été observés par Lee *et al.* (2009), qui ont mis en évidence une mortalité et des effets génotoxiques chez des larves de *C. riparius* exposées à des $nCeO_2$ à 1 mg/L.

3.3.2 Toxicité chez P. waltl.

Aucune mortalité n'a été observée chez les larves de pleurodèle en présence de ces deux types de NP. De même, aucune inhibition de croissance significative n'a été mise en évidence. Toutes les larves mesurées en fin d'expérience sont cependant très petites, y compris dans la condition témoin. En effet, la taille attendue à ce stade de développement varie entre 3,8 et 4,4 cm (Gallien and Durocher, 1957) et n'est ici que de 3,1 cm en moyenne, indiquant une altération globale de la croissance des larves. La croissance très faible des larves entre le début et la fin de l'exposition en microcosme pourrait donc avoir masqué une inhibition de croissance liée à la présence de NP. De tels effets ont été observés lors d'une précédente étude, dans laquelle l'exposition de *P. waltl.* et de l'amphibien *Xenopus laevis* en conditions standardisées à des $nCeO_2$ a entraîné une inhibition de croissance significative dès 1 mg/L (Bour *et al.,* 2015b).

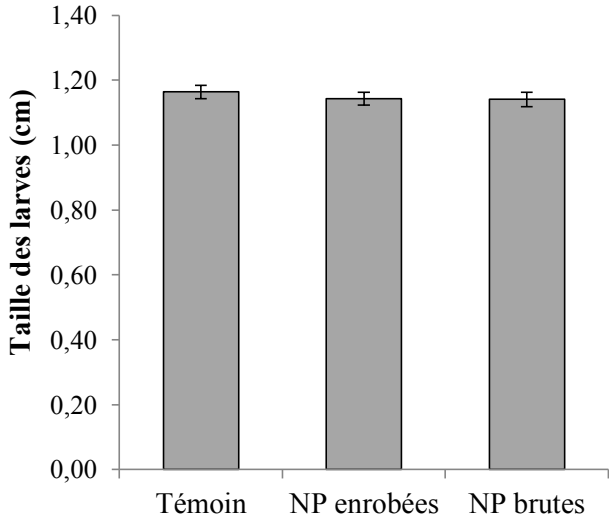


Figure 6 : Croissance des larves de *C. riparius* (valeurs moyennes ± erreur standard).

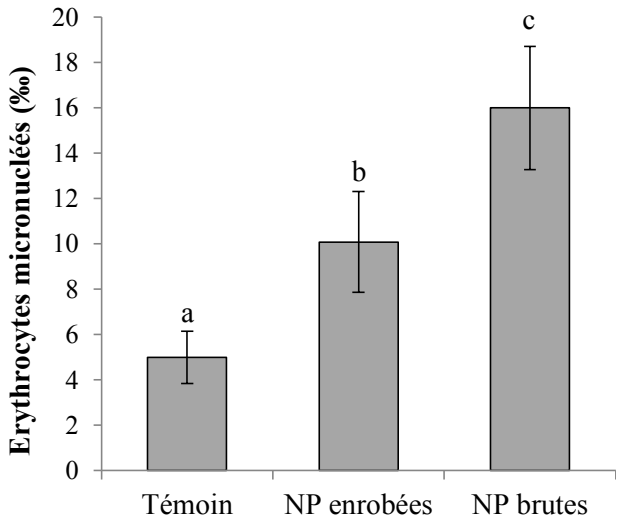


Figure 7 : Génotoxicité chez *P. waltl.*. Les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance à 95% des valeurs médianes. Les lettres (a,b,c) indiquent des groupes statistiques différents.

En revanche, une importante génotoxicité a été mise en évidence chez les larves de pleurodèle exposées aux deux types de NP, avec une induction d'EMN significativement plus importante dans le cas des NP brutes (figure 7). De nombreux auteurs ont mis en évidence l'induction d'effets génotoxiques en présence de NP (Chen *et al.*, 2014; Petersen and Nelson, 2010; Singh *et al.*, 2009). Lee *et al.* (2009) ont notamment observé que l'exposition à des $nCeO_2$ induisait des dommages primaires à l'ADN chez *D. magna* et *C. riparius*. L'induction d'EMN chez *X. laevis* et *P. waltl.* exposés à des $nCeO_2$ en conditions standardisées a été mise en évidence dans une précédente étude (Bour *et al*., 2015b). Contrairement aux dommages primaires, l'induction de micronoyaux met en évidence des dommages à l'ADN non réparables. Ces mutations peuvent donc avoir de graves conséquences pour l'organisme à long terme. Les valeurs d'accumulation des NP chez les pleurodèles laissent supposer que la différence de génotoxicité observée entre les NP enrobées et brutes n'est pas directement liée au taux d'accumulation de Ce dans l'organisme. Cependant, et comme expliqué précédemment, les organismes n'ont pas dépuré avant dosage. Un faible taux d'assimilation de NP risquerait donc d'être masqué par une importante quantité de NP transitoires, non excrétées. On ne peut donc pas complètement exclure qu'un type de NP soit plus assimilé que l'autre, mais que cette différence soit masquée par des concentrations de Ce transitoire très importantes. La différence de génotoxicité pourrait en revanche être expliquée par la présence de l'enrobage de citrate, dont le rôle protecteur a déjà été mis en évidence chez *C. elegans* (Yang *et al.*, 2012) et sur de jeunes pousses de radis (Trujillo-Reyes *et al.*, 2013).

Cette étude en microcosme fait suite à une précédente étude réalisée en conditions d'exposition standardisées (Bour *et al*., 2015b). Lors de cette étude, des effets génotoxiques ont été observés chez les larves de *P. waltl.* exposées à des $nCeO_2$ brutes, alors qu'aucune génotoxicité n'a été enregistrée avec les NP enrobées de citrate. La toxicité observée en microcosme est donc globalement plus importante que lors des

expositions standardisées, avec une induction de micronoyaux en présence des NP enrobées, et d'intensité supérieure pour les NP brutes. Ce phénomène de toxicité accrue en conditions environnementales peut être dû à des transformations biotiques ou abiotiques qui peuvent avoir lieu en milieux complexes (Wiesner *et al.*, 2009). Ainsi, une exposition par voie trophique peut avoir des impacts différents de ceux induits par une exposition directe, et/ou entraîner une modification des NP. La complexification du système en microcosme peut également entraîner des interactions entre espèces qui peuvent moduler la toxicité de polluants. Debenest *et al.* (2011) montrent ainsi que la toxicité d'un retardateur de flamme sur des espèces d'algues est sous-estimée en exposition monospécifique, par comparaison à une exposition multi-espèces. Cependant, les mécanismes de toxicité des NP en conditions environnementales sont encore très peu connus. Les études en microcosmes ou en mésocosmes, à l'interface entre les études de laboratoire et les études de terrain, permettent de mieux appréhender les mécanismes de toxicité qui ont lieu en conditions naturelles. Il est donc nécessaire et urgent qu'un plus grand nombre d'études écotoxicologiques soient menées en microcosme ou mésocosme, afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la toxicité des NP à l'échelle d'un système complexe.

4. Conclusion

Cette étude en microcosme a permis de déterminer le comportement et la toxicité de deux types de $nCeO_2$, enrobées ou brutes, dans un système complexe. Un passage important des NP a été observé de la colonne d'eau vers le sédiment, puis le long de la chaîne trophique jusqu'au maillon supérieur. Les larves de chironome se sont notamment avérées être un vecteur de transfert extrêmement important du fait de leur résistance aux NP et de leur considérable capacité d'ingestion de sédiment contaminé. En effet, aucune toxicité n'a été observée chez les chironomes malgré les très fortes concentrations en Ce mesurées dans les larves. En revanche, une importante toxicité a été mise en évidence chez le pleurodèle, maillon supérieur de la chaîne trophique. Une forte induction de micronoyaux a en effet été mesurée en présence des deux types de $nCeO_2$.

L'utilisation de microcosmes et de chaînes trophiques expérimentales dans le domaine de l'écotoxicologie permet l'étude de systèmes à l'échelle intermédiaire entre les études en laboratoire et sur des écosystèmes naturels. Cette étude représente une première étape dans l'évaluation de l'écotoxicité des $nCeO_2$ en système complexe. Des études complémentaires sont également nécessaires pour comprendre les mécanismes de toxicité des $nCeO_2$ observée en microcosme.

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

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

Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 186, 257–271. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. J. Hazard. Mater. In press.

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

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., 2013a. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve Scrobicularia plana to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89, 117–124. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.019

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

Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013b. A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (Scrobicularia plana, Hediste diversicolor). Environ. Sci. Technol. 47, 1620–1628. doi:10.1021/es303513r

Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014b. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm Hediste diversicolor and the bivalve mollusc Scrobicularia plana. Sci. Total Environ. 470-471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114

Chen, T., Yan, J., Li, Y., 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. J. Food Drug Anal. 22, 95–104. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.008

Cleveland, D., Long, S.E., Pennington, P.L., Cooper, E., Fulton, M.H., Scott, G.I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E.J., Wood, L., 2012. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products. Sci. Total Environ. 421–422, 267–272. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.01.025

Colman, B.P., Arnaout, C.L., Anciaux, S., Gunsch, C.K., Hochella, M.F., Jr, Kim, B., Lowry, G.V., McGill, B.M.,

Reinsch, B.C., Richardson, C.J., Unrine, J.M., Wright, J.P., Yin, L., Bernhardt, E.S., 2013. Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. PloS One 8, e57189. doi:10.1371/journal.pone.0057189

Colman, B.P., Espinasse, B.P., Richardson, C.J., Matson, C.W., Lowry, G., Hunt, D., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S., 2014. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/es405454v

Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Stewart, A.R., 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. Limnol. Oceanogr. 50, 1511–1519. doi:10.4319/lo.2005.50.5.1511

Croteau, M.-N., Misra, S.K., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. Environ. Sci. Technol. 45, 6600–6607. doi:10.1021/es200880c

Debenest, T., Petit, A.-N., Gagné, F., Kohli, M., Nguyen, N., Blaise, C., 2011. Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays. Chemosphere 85, 50–55. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.036

Fang, X., Yu, R., Li, B., Somasundaran, P., Chandran, K., 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO2 and anatase TiO2 nanoparticles on the Nitrosomonas europaea. J. Colloid Interface Sci. 348, 329–334. doi:10.1016/j.jcis.2010.04.075

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. Nat. Nanotechnol. 4, 441–444. doi:10.1038/nnano.2009.157

Fouqueray, M., Noury, P., Dherret, L., Chaurand, P., Abbaci, K., Labille, J., Rose, J., Garric, J., 2013. Exposure of juvenile Danio rerio to aged TiO_2 nanomaterial from sunscreen. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 20, 3340–3350. doi:10.1007/s11356-012-1256-7

Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M., Lead, J.R., Tyler, C.R., Stone, V., 2009. Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. Environ. Health Glob. Access Sci. Source 8 Suppl 1, S2. doi:10.1186/1476-069X-8-S1-S2

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puntes, V., Barata, C., Font, X., Sánchez, A., 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. Desalination 269, 136–141. doi:10.1016/j.desal.2010.10.052

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

Gottschalk, Nowack, B., Gawlik, B., 2010. Report on exposure scenarios and release of nanomaterials to the environment. Nanex Project (WP5).

Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D.S., 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (Danio rerio). Environ. Sci. Technol. 41, 8178–8186.

Handy, R.D., van den Brink, N., Chappell, M., Mühling, M., Behra, R., Dušinská, M., Simpson, P., Ahtiainen, J., Jha, A.N., Seiter, J., Bednar, A., Kennedy, A., Fernandes, T.F., Riediker, M., 2012. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? Ecotoxicol. Lond. Engl. 21, 933–972. doi:10.1007/s10646-012-0862-y

Holbrook, R.D., Murphy, K.E., Morrow, J.B., Cole, K.D., 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. Nat. Nanotechnol. 3, 352–355. doi:10.1038/nnano.2008.110

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Jackson, B.P., Bugge, D., Ranville, J.F., Chen, C.Y., 2012. Bioavailability, Toxicity, and Bioaccumulation of Quantum Dot Nanoparticles to the Amphipod Leptocheirus plumulosus. Environ. Sci. Technol. 46, 5550–5556. doi:10.1021/es202864r

Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. Environ. Sci. Technol. 45, 776–781. doi:10.1021/es103031a

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15, 1–17. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967. doi:10.1021/es902987d

Kulacki, K.J., Cardinale, B.J., Keller, A.A., Bier, R., Dickson, H., 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 2414–2422. doi:10.1002/etc.1962

Lagauzère, S., Pischedda, L., Cuny, P., Gilbert, F., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Influence of Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) and Tubifex tubifex (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 157, 1234–1242. doi:10.1016/j.envpol.2008.12.004

Le Curieux, F., Giller, S., Gauthier, L., Erb, F., Marzin, D., 1995. Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles, using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. Mutat. Res. Toxicol. 341, 289–302. doi:10.1016/0165-1218(95)90100-0

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 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. Environ. Toxicol. Pharmacol. 28, 86–91. doi:10.1016/j.etap.2009.03.001

Lowry, G.V., Espinasse, B.P., Badireddy, A.R., Richardson, C.J., Reinsch, B.C., Bryant, L.D., Bone, A.J., Deonarine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B.P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E.S., Matson, C.W., Wiesner, M.R., 2012. Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. Environ. Sci. Technol. 46, 7027–7036. doi:10.1021/es204608d

Madre, JF, 2006. Logiciel Mesurim. Académie d'Amiens. http://svt.ac-amiens.fr/archives_svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm.

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70. doi:10.1016/j.envpol.2013.04.040

Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests. J. Phys. Conf. Ser. 304, 012058. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012058

McGill, R., Tukey, J.W., Larsen, W.A., 1978. Variations of Box Plots. Am. Stat. 32, 12. doi:10.2307/2683468

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2006. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (Xenopus laevis and Pleurodeles waltl) using the comet assay and the micronucleus test. Environ. Toxicol. 21, 264–277. doi:10.1002/tox.20180

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2011. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. Environ. Toxicol. 26, 136–145. doi:10.1002/tox.20537

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., 2007. Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian Ambystoma mexicanum. Nanotoxicology 1, 149–156. doi:10.1080/17435390701556080

Nfon, E., Cousins, I.T., Broman, D., 2008. Biomagnification of organic pollutants in benthic and pelagic marine food chains from the Baltic Sea. Sci. Total Environ. 397, 190–204. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.029

Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7981–7989. doi:10.1128/AEM.00650-10

Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements. Environ. Sci. Technol. 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999

Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal.

Chem. 398, 613–650. doi:10.1007/s00216-010-3881-7

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14, 1–11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.062

Rodea-Palomares, I., Gonzalo, S., Santiago-Morales, J., Leganés, F., García-Calvo, E., Rosal, R., Fernández-Piñas, F., 2012. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 122-123, 133–143. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.005

Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29, 167–172. doi:10.1016/j.etap.2009.12.003

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30, 3891–3914. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.009

Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. Transfer, transformation, and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b

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

Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A.R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO2 nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (Raphanus sativus) seedlings. J. Hazard. Mater. 263 Pt 2, 677–684. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.030

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: "A sticky story." Nanotoxicology 1–11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Jones, K.L., Hochella, J., Michael F., Di Giulio, R.T., Casman, E., Bernhardt, E.S., 2009. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials†‡. Environ. Sci. Technol. 43, 6458–6462. doi:10.1021/es803621k

Xia, J., Zhao, H.Z., Lu, G.H., 2013. Effects of selected metal oxide nanoparticles on multiple biomarkers in Carassius auratus. Biomed. Environ. Sci. BES 26, 742–749. doi:10.3967/0895-3988.2013.09.005

Yang, X., Gondikas, A.P., Marinakos, S.M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2012. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in Caenorhabditis elegans. Environ. Sci. Technol. 46, 1119–1127. doi:10.1021/es202417t

Yeo, M.-K., Nam, D.-H., 2013. Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: a comparison of TiO2 nanoparticles and nanotubes. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 178, 166–172. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.040

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO2 Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 45, 3725–3730. doi:10.1021/es103309n

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

Zhao, C.-M., Wang, W.-X., 2011. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to Daphnia magna. Nanotoxicology 6, 361–370. doi:10.3109/17435390.2011.579632

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Trophic transfer of TiO2 nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. Chemosphere 79, 928–933. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.022

Zoll-Moreux, C., Ferrier, V., 1999. The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in Xenopus : Two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Res. 33, 2301–2314.

3. Ecotoxicité de NP de CeO_2 à l'échelle d'une chaîne trophique expérimentale: vers une compréhension des mécanismes impliqués

La partie précédente a permis de déterminer le comportement de NP de CeO_2 dans notre système (*i.e.* accumulation dans la colonne d'eau, le sédiment et les organismes) ainsi que leur toxicité sur des organismes représentatifs de deux niveaux trophiques différents : les larves de chironome et de pleurodèle. La présente partie a pour but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité des NP de CeO_2 observée en microcosme, et se focalise notamment sur le maillon supérieur de la chaîne trophique expérimentale, le pleurodèle. Pour ce faire, les larves sont exposées aux NP de CeO_2 suivant différentes méthodes, afin d'étudier l'implication de plusieurs voies d'exposition dans la toxicité des NP. Un seul type de NP de CeO_2, différent de ceux étudiés dans la partie précédente, est étudié ici.

Cette étude fait l'objet d'un article soumis dans la revue *Nanotoxicology*. Le résumé en Français ci-dessous présente les principaux résultats obtenus.

RESUME :

Cette étude présente les effets de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2 NP) sur une portion de chaîne trophique expérimentale d'eau douce, reconstituée en microcosme. Le système étudié comprend des espèces représentatives de trois niveaux trophiques différents : un compartiment primaire constitué de diatomées et de communautés bactériennes et fongiques ; les larves du diptère *Chironomus riparius*, en tant que consommateur primaire ; les larves de l'amphibien *Pleurodeles waltl.*, consommateur secondaire et dernier maillon de la chaîne trophique. Dans ce travail, nous nous sommes principalement focalisés sur la toxicité des NP et les mécanismes impliqués au niveau trophique supérieur : les larves carnivores de pleurodèle. La contamination des microcosmes consiste en des injections répétées de NP dans la colonne d'eau durant quatre semaines, pour atteindre la concentration finale de 1 mg/L. Les CeO_2 NP étudiées sont cubiques, non enrobées, et de diamètre hydrodynamique de 90 nm. Les résultats montrent que les NP tendent à quitter rapidement la colonne d'eau et à s'accumuler dans les sédiments. Aucun effet des CeO_2 NP n'a été observé sur la décomposition de la litière ni sur la biomasse mycélienne associée. En revanche, des changements ont été observés dans la composition des communautés bactériennes, à partir de la troisième semaine de contamination. Des modifications morphologiques des NP ont été mises en évidence à la fin de l'expérience. Aucune toxicité n'a été observée chez les larves de chironomes, malgré une accumulation importante de NP (265,8 mg de Ce/kg).

Une concentration en Ce moyenne de 13,5 mg/kg et un taux de mortalité de 35% ont été enregistrés chez les larves de pleurodèle. Des expériences complémentaires ont donc été réalisées sur ces organismes afin de déterminer les mécanismes de toxicité impliqués. Ainsi, les larves de pleurodèle ont été exposées aux CeO_2 NP, d'une part par voie directe en conditions normalisées, d'autre part par voie trophique uniquement. Pour cela, des larves de chironome ont préalablement été exposées aux NP, puis données à manger aux larves de pleurodèles, placées dans un milieu d'exposition non contaminé. Aucune toxicité n'a été observée dans ces conditions, ni par exposition directe aux NP ni par voie trophique, malgré des concentrations en Ce mesurées chez les larves proches de 100 mg/kg. Au vu de ces résultats, différents mécanismes possiblement impliqués dans la toxicité observée sont proposés et discutés. En premier lieu, l'hypothèse d'une intoxication due à un dysfonctionnement du système est écartée. En effet, aucun déséquilibre entre les différents maillons trophiques n'a été mis en évidence, et les paramètres physico-chimiques du système ne varient pas par rapport à la condition témoin. Les expériences complémentaires précédemment décrites permettent également de conclure que la toxicité observée en microcosme n'est pas due à une voie d'exposition privilégiée, ni directement liée à l'accumulation des NP chez les larves de pleurodèle. Les hypothèses proposées par la suite concernent les conséquences des interactions entre les NP et les organismes. Une première hypothèse serait une toxicité indirecte des NP, due à la réaction des micro-organismes aux NP, entraînant la libération de métabolites toxiques. Une seconde hypothèse concerne des changements de spéciation des NP, qui pourraient avoir lieu suite à leur contact avec les organismes ou à l'activité de bioturbation des larves de chironome. Enfin, la dernière hypothèse discutée suggère qu'une dissolution partielle des CeO_2 NP serait à l'origine de la toxicité observée chez les pleurodèles. En effet, celle-ci pourrait provenir des ions libérés par la dissolution des NP ou des complexes formés entre ces ions et des composés organiques présents dans le milieu. La présente étude souligne l'importance de réaliser l'évaluation écotoxicologique des NP dans des conditions d'exposition représentatives des conditions naturelles, à l'aide de systèmes biologiques complexes.

Toxicity of CeO_2 nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: insight into the involved mechanisms through the use of mesocosms

Bour A.[1,6], Mouchet F.[1,6,*] Cadarsi S.[1,6], Silvestre J.[1,6], Verneuil, L.[1,6], Baqué D.[1], Chauvet E.[2], Bonzom JM.[3,6], Pagnout C.[4,6], Clivot H.[4,6], Tella M.[5,6], Auffan M.[5,6], Laury Gauthier[1,6] and Eric Pinelli[1,6]

[1] CNRS, Université de Toulouse ; INP, UPS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) UMR 5245; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326, Castanet Tolosan, France

[2] CNRS, Université de Toulouse ; INP, UPS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) UMR 5245; 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

[3] Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire), DEI/SECRE, Cadarache, France

[4] CNRS, Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux) UMR 7360, Metz, France

[5] CNRS, Université d'Aix-Marseille, CEREGE UMR 7330, Aix-en-Provence, France

[6] International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology (iCEINT), Aix-en-Provence, France

[*]Corresponding author:
E-mail address: florence.mouchet@ensat.fr
Phone number: +33 (0)5 34 32 37 56
Postal address: EcoLab, campus ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France

KEY WORDS

Amphibian – Micro-organisms – Chironomidae – Ecotoxicity – Litter decomposition

ABSTRACT

The toxicity of CeO_2 NPs on an experimental freshwater ecosystem was studied in mesocosm, with a focus being placed on the higher trophic level, *i.e.* the carnivorous amphibian species *Pleurodeles waltl.*. The system comprised species at three trophic levels: (i) bacteria, fungi and diatoms, (ii) *Chironomus riparius* larvae as primary consumers and (iii) *Pleurodeles* larvae as secondary consumers. NP contamination consisted of repeated additions of CeO_2 NPs over four weeks, to obtain a final concentration of 1 mg/L. NPs were found to settle and accumulate in the sediment. No effects were observed on litter decomposition or associated fungal biomass. Changes in bacterial communities were observed from the third week of NP contamination. Morphological changes in CeO_2 NPs were observed at the end of the experiment. No toxicity was recorded in chironomids, despite substantial NP accumulation (265.8±14.1 mg Ce/kg). Mortality (35.3±6.8%) and a mean Ce concentration of 13.5±3.9 mg/kg were reported for *Pleurodeles*. Parallel experiments were performed on *Pleurodeles* to determine toxicity mechanisms: No toxicity was observed by direct or dietary exposures, although Ce concentrations almost reached 100 mg/kg. In view of these results, various toxicity mechanisms are proposed and discussed. The toxicity observed on *Pleurodeles* in mesocosm may be indirect, due to micro-organism's interaction with CeO_2 NPs, or NP dissolution could have occurred in mesocosm due to the structural complexity of the biological environment, resulting in toxicity to *Pleurodeles*. This study strongly supports the importance of ecotoxicological assessment of NPs under environmentally relevant conditions, using complex biological systems.

1. Introduction

Past decades have seen the emergence of new manufactured materials: nanoparticles (NPs). These particles in the size range of 1 – 100 nm present unique properties, making them highly attractive in many fields of application, including medical purposes (Huang *et al*., 2011), information and energy storage systems (Rao and Cheetham, 2001) and many consumer products (The Royal Society, 2004). Among these particles, cerium dioxide NPs (CeO_2 NPs) are widely used as fuel catalysts and for anti-UV effects in coatings, paints and cosmetics (Quik *et al*., 2010). Produced in large amounts (100 – 1000 tons/year) in Europe (Piccinno *et al*., 2012), CeO_2 NPs belong to the OECD priority testing list of representative manufactured nanomaterials (OECD, 2010).

Therefore, several studies have investigated the toxicity of CeO_2 NPs, and they were determined to be acutely toxic to daphnids (García *et al*., 2011; Lee *et al*., 2009), chironomids (Lee *et al*., 2009), nematodes (Roh *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011), algae (Manier *et al*., 2013, 2011; Rogers *et al*., 2010) and bacteria (Thill *et al*., 2006), from concentrations in the range of the mg/L. The induction of sub-lethal effects was also shown, with reproduction impairments being observed on nematodes (Roh *et al*., 2010) and daphnids (Manier *et al*., 2011), as well as growth inhibition and malformations observed on fish at 10 mg/L (Jemec *et al*., 2012) and genotoxic effects observed on amphibian species (Bour *et al*., 2015), chironomids and daphnids (Lee *et al*., 2009). These studies have been conducted according to standardized procedures, enabling a rapid evaluation of NP toxicity at broad ranges of concentrations. However, although necessary as a first step of NP ecotoxicity evaluation, standardized ecotoxicity assays are not representative of realistic environmental conditions of exposure. Studies concerning NP ecotoxicity in environmentally relevant conditions have been conducted very recently. Among these studies, mesocosm studies have been conducted to determine NP behavior and toxicity in complex environments (Buffet *et al*., 2013b; Cleveland *et al*., 2012; Colman *et al*., 2014; Ferry *et al*., 2009; Lowry *et al*., 2012; Schierz *et al*., 2014). These studies are still scarce, though indispensable: modest effects within a single trophic level can ramify and amplify through the ecological network and influence the function of the entire ecosystem (Jabiol *et al*., 2013). Moreover, physico-chemical transformation of NPs (*e.g.* colloidal destabilization, adsorption, dissolution) in complex environments can change the nature of the interactions with living organisms. NP toxicity can thus be different in complex ecosystems than in single exposure (Wiesner *et al*., 2009).

The amphibian species *Pleurodeles waltl.* is a well-known indicator of the genotoxic potential of contaminants (Djomo *et al*., 2000; Fernandez *et al*., 1993), referenced in the ISO standardized assay for the evaluation of genotoxicity on aquatic invertebrates (ISO 21427-1, 2006). This model organism also presents the advantage of being carnivorous, making it particularly interesting for food chain studies. The macro-invertebrate *Chironomus riparius* is representative of many freshwater ecosystems and has been widely used in ecotoxicology. Chironomid larvae have important activities of sediment reworking and biofilm grazing, making them potential vectors for trophic transfer. *Nitzschia palea* and *Navicula pelliculosa* are benthic diatoms living in numerous freshwater ecosystems. They represent a valuable source of food for many aquatic organisms and are at the base of multiple trophic webs. The toxicity of

CeO_2 NPs on *P. waltl.*, *C. riparius* and *N. palea* have previously been studied in standardized exposure conditions (Bour *et al*., 2015).

The present study intends to go further in the comprehension of CeO_2 NP toxicity and associated mechanisms in environmentally relevant exposure conditions using larvae of the amphibian *P. waltl.* as top-consumers of an experimental trophic chain. For this purpose, we used indoor aquatic mesocosms to perform integrated assessment of CeO_2 NP impacts in complex environment. This study was complemented with parallel experiments where *Pleurodeles* larvae were exposed to CeO_2 NPs by direct or dietary exposure. Mesocosms are complex systems comprising (i) a bacterial consortium and the diatom species *N. palea* and *N. pelliculosa* as primary producers, (ii) *C. riparius* larvae as primary consumers and (iii) *Pleurodeles* larvae, as predator species at the top of the trophic chain. The complete study of CeO_2 NP fate and effects in mesocosm has already been studied (Auffan *et al*., 2014) and is beyond the scope of the present paper. This study focuses on the impacts on *Pleurodeles* larvae, as the final endpoint of the trophic chain, considering the potentially involved toxicity mechanisms. Other species present in mesocosm are studied as vectors of contamination through the trophic chain.

2. Material and Methods

2.1 Nanoparticles

CeO_2 NPs (Nanograin®, Umicore) were provided as a powder preparation and subsequently suspended in ultrapure water at 10 g/L. They are non-coated particles of cerine with a face centered cubic crystal structure. They have zeta potential of +42 ±2 mV and hydrodynamic diameters centered on of 90 ±2 nm in stock suspension (pH 3.1). Zeta potential and hydrodynamic diameters were measured using Malvern zetasizer and nanoZs (Malvern Instruments Ltd). Primary size and shape were determined in stock suspension and exposure media by Transmission Electron Microscopy (TEM, JeolJsm 2100F, HR) coupled to Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX, SDD Brucker). Size distribution is determined by image analysis (ImageJ® software) on a sample of 100 NPs.

2.2 Organisms

Diatoms (*N. palea* and *N. pelliculosa*), chironomid (*C. riparius*) and amphibian (*P. waltl.*) larvae were grown at EcoLab laboratory. Diatoms were cultured in CHU 10 medium with Fe-EDTA as an iron source (http://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/chu-10). *Pleurodeles* larvae were obtained and grown as described in (Mouchet *et al*., 2011). Chironomid larvae were obtained and grown following standardized procedures (AFNOR, 2004). A microbial consortium was isolated from water filters of the freshwater Museum-Aquarium of Nancy (France).

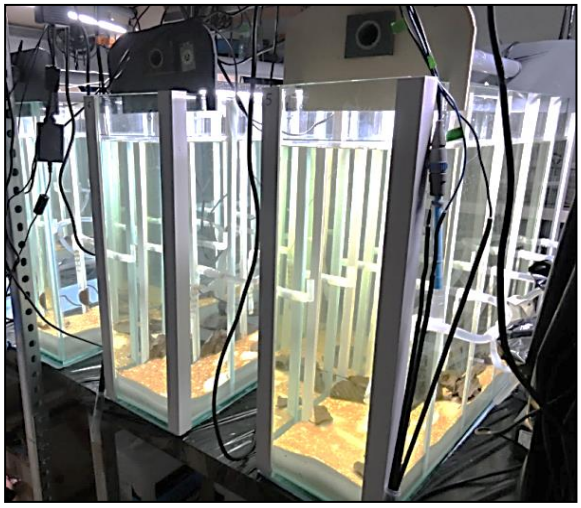


Figure 1: Aquatic mesocosms before NP contamination (T0).

2.3 Exposure methods

2.3.1 Mesocosm experiment

Six mesocosms (glass tanks; 75 x 20 x 60 cm; figure 1) were filled with reconstituted sediment (89% silica sand, 10% kaolin, 1% calcium carbonate) and Volvic® water. Each mesocosm contained 6.5 L of reconstituted sediment and 56 L of water and was equipped with a water recirculating system connected to a pump (Eheim universal, 600 L/h). Natural light was provided by T8 tubes (18W, 5500K, Vivalite®) under 16:8 light-dark cycles and temperature was maintained at 21 ± 1°C. Temperature, conductivity, pH, redox potential, and dissolved oxygen were monitored continuously (Ponsel Odeon open X probes kit). NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+ rates were controlled every three days with a colorimetric assay kit (Tetra, Germany). Dissolved organic carbon (DOC) was measured in the water column by infrared detection of CO_2 produced by catalytic oxidation at 680°C. Experimental conditions were realized in three replicates, with random assignation of mesocosms.

Experiment implementation: Senescent alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.) leaves (3.2 g dry mass/mesocosm) and micro-organisms (a microbial consortium and the diatoms *N. palea* and *N. pelliculosa*, 2.10^2 and 2.10^4 cells/ml, respectively) were added at the beginning of the experiment. Biofilm was allowed to develop for two weeks before NP contamination (figure 2 and 3). Contamination consisted of repeated addition of NPs: 12 additions of fresh NP suspension (50 ml of 93.4 mg/L per input) were realized over four weeks. Deionized water was added in control mesocosms instead of NP suspension. After one week of contamination (T1), 700 chironomid larvae aged of 72h were added to each mesocosm. Seventeen *Pleurodeles* larvae at stage 53 of development (Gallien and Durocher, 1957) were introduced one week later (T2). The experiment ended 12 days later (T4): amphibian larvae were withdrawn from mesocosms for immediate toxicity assessment and sediment was sieved to collect remaining chironomids, then stored in 70% ethanol for further analysis. The overall implementation is presented in figure 3.

2.3.2 Direct exposure

Direct exposure of *Pleurodeles* larvae was performed according to standardized test for mincronucleus induction assessment (ISO 21427-1, 2006). Groups of 15 larvae at stage 53 of development (Gallien and Durocher, 1957) were exposed in Volvic® water for 12 days, with daily medium renewal. CeO_2 NP concentrations ranged from 0.015 to 1.4 mg/L. A standard mutagen (monohydrate cyclophosphamide 2 mg/L; ISO 21427-1, 2006; Sigma, France) was used as a positive control. At the end of the exposure, larvae were allowed to depurate for two days in non-contaminated Volvic® water.

2.3.3 Dietary exposure

As a first step, chironomid larvae (7d old) were exposed to CeO_2 NPs at 1 mg/L for 48h. Exposure was performed in Volvic® water (without sediments). Larvae from control group ("control chironomids") were placed in non-contaminated Volvic® water.

Pleurodeles dietary exposure is adapted from standardized procedures (ISO 21427-1, 2006). Larvae (n = 20) at stage 53 of development (Gallien and Durocher, 1957) are individually placed in 200 ml of Volvic® water for 12 days, with water renewal every two days. Every day, the same number of chironomids previously exposed was provided to each *Pleurodeles* larvae. The control group (n = 10) was fed on control chironomids, and the contaminated group (n = 10) was fed on contaminated chironomids.

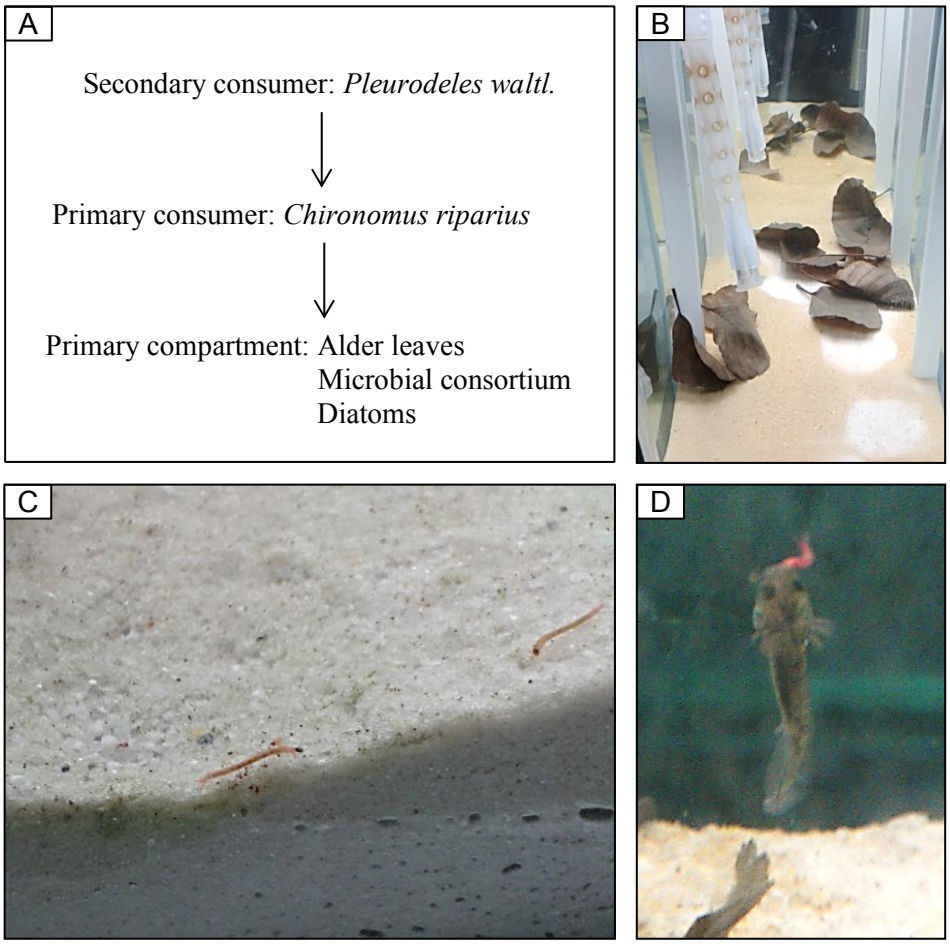


Figure 2: Experimental trophic chain studied in mesocosm. (A) Schematic representation of trophic relations between species, from consumers to prey. (B) Primary compartment before NP contamination. Biofilm cannot develop under alder leaves due to a lack of light, leaving white patches when leaves move. (C) *Chironomus riparius* larvae grazing biofilm. (D) *Pleurodeles waltl.* larvae hunting chironomid larvae.

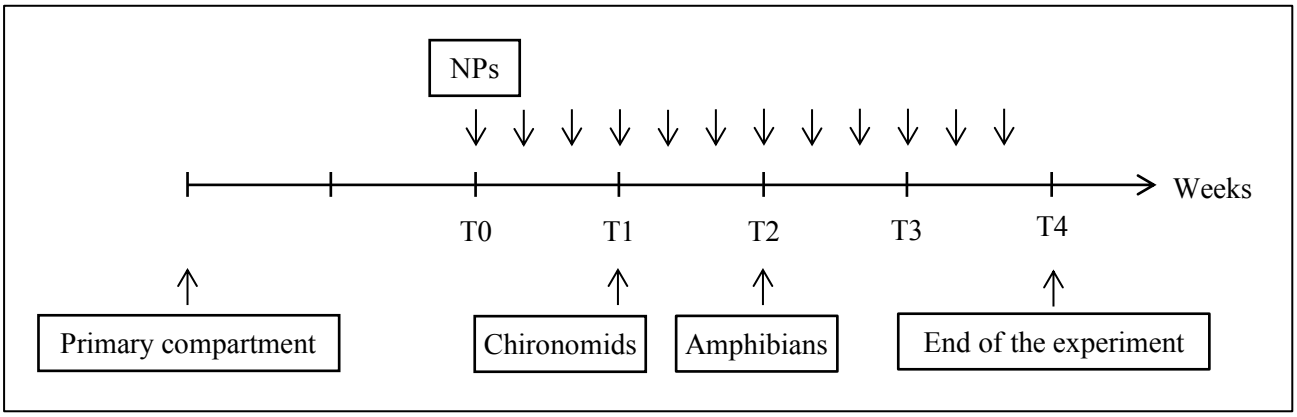


Figure 3: Schematic representation of mesocosm experiment implementation.

The number of chironomids was increased over time to comply with the growing needs of the *Pleurodeles*. Before feeding the *Pleurodeles* larvae, the chironomids were gently rinsed with deionized water but not allowed to depurate, to mimic natural conditions where depuration does not occur. *Pleurodeles* were allowed to depurate for two days and gently rinsed with deionized water at the end of the exposure, for bioaccumulation assessment purposes.

Pleurodeles exposure water was sampled before renewal to assess Ce release from organisms.

2.4 NP quantification

Ce concentrations were measured in water, in sediment and in organisms by ICP-MS (PerkinElmer, NexIon 300X). In mesocosms, water was sampled at 10 cm below the surface before the first NP addition (T0), before chironomid and *Pleurodeles* larvae introduction (T1 and T2, respectively) and at the end of the experiment (T4), and analyzed for total and dissolved Ce. The dissolved fraction was estimated after ultracentrifugation (80 000 rpm, 1h). Surficial sediment (10 mm) was sampled at the end of the experiment for total Ce concentrations after acidic digestion. In addition, cores were analyzed to get Ce contents in 1 mm-deep slices. Ce concentrations in organisms were measured in triplicates (pools of three *Pleurodeles* and 20 chironomid larvae). Water, sediment and organisms samples were prepared as described in Tella *et al.* (2014).

2.5 Toxicity assessment

2.5.1 Toxicity on Pleurodeles larvae

Toxicity assessment on *Pleurodeles* was consistent for the three exposure methods. Acute toxicity was expressed as percentage and determined as the total number of dead larvae, counted and removed daily. Genotoxicity was assessed as micronuclei induction in erythrocytes from circulating blood, as described in Mouchet *et al*. (2011) and in accordance with the standardized ISO procedure (ISO, 2006).

NP internalization was assessed on gills and intestine for the mesocosm experiment and on intestine only for dietary exposure experiment. After blood sampling, larvae were dissected and organs were fixed in 2% glutaraldehyde in sodium phosphate buffer, post fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Embed812-Araldite502 resin. Ultra-thin sections (50 to 90 nm deep) were mounted on copper grids and subsequently stained in lead citrate and uranyl acetate solutions. Observations were performed on high resolution TEM-EDX (JeolJsm 2100F, HR - SDD Brucker).

2.5.2 Litter decomposition and toxicity on associated organisms

Leaf litter decomposition: The proportion of leaf mass remaining at T4 was measured by dividing the final ash-free dry mass (AFDM) of leaves by their initial AFDM. Both final and initial (n=5) organic matter contents were determined on 500 mg portions of ground samples ashed at 550°C for 4 h.

Fungal biomass was estimated on 5 frozen-dried leaf disks (12 mm diameter) per leaf sample, using ergosterol contents (Gessner and Chauvet, 1993). Ergosterol was extracted and partially purified by solid-phase extraction, then separated and quantified using HPLC. Treatment effects on remaining leaf AFDM and leaf-associated fungal biomass (expressed as ergosterol per leaf AFDM) were assessed using an analysis of variance (ANOVA) test (SigmaPlot 12.0 software).

Effects on bacterial communities: Effects on bacterial communities were assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis as described in Clivot *et al*. (2012). Pelagic micro-organisms were sampled every week by water filtration (total volume of 100 ml, filtered at 0.45 µm). Detailed information on DNA extraction and DGGE analysis procedures are provided in supplementary material.

Toxicity on chironomid larvae: Larval growth was determined at T4 by measuring body length (ImageJ® software). Organism sizes were compared with a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to analyze differences between groups (SigmaPlot 12.0 software).

3. Results

3.1 Mesocosm experiment

Physico-chemical parameters of the water column: variation curves are presented in figure S1 (Supplementary Material). pH values were comprised between 8.0 and 8.7 with a slight increase at the beginning of the experiment. A peak in oxygen rate was also observed at this period and then values decreased and stabilized at approximately 90 – 120% of saturation. On the contrary, redox potential slightly decreased at the beginning of the experiment and quickly stabilized at approximately 320 mV. Finally, conductivity slightly increased over time, with values ranging from 200 to 230 µS/cm. No significant variations were observed between conditions, except for pH with the first input of NPs: A slight decrease (from 8.5 to 7.7) was observed in the contaminated condition. However, a quick recovery was observed and no significant differences with control were recorded until the end of the experiment. At T0 (first NP introduction) and until the end of the exposure, NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+ concentrations were at the lowest detectable values (0, < 0.3 and 0 mg/L, respectively). No significant differences in DOC contents in water were observed between conditions ($p < 0.05$), with mean values of 2.9 ± 0.3 and 3.4 ± 0.2 mg/L for control and contaminated condition, respectively.

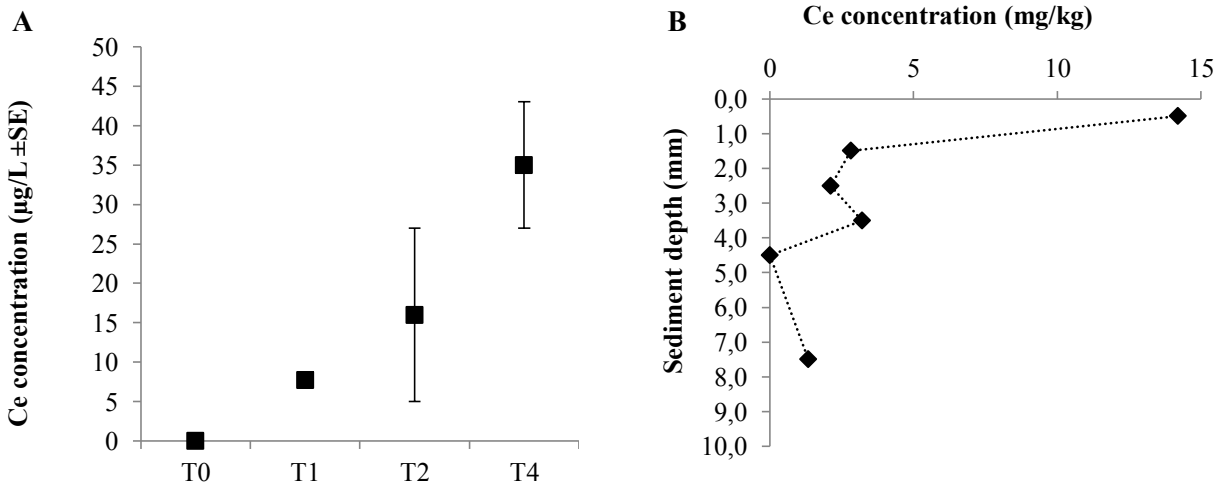


Figure 4: Ce concentrations (A) in the water column, at different sampling times and (B) in the sediment at T4. Data are corrected from background concentrations determined in control mesocosm.

Ce concentrations in water and sediment: Ce concentration in the water column increased over time to reach 35 ± 8 µg/L (3.5% of total Ce introduced) at T4 (figure 4A). The fraction of dissolved Ce represented 2.6% of total Ce in water at this time. Mean Ce concentration in the first cm of sediment was 5.5 ± 2.2 mg/kg, with most of the Ce (60%) found in the first mm. After a significant decrease, Ce concentration increased from the second and the fifth mm of depth, with a decrease observed between 3 and 4 mm of depth (figure 4B).

Leaf litter and micro-organisms: bacterial community structure distances indicated differences among communities in control and NP conditions, from the third week of contamination (figure 5). ANOSIM performed on the DGGE profiles confirmed that bacterial communities from NP condition were different from those of control condition, with more pronounced effects being observed at the end of the experiment. No significant differences between conditions ($p > 0.05$) were observed in both the percentage of leaf AFDM remaining (12.0 ± 0.1% and 11.9 ± 0.2% for control and NP conditions, respectively) and leaf-associated fungal biomass (28.7 ± 8.0 and 44.2 ± 12.8 mg/g for control and NP conditions, respectively) at the end of the experiment.

Chironomids: less than 50 larvae remained at the end of the experiment in both conditions, with no significant difference between conditions. Growth assessment on remaining larvae showed no difference between conditions, with mean sizes of 11.4 ± 0.2 and 11.5 ± 0.2 mm for control and NP conditions, respectively. Ce quantification indicated substantial NP accumulation in chironomid larvae, with 265.8 ± 14.1 mg/kg. No Ce was detected in control groups.

Pleurodeles: significant mortality (35.3 ± 6.8%) was observed in NP condition, whereas no mortality occurred in control groups. Moreover, visual observation indicated that contrary to control conditions, surviving larvae in NP condition exhibited a strong disturbance of general health (no hunting behavior or response to mechanical stimulation). Therefore, genotoxicity was not assessed for this experiment because of the high level of intoxication of *Pleurodeles* larvae. TEM investigation performed on gills and intestine did not allow NP internalization to be observed; no NPs were observed inside the gills or across the intestinal epithelium. However, Ce quantification in *Pleurodeles* larvae indicated significant NP accumulation, with a Ce mean concentration of 13.5 ± 3.9 mg/kg (figure 6, table 1). No Ce was detected in control groups.

Nanoparticles: water was sampled at the end of the exposure (10 cm above the water surface) and analyzed by TEM-EDX to determine NP size. While NPs in stock suspension are large (8 – 61 nm, median size of 25 nm; see figure S2 for size distribution) with multiple edges (figure 7A), NPs at the end of mesocosm exposure were significantly smaller (< 4 nm, figures 7E-G and S2).

3.2 Direct exposure in standardized conditions

No toxicity was observed in *Pleurodeles* larvae exposed to CeO_2 NPs *via* the water column. No mortality was recorded and no significant genotoxicity was observed at any of the concentrations tested (figure 8). NP accumulation in larvae was observed for every concentration tested with Ce concentrations ranging from 1.21 to 6.11 mg/kg (figures 6 and S3).

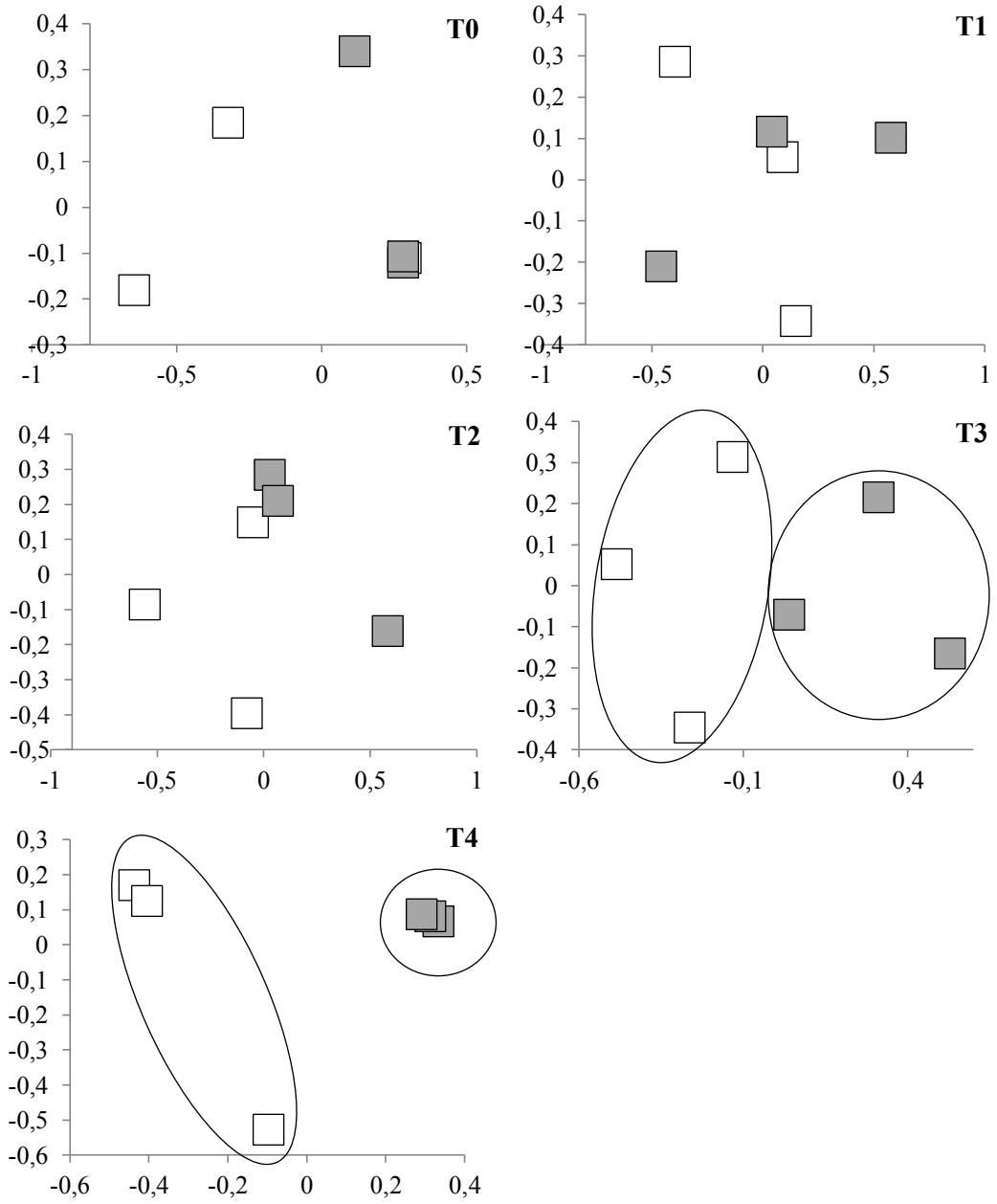


Figure 5: NMDS plots of DGGE pelagic bacterial community profiles from control (white squares) and NP (grey squares) conditions, before the first NP addition (T0) and after 1, 2, 3 and 4 weeks (T1, T2, T3 and T4, respectively) of contamination.

3.3 Dietary exposure

Important NP accumulation was observed in chironomid larvae, with a mean Ce concentration of 445 ±137 mg/kg. Visual observation showed that chironomid larvae were ingested quickly (< 30 min), and Ce was not detected in the *Pleurodeles* water exposure before renewal.

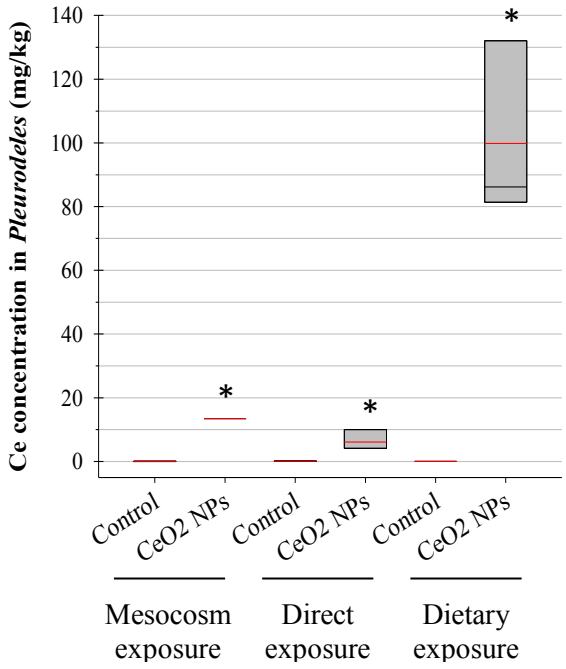


Figure 6: Value distribution of Ce concentrations in *P. waltl.* larvae, for different methods of exposure at similar concentrations. For direct exposure, selected data correspond to the initial concentration of 1.4 mg/L.
Box plots show the medians, 10th, 25th, 75th and 90th percentiles. Red lines show mean values.
*: Significantly different from control

An important NP accumulation was observed in *Pleurodeles* larvae, with a mean Ce concentration of 99.9 ± 16.1 mg/kg (figure 6, table 1). Despite this significant NP accumulation, neither mortality nor genotoxicity were observed for *Pleurodeles*.

TEM observation of larvae intestine showed no evidence of NP absorption through intestinal epithelium: As for mesocosm exposure, no NP was observed to cross the epithelium.

4. Discussion

To date, few studies on NPs have been performed in complex exposure systems. Among them, studies on species at different trophic levels are scarce (Auffan *et al.*, 2014; Ferry *et al.*, 2009; Kulacki *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a). The present study investigates the toxicity of CeO_2 NPs in mesocosms, on species representative of three different trophic levels: litter and microbial communities as primary producers/consumers, chironomid larvae as primary consumers and the predator *Pleurodeles* larvae as secondary consumers. Severe toxicity was observed on *Pleurodeles*, leading to investigations of different parameters possibly involved in NP toxicity mechanisms.

4.1 Indirect effects due to system functioning

The experimental trophic chain studied (figure 2) has been designed to be self-sufficient over the entire experiment. However, impacts on primary producers or consumers could alter this balance. First, biofilm observation indicated that it was well-developed in both conditions until amphibian introduction. Moreover, chironomid larvae had almost reached their maximum size (12 – 14 mm) at the end of the experiment, even in presence of NPs, indicating enough food supply for these organisms. Changes observed in bacterial communities could have induced disturbances in the nitrogen cycle and the production of highly toxic compounds, such as NO_2^-, but measurement of nitrogen compounds in mesocosms did not reveal any changes. Moreover, our results showed that CeO_2 NPs did not alter the activity of leaf

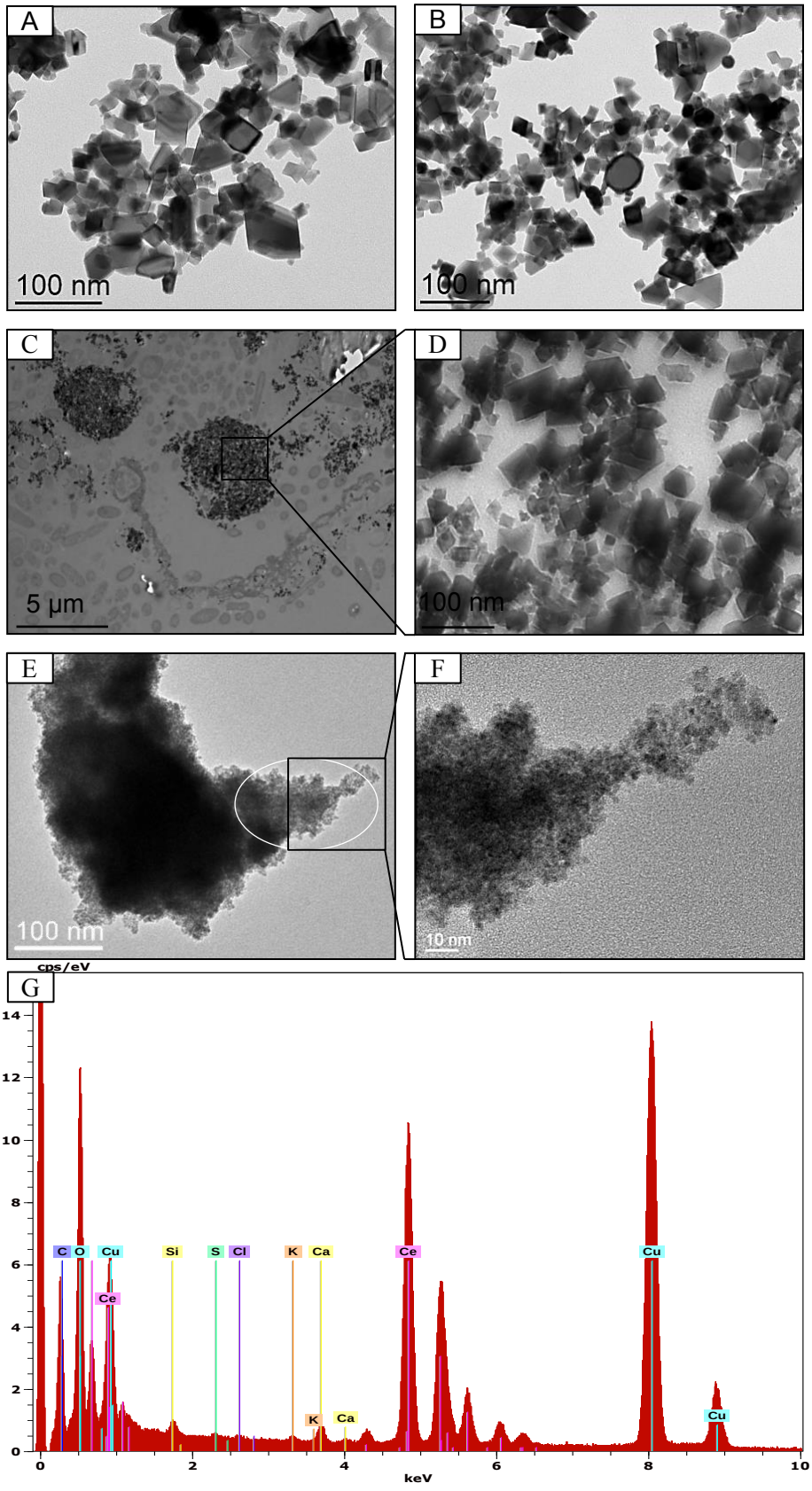


Figure 7: Transmission Electron Microscopy (TEM) coupled to Energy Dispersive X-ray microscopy (EDX) analysis of CeO_2 NPs (A) in stock suspension, (B) in direct exposure medium, after 24h of exposure (before renewal), (C – D) in chiromid larvae intestine after 48h of exposure (dietary exposure) and (E – G) in mesocosm exposure medium, at the end of the experiment. G: EDX analysis of sample from mesocosm exposure, performed in the zone indicated by a white circle in E. Cu spike corresponds to the copper grid.

decomposers, *i.e.* micro-organisms and chironomid larvae, and the rate of leaf decomposition. Leaf litter decomposition results in the formation and release of fine particulate organic matter that can interact with NPs and stabilize them (Manier *et al*., 2011; Quik *et al.*, 2010). It could be hypothesized that organic compounds potentially toxic are also released in the water column due to litter decomposition, even though the amount of leaf litter was relatively low. An increase in litter decomposition could have thus led to potentially harmful effects. However, the absence of significant differences in litter decomposition between conditions, in accordance with the similar DOC content in water, indicates that the observed toxicity on *Pleurodeles* is not directly related to the detrital food web.

Finally, chironomid larvae were not impacted by NPs. Visual observation indicated a significant burrowing activity, as confirmed by the Ce concentration pattern in sediment (figure 4B). Indeed, the increased concentrations observed at the third mm and from five mm are mainly due to bioturbation activity. In the absence of dwelling organisms, Tella *et al*. (2014) only found Ce in the first mm of the sediment. Very few chironomid larvae remained at the end of the experiment (< 50 over 700) and no emergence was observed (*i.e.* chironomids stayed under larval form and did not leave the water column). Previous studies on *C. riparius* (Bour *et al*., 2015) showed that the CeO_2 NPs did not induce mortality on this species at a broad range of concentrations (0.01 – 100 mg/L). This indicates that the high number of missing larvae is most likely because of predation by the amphibians rather than mortality due to NPs. The study of larval growth also showed that chironomids almost reached their maximum size (12 – 14 mm). Altogether, these results indicate that the toxicity observed on *Pleurodeles* is not likely to be due to a lack of food, compared to control conditions.

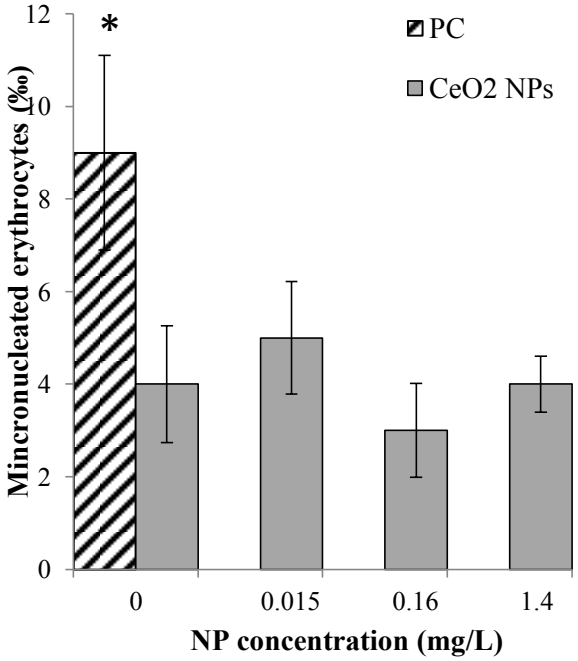


Figure 8: Genotoxicity on *P. waltl*. larvae directly exposed to CeO_2 NPs. Error bars show the 95% confidence interval of median values. PC: positive control. *: significantly different from control.

4.2 Implication of different routes of exposure

In mesocosms, NP exposure to *Pleurodeles* is likely to occur *via* two pathways: direct exposure from water column and dietary exposure *via* contaminated chironomids. Parallel experiments conducted on *Pleurodeles* allow better understanding of the implications for these two routes of exposure in the toxicity observed in mesocosms.

Direct exposure: Standardized single-species exposure allowed studies of the NP direct toxicity on a broad range of concentrations, including the concentration studied in mesocosm. The absence of toxicity observed in this experiment

indicates that direct exposure to CeO_2 NPs is not likely to be a major source of toxicity to *Pleurodeles,* at least in these exposure conditions. Indeed, as standardized and mesocosm exposure conditions are completely different, results cannot be directly extrapolated from an experiment to the other and are rather indicative of a general mechanism of action of CeO_2 NPs.

Dietary exposure: The rapid ingestion of chironomid larvae suggests that they are not likely to depurate, the contact time with non-contaminated water being very short. This is confirmed by the Ce concentrations in the water below the detection limits, besides indicating that Ce is not released in the water by *Pleurodeles* either. These results confirm that *Pleurodeles* exposure occurred only *via* trophic route during this experiment. The absence of NPs across the intestinal epithelium or in the microvilli could suggest that NPs do not cross the epithelial barrier. However, NP detection by TEM analysis in biological samples is not easy, especially at low concentrations. Indeed, as intestinal cross section are very thin (50 – 90 nm) and the NP concentration studied quite low, the probability for an isolated NP or NP aggregates to be found within the section is very low and the number of sections analyzed should be considerably high. Moreover, artifacts can result from the presence of non-metallic crystals, such as quartz from the sediment, and all of the observations require EDX analysis to confirm the chemical nature of the observed crystal. Thus, TEM investigations in biological samples do not seem to be the most appropriate technique in terms of ease and rapidity of performance. Therefore, despite the absence of NP observation across the intestine epithelial barrier, NP absorption through the intestine cannot be excluded. Furthermore, the important NP concentration measured in the larvae after depuration indicates that CeO_2 NPs are accumulated when ingested. Finally, the absence of toxicity on *Pleurodeles* larvae during this experiment indicates that trophic route does not play a major role in the toxicity of CeO_2 NPs on this species, despite the observed accumulation.

These experiments and the associated absence of toxicity on *Pleurodeles* indicate that the toxicity observed in mesocosm cannot be entirely explained by direct exposure or dietary exposure to CeO_2 NPs, considered independently.

4.3 Role of NP accumulation

The three exposure methods presently studied at comparable concentrations (1 mg/L for mesocosm and dietary exposure; 1.4 mg/L for direct exposure) induced variable NP accumulation in *Pleurodeles*. Dietary exposure resulted in the most significant accumulation, with almost 10 times more Ce accumulated than in the mesocosm experiment. This result can be explained by the amount of chironomid larvae ingested: during the dietary exposure, optimum quantity of food was provided to *Pleurodeles* and every larva ingested 96 chironomids over the 12 days of the experiment. However, mean number of chironomid available per *Pleurodeles* in mesocosm was only 38. Moreover, NP accumulation in chironomid larvae in the mesocosm experiment was almost twice as low as in the dietary experiment, resulting in reduced Ce availability for *Pleurodeles via* the trophic route. The lowest accumulation was observed for direct exposure, similarly to other studies where NPs have been shown to bioaccumulate more significantly by the trophic route, compared to direct exposure (Cleveland *et al*., 2012; Croteau *et al*., 2011; Judy *et al*., 2011). The heterogeneous NP accumulation in *Pleurodeles* for the same

experiment could be explained by natural biological variation. The important variations observed in *Pleurodeles* for dietary exposure (figure 6) could also be due to the extremely variable accumulation in chironomid larvae. Indeed, as for *Pleurodeles* larvae, NP contents in chironomid larvae vary importantly, due to heterogeneous organism size and/or feeding behavior. This natural variation observed in chironomid larvae is transmitted to and magnified in the higher trophic level, leading to consequent variations in NP accumulation in *Pleurodeles* larvae.

The different exposure methods highlight that toxicity is not correlated to CeO_2 NP accumulation, as shown in table 1. Indeed, no toxicity occurred with the extremely high NP concentration of ~100 mg/kg in *Pleurodeles*, but mortality was observed at the intermediate accumulation value (13.5 mg/kg), in mesocosm experiment. This result is in accordance with previous studies that underline that no direct relationship exists between NP bioaccumulation and toxicity (Buffet *et al*., 2013a; Jackson *et al*., 2012).

4.4 Nano-bio and bio-nano interactions

Nanoparticles interact with their environment and can be modified on contact with complex matrices (Wiesner *et al.*, 2011). Lowry *et al.* (2012) report chemical modifications of Ag NPs in long-term mesocosm exposure. Similarly, biotransformation of CeO_2 NPs was observed in contact with plant systems (Zhang *et al*., 2012b). In the present study, CeO_2 NPs were found to undergo morphological changes in mesocosm exposure, with important size decrease (figure S2) and erosion of NP edges, indicating mass loss. The most abundant elements detected by EDX analyses on MET observations were Ce and O, while P was not detected (figure 7G). These results support the presence of CeO_2 NPs instead of $CePO_4$ mineral phases. It has been reported that NPs with rough surfaces, corners and edges can be biologically and chemically highly reactive (George *et al*., 2012; Pelletier *et al.*, 2010). In the present mesocosm experiment, chemical reactions may have occurred at the numerous contact points from NP edges, resulting in edges erosion and size decrease. This could explain that the CeO_2 NPs studied, initially large (up to 60 nm) and non-spherical, were found to be significantly smaller (< 10 nm) and spherical at the end of the experiment.

As shown in figure 7, NP morphological changes were not observed in exposure medium of standardized exposure or in chironomid larvae gut during dietary exposure. The presence of microbial communities in mesocosms may have an important role in NP modifications. Indeed, several studies reported interactions between CeO_2 NPs and microbial species (Fang *et al*., 2010; Manier *et al*., 2013; Thill *et al.*, 2006; Zeyons *et al*., 2009). Other NP modifications can also occur in complex matrices due to the presence of many biological molecules (Nel *et al*., 2009) and these "nano-bio" interactions can have different impacts in terms of toxicity.

First, NP interaction with microbial species could result in indirect toxicity for other species because of toxin production. Indeed, fungi produce many secondary metabolites, especially as a defense against predators (Arsuffi and Suberkropp, 1989). Similarly, Thill *et al.* (2006) suggested that when exposed to CeO_2 NPs, bacteria developed a defense system against NPs by releasing molecules able to reduce NPs and preventing cytotoxicity. In the present experiment, the observed changes in bacterial communities could have led to the

Table 1: Toxicity and NP accumulation in *P. waltl.* larvae observed for different exposure methods.

	Mesocosm exposure	Direct exposure	Dietary exposure
Toxicity on *Pleurodeles*	35.3 ± 6.8% mortality[1] Genotoxicity: *nd*[2]	No mortality No genotoxicity	No mortality No genotoxicity
Ce concentration in *Pleurodeles* (mg/kg)[1]	13.5 ±3.9	6.1 ±2.0	99.9 ±16.1

[1]Mean values ± standard error
[2]Not determined

predominance of bacterial species potentially toxic for *Pleurodeles*. Bacterial communities could also have reacted to CeO_2 NPs and released toxic organic molecules in the water. Similarly, even though fungal biomasses did not differ between conditions, it cannot be excluded that they produced mycotoxins in reaction to NPs. It thus can be hypothesized that such molecules could be the cause of the acute toxicity observed on *Pleurodeles* larvae in mesocosm.

A second hypothesis to explain the toxicity observed in mesocosm relates to NP speciation and dissolution. Unlike ZnO or Ag NPs, CeO_2 NP dissolution is generally considered negligible (Manier *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2010). However, Zhang *et al.* (2012b) observed CeO_2 NP biotransformation in plant systems, attributed to biogenic reducing substances and organic acids. They suggest that NPs are partially dissolved by organic substances and that the resulting Ce^{3+} ions are precipitated on root surfaces or form $CePO_4$ or Ce-carboxyl compounds complexes. Furthermore, Thill *et al*. (2006) observed CeO_2 NP reduction in the presence of bacteria. Bioturbation may also impact the distribution and speciation of metallic contaminants (Lagauzère *et al*., 2009). In the present study, it thus could be hypothesized that the presence of microbial communities or chironomids in mesocosm induces CeO_2 NP reduction, leading to Ce^{3+} release in the water column. Despite the rather low dissolved fraction of Ce measured in the water column, the observation of NP morphological changes and mass loss in mesocosm strongly supports the hypothesis of NP dissolution. Moreover, Ce^{3+} ions could have precipitated after complexing with phosphates. Zeyons *et al*. (2009) suggest that soluble Ce^{3+} ions present in NP suspension could partly be the cause of the toxicity observed on the cyanobacteria *Synechocystis* PCC6803 exposed to CeO_2 NPs. Therefore, although the initial CeO_2 NP form is not toxic, as suggested by the absence of toxicity in other experimental conditions, ionic or complexed forms potentially present in mesocosms could be toxic to *Pleurodeles*.

5. Conclusions

Mesocosm exposure to CeO_2 NPs led to different responses depending on the organisms. No effects were observed on litter decomposition or the associated fungal biomass, but changes in bacterial community were observed from the third week of NP contamination. No effects were reported on chironomid larvae, despite a significant NP accumulation. The most severe toxicity was observed on *Pleurodeles* larvae, with a significant mortality in the presence of NPs. This toxicity on *Pleurodeles* was not observed in other exposure conditions: No toxicity was recorded on larvae directly

exposed to NPs or *via* the trophic route. Moreover, no correlation between NP bioaccumulation and toxicity was observed. This suggests that complex phenomena occur in mesocosms and modulate NP toxicity. Different mechanisms are suggested: (i) CeO_2 NPs in mesocosms could lead to indirect effects on *Pleurodeles* through micro-organism reaction to CeO_2 NPs and (ii) NP dissolution could have occurred in mesocosms, following changes in Ce speciation, leading to toxic compounds.

This study allowed validation of the feasibility of the simple carnivorous trophic chain "chironomid larvae – *Pleurodeles* larvae", with CeO_2 NP transfer from prey to predator. This study also enabled validation of the whole functioning of the complex system studied in mesocosms. Indeed, this system comprising species at different trophic levels has proven to be self-sufficient over a long exposure time, with CeO_2 NP transfer along the whole trophic chain. This complex system allowed detecting effects that could not be observed with standardized assays. Studies at intermediate size scales, as with these small size indoor mesocosms, are therefore crucial in the field of nano-ecotoxicology as they enable investigations on toxicity mechanisms in complex systems, while controlling certain biotic and abiotic parameters.

Acknowledgments

Thanks to Umicore company for providing CeO_2 NPs. The authors also thank Sophie Caissaignon and Corinne Chaneac (Collège de France, Paris, France) for CeO_2 NP characterization and Sylvain Lamothe for his helpful technical assistance. The authors also thank the CNRS for funding the GDRi iCEINT. The English language of the manuscript has been corrected by an English language editing company.

Declaration of interest

This study was conducted in the frame of the ANR-10-NANO-0006/MESONNET project, funded by the French National Research Agency (ANR). The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Arsuffi, T.L., Suberkropp, K., 1989. Selective feeding by shredders on leaf-colonizing stream fungi: comparison of macroinvertebrate taxa. Oecologia 79, 30–37.

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

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015. Toxicity of CeO2 nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. Chemosphere 120, 230–236.

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., 2013a. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve Scrobicularia plana to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89, 117–124.

Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013b. A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (Scrobicularia plana, Hediste diversicolor). Environ. Sci. Technol. 47, 1620–1628.

Cleveland, D., Long, S.E., Pennington, P.L., Cooper, E., Fulton, M.H., Scott, G.I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E.J., Wood, L., 2012. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products. Sci. Total Environ. 421–422, 267–272.

Clivot, H., Pagnout, C., Aran, D., Devin, S., Bauda, P., Poupin, P., Guérold, F., 2012. Changes in soil bacterial communities following liming of acidified forests. Appl. Soil Ecol. 59, 116–123.

Colman, B.P., Espinasse, B.P., Richardson, C.J., Matson, C.W., Lowry, G., Hunt, D., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S., 2014. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. Environ. Sci. Technol.

Croteau, M.-N., Misra, S.K., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. Environ. Sci. Technol. 45, 6600–6607.

Djomo, J.E., Ferrier, V., Békaert, C., 2000. Amphibian Micronucleus Test in Vivo (Jaylet Test) to Evaluate the Genotoxicity of Petrochemical Waste Waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, 168–174.

Fang, X., Yu, R., Li, B., Somasundaran, P., Chandran, K., 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO2 and anatase TiO2 nanoparticles on the Nitrosomonas europaea. J. Colloid Interface Sci. 348, 329–334.

Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 292, 83–99.

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. Nat. Nanotechnol. 4, 441–444.

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puntes, V., Barata, C., Font, X., Sánchez, A., 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. Desalination 269, 136–141.

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I.,

Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano 6, 3745–3759.

Gessner, M.O., Chauvet, E., 1993. Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 59, 502–507.

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 155, 344–357.

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Jabiol, J., McKie, B.G., Bruder, A., Bernadet, C., Gessner, M.O., Chauvet, E., 2013. Trophic complexity enhances ecosystem functioning in an aquatic detritus-based model system. J. Anim. Ecol. 82, 1042–1051.

Jackson, B.P., Bugge, D., Ranville, J.F., Chen, C.Y., 2012. Bioavailability, Toxicity, and Bioaccumulation of Quantum Dot Nanoparticles to the Amphipod Leptocheirus plumulosus. Environ. Sci. Technol. 46, 5550–5556.

Jemec, A., Djinović, P., Tišler, T., Pintar, A., 2012. Effects of four CeO2 nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish Danio rerio and crustacean Daphnia magna. J. Hazard. Mater. 219-220, 213–220.

Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. Environ. Sci. Technol. 45, 776–781.

Kulacki, K.J., Cardinale, B.J., Keller, A.A., Bier, R., Dickson, H., 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 2414–2422.

Lagauzère, S., Boyer, P., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of Chironomus riparius larvae (Insecta, Diptera) and Tubifex tubifex worms (Annelida, Tubificidae). Chemosphere 76, 324–334.

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 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. Environ. Toxicol. Pharmacol. 28, 86–91.

Lowry, G.V., Espinasse, B.P., Badireddy, A.R., Richardson, C.J., Reinsch, B.C., Bryant, L.D., Bone, A.J., Deonarine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B.P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E.S., Matson, C.W., Wiesner, M.R., 2012. Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. Environ. Sci. Technol. 46, 7027–7036.

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70.

Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence

on the results of ecotoxicological tests. J. Phys. Conf. Ser. 304, 012058.

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

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nat. Mater. 8, 543–557.

OECD, 2010. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27, Organisation for Economic Co-operation and Development.

Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7981–7989.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14, 1–11.

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715.

Rao, C.N.R., Cheetham, A.K., 2001. Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects. J. Mater. Chem. 11, 2887–2894.

Rogers, N.J., Franklin, N.M., Apte, S.C., Batley, G.E., Angel, B.M., Lead, J.R., Baalousha, M., 2010. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO2 in freshwater. Environ. Chem. 7, 50.

Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29, 167–172.

Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T., Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. Environ. Sci. Nano.

Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. Transfer, transformation, and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013.

The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO2 Nanoparticles for Escherichia coli. Physico-Chemical Insight of the

Cytotoxicity Mechanism. Environ. Sci. Technol. 40, 6151–6156.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Casman, E., Bertsch, P.M., Matson, C.W., Di Giulio, R.T., Liu, J., Hochella, M.F., 2011. Meditations on the Ubiquity and Mutability of Nano-Sized Materials in the Environment. ACS Nano 5, 8466–8470.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Jones, K.L., Hochella, J., Michael F., Di Giulio, R.T., Casman, E., Bernhardt, E.S., 2009. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials†‡. Environ. Sci. Technol. 43, 6458–6462.

Zeyons, O., Thill, A., Chauvat, F., Menguy, N., Cassier-Chauvat, C., Oréar, C., Daraspe, J., Auffan, M., Rose, J., Spalla, O., 2009. Direct and indirect CeO2 nanoparticles toxicity for Escherichia coli and Synechocystis. Nanotoxicology 3, 284–295.

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO2 Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 45, 3725–3730.

Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y., Zhang, Z., 2012a. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. Chemosphere 89, 530–535.

Zhang, P., Ma, Y., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Guo, Z., Tai, R., Zhao, Y., Chai, Z., 2012b. Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants. ACS Nano 6, 9943–9950.

Supplementary Material

Microbial community diversity assessment

DNA extraction: DNA is extracted from filters with PowerSoil DNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA), following producer's instructions. Universal primers 341F-GC and 907R (Muyzer et al., 2004, 1993) are used for the partial amplification of rDNA 16S. PCR mix (100 µl) contains 6U of TaqPolymerase (5 PRIME, Hambourg, Germany), 10 µL of Taq 10x buffer, 200 µM of dNTP, 0.5 µM of primers and 50 ng of extracted DNA. PCR protocol consists in 5 minutes of denaturation at 95°C; 20 cycles of 30s at 95°C, 30s at 65-55°C (touchdown -0,5°C per cycle), 35s at 72°C ; followed by 10 cycles of 30s at 95°C, 30s at 55°C and 35s at 72°C and final elongation of 7 minutes at 72°C.

DGGE analysis: PCR products are verified on agarose gel (1% w/v) and separated with the DCODE Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). PCR products migration is then realized on polyacrylamide gel (7% w/v) with TAE 1x buffer at 65V and 60°C for 16h. Gel is then marked with SYBR Green I and visualized with STARION FLA-9000 scanner (Fujifilm Life Sciences FSVT, Courbevoie, France). GelCompar II software was used to normalize and compare DGGE profiles. 1% of tolerance is applied for the position. Grouped analysis of DGGE profiles is realized following the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) method, based on the similarity coefficients. A correlation matrix is then generated for each comparison and data are analyzed by NMDS with SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Similarity analysis is realized with PAST software (Hammer *et al*., 2001) to characterize differences between samples.

Figure S1: Variation curves of pH, oxygen rate, conductivity and redox potential during mesocosm experiment (mean values). Light gray zones show the standard error values. T0: first NP addition, T1: chironomid larvae introduction, T2: *P. waltl.* larvae introduction.

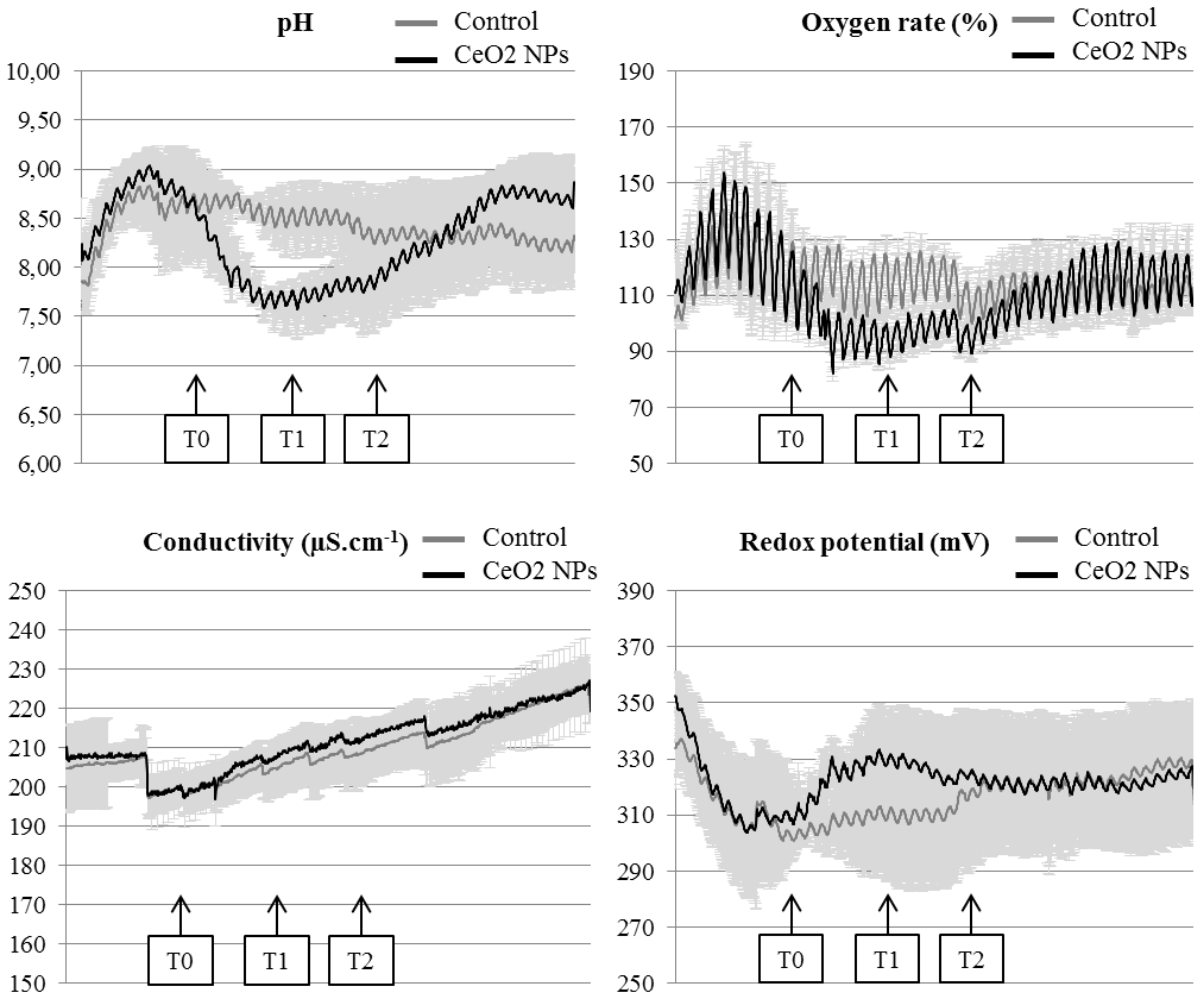


Figure S2: NP size distributions in stock suspension at T0 (A) and in mesocosm water column at T4 (B). NP size is determined on TEM pictures (ImageJ® software), on a total sample of 100 NP per condition.

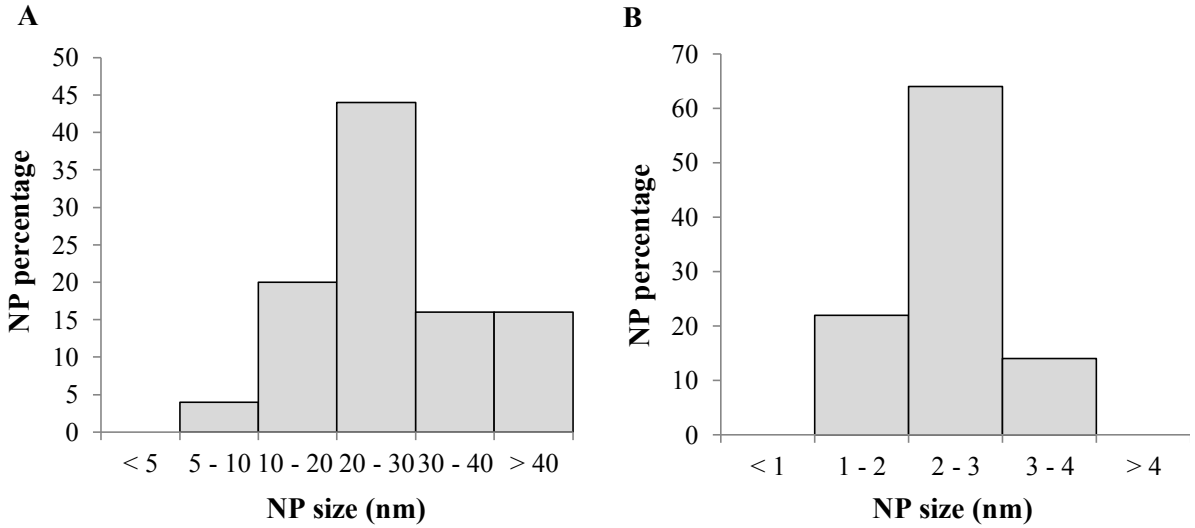
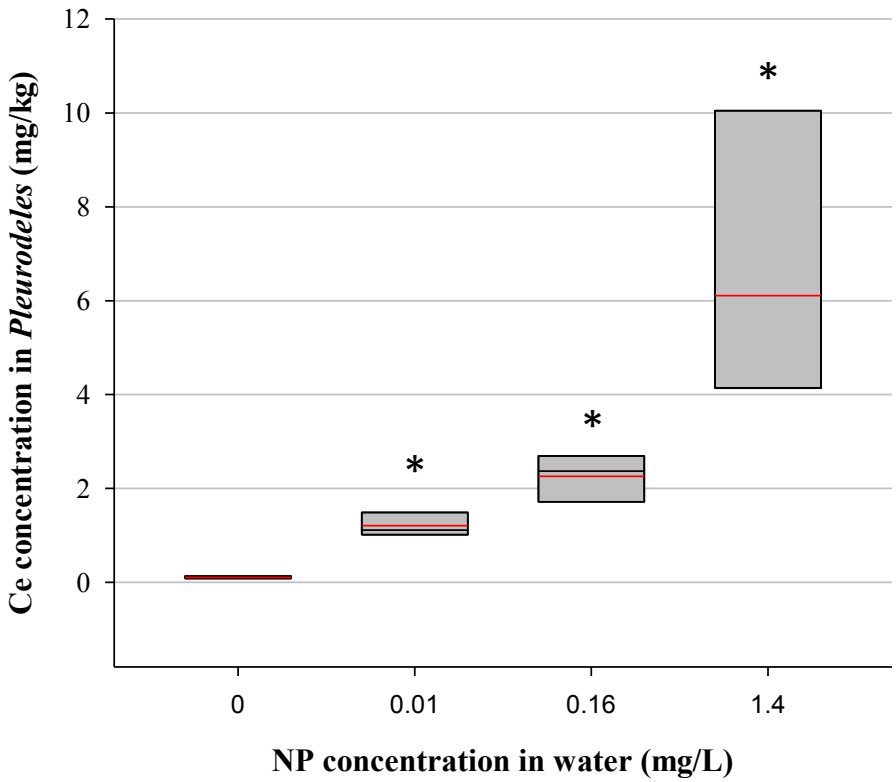


Figure S3: Value distribution of Ce concentrations in *P. waltl.* larvae after direct NP exposure. Box plots show the medians, 10th, 25th, 75th and 90th percentiles. Red lines show mean values. *: significantly different from control.



References

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4 (1), 9.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. 743–769.

Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Résultats complémentaires

Cette section propose des résultats non présentés dans l'article soumis en vue d'une publication. Il s'agit des observations réalisées en MET sur des coupes de branchies (figure 18) et d'intestins (figure 19) de larves de pleurodèles exposées en microcosme. La préparation des coupes a été réalisée au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB, Toulouse, I. Fourquaux).

Les branchies et l'intestin ont été les premiers organes sélectionnés pour l'analyse en MET car ils sont les premiers susceptibles d'être en contact avec les NP, par voies directe et trophique respectivement. Ces observations mettent en évidence des cristaux présents dans les organes étudiés. Bien qu'on puisse penser à première vue à des NP de CeO_2, l'analyse des coupes par EDX ne permet pas de mettre en évidence la présence de cérium. Ces résultats illustrent les biais possibles lors des analyses en MET, évoqués dans l'article précédent.

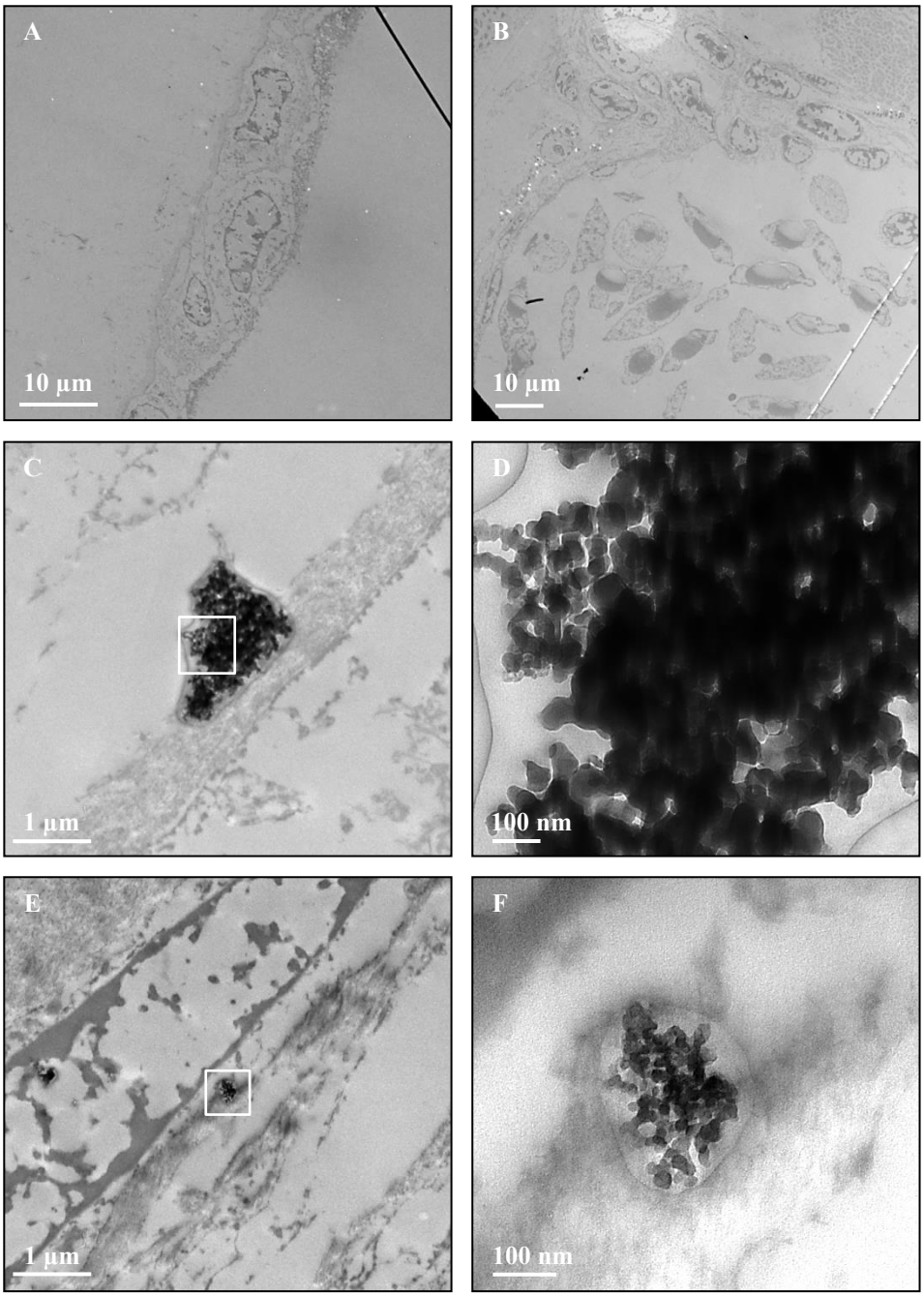


Figure 18 : Observation en MET de coupes ultrafines de branchies de larves de pleurodèle exposées en microcosme. (A,B) larves témoins ; différentes zones observées. (C,E) larves exposées aux NP ; amas de cristaux pris dans du mucus. (D,F) grossissements des amas observés en C et E respectivement (zones encadrées).

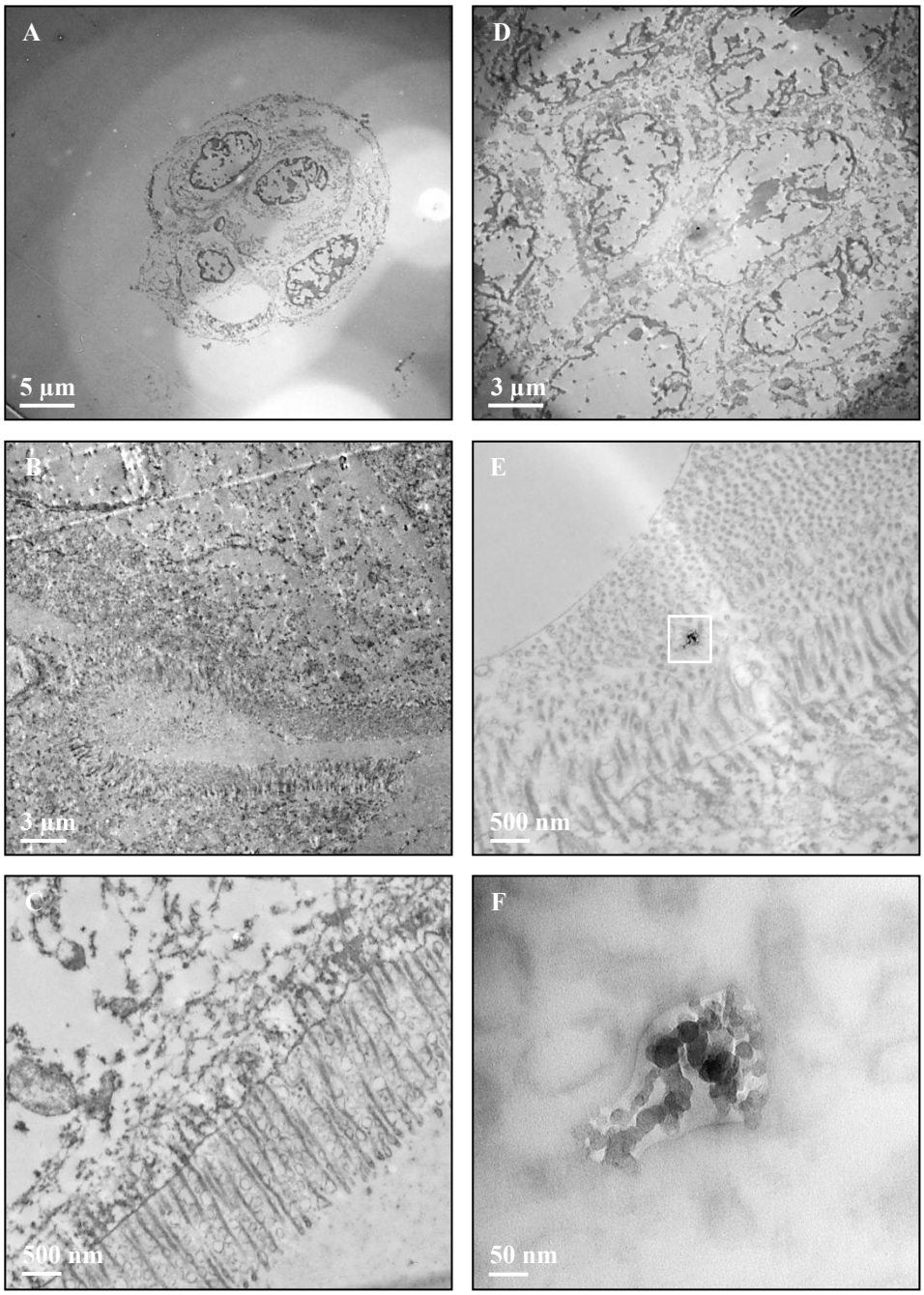


Figure 19 : Observation en MET de coupes ultrafines d'intestins de larves de pleurodèle exposées en microcosme. (A,B,C) larves témoins : (A) vue d'ensemble de la coupe transversale, (B) replis de la muqueuse intestinale, (C) microvillosités. (D,E,F) larves exposées aux NP : (D) vue d'ensemble de la coupe transversale, (E) amas de cristaux pris entre les microvillosités, (F) grossissements de l'amas observé en E (zone encadrée).

4. Impacts de NP de CeO_2 sur le fonctionnement d'un écosystème aquatique : étude de la décomposition de la litière par les micro et macro-organismes associés

Dans la partie précédente, nous avons étudié la toxicité des NP de CeO_2 chez les larves de pleurodèle, ainsi que les mécanismes d'action potentiellement impliqués. La présente partie se focalise sur les organismes représentatifs des niveaux trophiques inférieurs, les producteurs et consommateurs primaires, et compare les effets des trois types de NP de CeO_2 précédemment décrits. Nous étudierons dans cette partie l'effet des NP sur la décomposition de la litière, afin de déterminer si un indicateur du fonctionnement des écosystèmes dulçaquicoles peut être employé comme biomarqueur de perturbation, associé à la présence de NP dans notre dispositif expérimental. La toxicité des NP sur les organismes associés à la litière (communautés bactériennes et mycéliennes, larves de chironomes) sera également prise en compte.

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de préparation. Les principaux résultats sont présentés dans le résumé ci-dessous.

RESUME :

Cette étude vise à évaluer les effets de trois types de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2 NP) sur la décomposition de la litière par les micro-organismes et les macro-invertébrés aquatiques. Pour cela, des feuilles d'aulne ont été mises à incuber en microcosme d'eau douce d'une capacité de 56L, en présence de larves de *Chironomus riparius* et d'un consortium microbien, composé de communautés bactériennes et d'hyphomycètes. Les CeO_2 NP ont été injectées dans la colonne d'eau de manière régulière sur une période de quatre semaines, pour atteindre la concentration finale de 1 mg/L. Les caractéristiques des CeO_2 NP étudiées sont les suivantes : petites (2 – 5 nm), sphériques et enrobées de citrate (NP1) ; petites (2 – 5 nm), sphériques et non enrobées (NP2) ; plus grosses (20 – 60 nm), en plaquettes et non enrobées (NP3). Les paramètres de toxicité étudiés sur les micro-organismes sont la diversité des communautés bactériennes (par DGGE) et la biomasse mycélienne (par détermination du taux d'ergostérol). La toxicité sur les chironomes a été déterminée par évaluation de la croissance et du développement des larves, ainsi que par l'induction de malformations des pièces buccales (paramètre de tératogénicité). La décomposition de la litière a été évaluée suivant deux méthodes : par détermination de la perte de masse organique (Ash-Free Dry Mass, AFDM) et par détermination de la surface foliaire restante.

Les deux méthodes se sont révélées sensibles et pertinentes pour l'étude de la décomposition de la litière. La contribution relative des micro-organismes et des larves de chironome dans la décomposition de la litière a également été étudiée. Il s'est avéré que dans nos conditions, la décomposition des feuilles est principalement due aux chironomes. L'étude de la diversité des communautés microbiennes révèle des modifications dans les communautés en présence de NP2 et NP3, à partir de la troisième semaine de contamination. Aucun effet des CeO_2 NP n'a été observé sur la biomasse mycélienne. En revanche, une diminution significative de décomposition des feuilles a été observée en présence de NP2, uniquement. Une induction significative de malformation des pièces buccales chez les chironomes a également été observée en présence de NP2 uniquement. A l'inverse, un taux de malformation significativement plus faible que dans la condition témoin a été observé en présence de NP1. Aucun effet des CeO_2 NP n'a été observé sur la croissance ou le développement des larves. L'ensemble de ces résultats suggère que les NP2 pourraient impacter le comportement de nourrissage des chironomes, et par conséquent impacter la décomposition de la litière par ces organismes. La décomposition de la litière et l'induction de malformations des pièces buccales chez les larves de chironomes se sont révélé être deux bioindicateurs sensibles de l'impact des CeO_2 NP sur le fonctionnement d'un écosystème aquatique d'eau douce.

Impacts of CeO_2 nanoparticles on the functioning of a freshwater ecosystem: effects on leaf litter decomposition by associated micro- and macro-organisms

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) represent a new category of manufactured materials. Their unique intrinsic properties promise technological revolutions in many fields of application in the coming years, including medical purposes (Huang *et al.*, 2011), energy storage systems (Rao and Cheetham, 2001) and many consumer products (Boxall *et al.*, 2007; The Royal Society, 2004). Among them, cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) are largely used as fuel additives or wood coatings due to their catalytic properties. Produced in large amounts (100 – 1000 tons/year) in Europe (Piccinno *et al.*, 2012), their growing production and use are expected to result in environmental release (Gottschalk and Nowack, 2011; Mueller and Nowack, 2008), making it crucial to determine their potential toxicity. Once released, CeO_2 NPs are expected to be mainly found in aquatic environments, which represent the final sink for most contaminants. Furthermore, they tend to aggregate and sediment quickly in the water column (Keller *et al.*, 2010; Quik *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), predominantly exposing benthic organisms. Disturbance in benthic systems could impact whole systems, while many benthic species, as micro-organisms or macro-invertebrates, are at the basis of trophic webs or play a major role in litter decomposition and organic matter release.

However, very few ecotoxicological studies on CeO_2 NPs have been conducted on benthic species so far (Bour *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2009), and are non-existent concerning CeO_2 NPs impacts on ecosystem functioning. On the last point, leaf litter decomposition has been shown to be a valuable tool for the evaluation of ecosystems functioning and freshwater ecosystems' health assessment (Pascoal *et al.*, 2003, 2001). Leaf litter decomposition is indeed a vital process in freshwater ecosystems (Campos *et al.*, 2014), involving micro-organisms and macro-invertebrates (Graça *et al.*, 2001; Jabiol *et al.*, 2013; Taylor and Chauvet, 2014). Several studies have shown an alteration of leaf litter decomposition in heavy metal contaminated aquatic systems, as a side effect of metal toxicity on microbial communities and shredder/collector macro invertebrates (Campos *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2008a). Despite the relevance of this parameter, litter decomposition has been studied only once as a marker of NP impacts on freshwater ecosystems: Pradhan *et al.* (2011) found that CuO and Ag NPs induced a significant decrease in leaf litter decomposition. NPs have also been shown to impact soil and aquatic microbial communities, reducing their abundance, diversity and/or activity (Battin *et al.*, 2009; Dinesh *et al.*, 2012). Mostly known as collector-gatherers organisms, larvae of the midge *Chironomus riparius* have been shown to feed on alder leaves in the absence of shredders, and play a role on litter decomposition (Callisto *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2014). Moreover, they have also been shown to be sensitive to CeO_2 (Lee *et al.*, 2009) and Ag (Nair *et al.*, 2013) NPs and heavy metals (Pascoe *et al.*,

1989; Péry *et al.*, 2008; Wentsel *et al.*, 1977).

The present study, conducted in freshwater microcosms, aimed at investigating the effects of chronic and repeated pulses of three types of manufactured CeO_2 NPs on leaf litter decomposition and the associated decomposer organisms: microbial communities and *C. riparius* larvae. The use of microcosms allows mimicking environmental conditions where interactions between different species occur and may modulate contaminant toxicity. Furthermore, these systems also present the advantage of allowing an important control on present species and abiotic parameter. These microcosms also comprised larvae of the amphibian species *Pleurodeles waltl.* that are predators of chironomids and allow the study of a complex, environmentally more relevant system. However, no toxicity assessment was carried out on this species in the present study, where focus was made on organisms at lower trophic levels. The studied endpoints were leaf mass loss, bacterial community diversity, fungal biomass and chironomid development and teratogenicity. The relative contribution of micro-organisms and macro-invertebrates in litter decomposition was also evaluated, using different approaches based on organic matter loss weighing or surface analysis.

2. Materials and Methods

2.1 Nanoparticles

Three types CeO_2 NPs were tested: small (2 – 5 nm) spherical NPs coated with a tri-ammonium citrate layer; small (2 – 5 nm), non-coated spherical NPs; and larger (20 – 60 nm) non-coated plates. These different types of CeO_2 NPs are further referred to as NP1, NP2 and NP3 respectively.

Transmission Electron Microscopy (TEM, Jeol Jem 2100, 200Kv, HR) observations were performed on stock suspensions to determine NP primary size and shape (figure 1).

Fresh NP suspensions were prepared before each contamination. Stock suspensions were homogenized in ultrasonic bath (Bioblock, typ 570 HF Freq 35 KHz) for ten minutes and sampled to prepare fresh suspensions (93.4 mg/L) in ultrapure water. Fresh suspensions were then homogenized in ultrasonic bath for ten minutes before contamination.

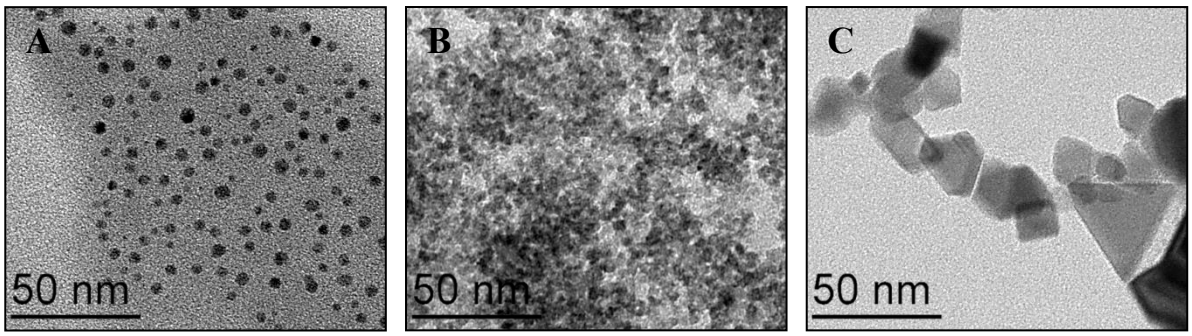


Figure 1: TEM observations of (A) NP1, (B) NP2 and (C) NP3.
NP1 are small (2 – 5 nm), spherical, citrate-coated CeO_2 NPs.
NP2 are small (2 – 5 nm), spherical, non-coated CeO_2 NPs.
NP3 are large (20 – 60 nm), non-coated CeO_2 NP plates.

2.2 Organisms and leaf litter

Diatoms (*Nitzschia palea* and *Navicula pelliculosa*), chironomid (*Chironomus riparius*) and amphibian (*Pleurodeles waltl.*) larvae are grown at EcoLab laboratory. Diatoms are cultured in CHU 10 medium with Fe EDTA as iron source (6.4 < pH < 6.6). Amphibian larvae are obtained and grown as described in Mouchet *et al.* (2011, 2007). Chironomid larvae are obtained and grown following standardized procedures (AFNOR, 2004). A microbial consortium was isolated from water filters of the freshwater Museum-Aquarium of Nancy (France). Micro-organisms were centrifuged and suspended in 50% glycerol (2.7x1010 bacteria/mL), then conserved at -80°C. The consortium was allowed to develop in mineral water (Volvic®) for 72h prior to inoculation in microcosms.

Alder leaves were collected from trees at abscission, in an uncontaminated site, and oven dried for 72h at 30°C. Before experiment, batches of 3.2g (dry mass) were placed in deionized water to prevent breakage during handling, and sterilized to limit the introduction of non-intended microbial species in the microcosms. The selected weight corresponds to a leaf surface covering about a third of the microcosms' surface.

2.3 Microcosm experiment set up

This experiment was performed using 9 indoor microcosms (glass tanks ; 75 x 20 x 60 cm, L x W x H), as described in Auffan *et al.* (2014) and Tella *et al.* (2014). Each microcosm contained 6.5L of reconstituted sediment (79% silica sand, 10% kaolin, 1% calcium carbonate) and 56L of Volvic® mineral water (11.5 mg/L Ca, 8 mg/L Mg, 11.6 mg/L Na, 6.2 mg/L K, 13.5 mg/L Cl, 31.7 mg/L Si, 71 mg/L HCO_3), and was equipped with a water recirculating system connected to a pump (Eheim universal, 600L/h). Natural light was provided by T8 tubes (18W, 5500K, Vivalite®) under 16:8 light-dark cycles and temperature was maintained at 21 ± 1 °C. Temperature, conductivity, pH, redox potential, and dissolved oxygen were monitored continuously (Ponsel Odeon open X probes kit). Experimental conditions were realized in three replicates, with random assignation of microcosms.

Experiment implementation: Alder leaves (*Alnus glutinosa*, 3.2 g, dry mass); diatoms (2.10^2 and 2.10^4 cells/ml, for *N. palea* and *N. pelliculosa,* respectively) and microbial consortium were first introduced. Biofilm was allowed to develop for two weeks before NP contamination. Contamination consisted in chronic addition of NPs: 12 additions of fresh NP suspension (50 ml of 93.4 mg/L) were realized over four weeks to get to the final concentration of 1 mg/L. Deionized water was added in control microcosms instead of NP suspension. After one week of contamination, 700 chironomid larvae aged of 72h were added to each microcosm. One week later (T2), 17 *P. waltl.* larvae at stage 53 of the development table of Gallien and Durocher (1957) were added to each microcosm. The experiment ended 12 days later: Amphibian larvae were withdrawn and alder leaves were collected with microcosm water. Sediment was then sieved to collect remaining chironomid larvae, which were stored in 70% ethanol. The overall implementation is presented in figure 2.

A second experiment was carried out in the same exposure systems to study the relative contribution of microbial species and invertebrates on litter decomposition. Two conditions were experimented: the "control condition" where all the species cited above (microbial communities, chironomid larvae and amphibian larvae)

were present; and a "macro-invertebrates-free condition", where chironomid larvae were not introduced in the microcosms. The kinetic of organism introduction / biofilm development was the same as described above, for the first experiment.

2.4 Leaf decomposition assessment

Two methods were used to assess leaf litter decomposition. The first one was identical to the method described in Cornut *et al.* (2012). After collection, leaves were gently rinsed individually with water from their respective microcosm to remove sediment. Sets of five discs (12 mm diameter) were cut from leaves of each microcosm, avoiding the central vein, and promptly frozen at -20°C until processing for ergosterol extraction. The remaining leaf litter was dried at 105°C to constant mass and weighed to the nearest 0.01 g. Leaf material was then ground and portions of leaf material of about 500 mg were ashed (4h at 550°C) and weighed to determine the organic matter content. The leaf mass remaining was expressed as the ratio of the ash-free dry mass (AFDM) between the final and initial leaf litter. Four unexposed batches of leaf litter were used to determine the initial AFDM according to the procedures above.

The second method, used in the second microcosm experiment only, is based on image analysis. At the end of the experiment, leaves were collected and gently rinsed individually to remove sediment. Once clean, leaves were spread on white paper under water, and gently removed from the water with their paper support. This technique allows keeping the leaves well-spread and prevents analysis bias from folded leaves. Leaves and their paper support were then placed between newsprint layers and oven-dried for ten days at 30°C. Sheets were then scanned (600 dpi, black & white; Toshiba e-Studio 456) and pictures analyzed with ImageJ® software. Counted pixels are representative of remaining leaf material. In a second step, leaves were separated from their paper support and processed as described above (leaf discs not cut) in order to compare the two techniques, namely AFDM contents and surface analysis.

2.5 Fungal biomass and bacterial diversity assessment

Mycelial biomass in leaves was assessed through ergosterol contents, as described in Cornut *et al.* (2012). Leaf material was lyophilized and weighed to the nearest 0.1 mg, then lipids were extracted with alkaline methanol heated at 80°C for 30 min. Extracts were purified using solid-phase extraction cartridges (Oasis HLB, 60 mg, 3 cc, Waters, Milford, MA, USA) and ergosterol was quantified by high-performance liquid chromatography. The ergosterol amount was corrected for the extraction efficiency (87-100%), measured for each sample series on controls to which known amounts of ergosterol were added. Ergosterol amount was converted into fungal biomass using a conversion factor of 5.5 mg ergosterol g^{-1} of fungal dry mass (Gessner and Chauvet, 1993).

Bacterial diversity in the water column was assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis as described in Clivot *et al*. (2012). Pelagic micro-organisms were sampled every week by water filtration (total volume of 100 ml, filtered at 0.45 µm). Detailed information on DNA extraction and DGGE analysis procedures are provided in supplementary material.

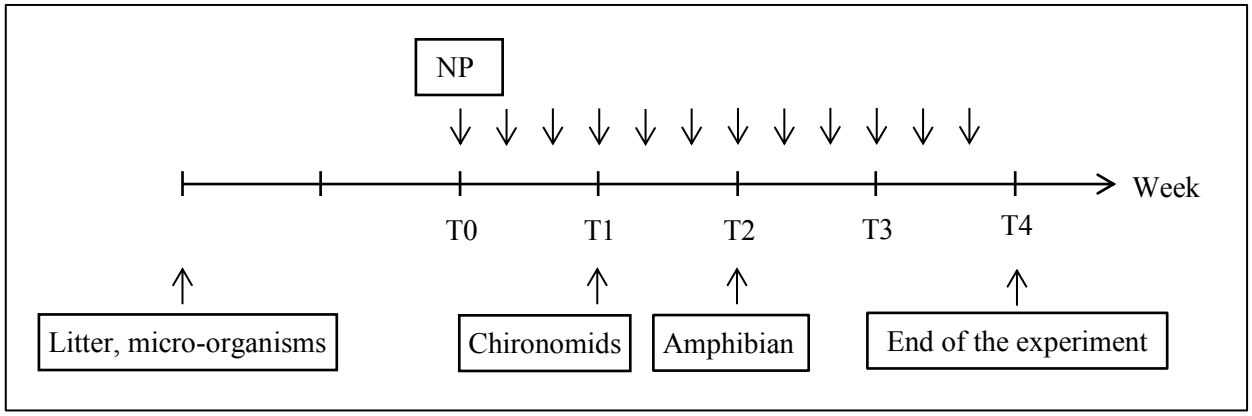


Figure 2: Schematic representation of microcosm experiment implementation.

2.6 Toxicity on C. riparius

Larval growth was determined by measuring body length (ImageJ® software). Cephalic capsules of each larvae were also measured in order to determine larval instars (Environnement Canada, 1997) and assess potential delays in development. Teratogenicity was evaluated on cephalic capsules as mouth part deformities, as described by Dias *et al.* (2008). Briefly, cephalic capsules were placed in 15% potassium hydroxide (Sigma, France) and heated 12 minutes at 95°C, then placed in 70% ethanol overnight to stop the reaction. Capsules were then mounted with Eukitt® mounting medium (03989, Fluka, France) and observed under microscope (Olympus CX41). Mouth part deformities were assessed and rated according to Warwick and Tisdale (1988) and Vermeulen *et al.* (1998) works. Treatment groups were compared based on deformities incidence (individual or total deformities) and seriousness. The latter is evaluated by ratings, based on mouthparts surface impacted. Briefly, each tooth is virtually divided into four areas and the number of areas covered by a deformity is used as the tooth rate.

2.7 Data analyses

AFDM contents and fungal biomass were tested for significance between groups using a one way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test to analyze differences between groups. Differences between pixel counts from leaves pictures were analyzed using a t-test. Chironomid larvae body size and mouthpart deformities ratings were tested for significance between groups using a Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks, followed by Dunn's test to analyze differences between groups. Incidence of mouthpart deformities was tested for significance using a chi-square test. All the statistical analyses were performed with SigmaPlot 12.0 software.

3. Results

3.1 Physico-chemical parameters analysis

No significant differences in system physico-chemical parameters were observed between conditions. Temperature was maintained at 21 ± 1°C. Conductivity ranged between 207 and 227 $\mu S.cm^{-1}$ (mean values), at the beginning and at the end of the experiment respectively. Mean pH was

8.5, with a slight increase at the beginning of the experiment (8.8) and a slight decrease (7.8) during the second week of NP contamination.

3.2 CeO_2 NP impacts on leaf litter decomposition and organisms

After six weeks of incubation in the microcosms, decomposition rates of alder leaves were rather high, with AFDM mean values below 15% at the end of the experiment (figure 3). A significant decrease ($p < 0.05$) in litter decomposition was observed in microcosms contaminated with NP2, compared to control. NP1 and NP3 conditions were not significantly different from control condition.

Ergosterol contents measurement showed that fungal biomass on alder leaves was important in every condition at the end of the experiment. No significant differences were observed between conditions (figure 4), with mean values of 28.7 ± 8.0, 21.4 ± 5.3, 28.6 ± 4.6 and 44.2 ± 12.8 mg (± SE) of fungal biomass per g of leaf dry mass (control, NP1, NP2 and NP3, respectively).

DGGE analysis revealed that bacterial communities were impacted by NP2 and NP3, with marked changes at the end of the experiment. While no differences were observed between groups from T0 to T2, three groups (control, NP2 and NP3) were discriminated at T3 and T4 (*i.e.* beginning of the last week of NP contamination and final point, at the end of the experiment, see figure 2), highlighting differences in microbial communities from the different conditions (data not shown). No changes in community diversity were observed with NP1, compared to control group.

Similar number of chironomid larvae was found in the different conditions at the end of the experiment, with mean values of 70, 76, 67 and 103 larvae (for control, NP1, NP2 and NP3 conditions, respectively), over 700 initially introduced. No effects were observed on growth and development. Larvae mean body sizes at the end of the experiment were 1.16 ± 0.02, 1.14 ± 0.02, 1.16 ± 0.01 and 1.14 ± 0.02 cm (± SE) for control, NP1, NP2 and NP3 conditions, respectively. Measurement of cephalic capsules showed that with rare exceptions (2-3 larvae per condition), all the larvae had reached the fourth developmental instar in every condition, indicating no delay in development. The study of mouthpart deformities revealed more pronounced impacts of NPs (table 1). The teratogenicity observed in presence of NP1 is significantly lower ($p < 0.05$) than in control condition: both incidence and seriousness of deformities were lower in NP1 condition, compared to control. When considering all the assessed deformities as a whole, NP2 and NP3 conditions were not significantly different from control, neither for incidence nor seriousness of deformities. However, a significantly higher ($p < 0.05$) number of larvae lacking one tooth or more (figure 5) was observed in the NP2 condition, compared to the other groups. No similar phenomenon has been highlighted for other deformity individually studied.

3.3 Relative contribution of micro-organisms and invertebrates on leaf litter decomposition

The second experiment, conducted in presence or absence of chironomid larvae, revealed a patent decrease in litter decomposition in absence of chironomids. The significant difference in litter decomposition between groups was obtained with the two methods tested. At the end of the experiment, after six weeks of incubation, alder leaves incubated in presence of chironomid larvae were

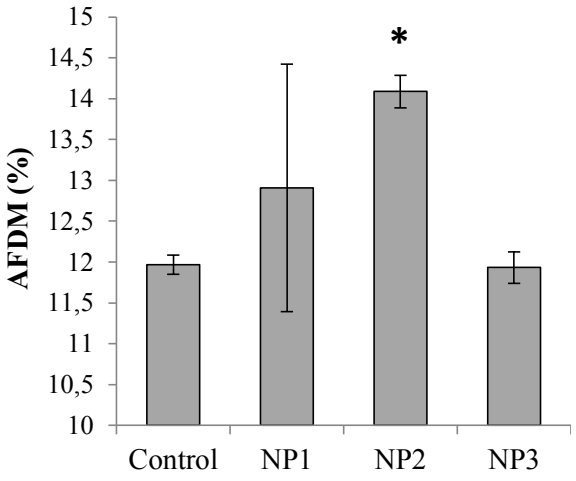


Figure 3: Remaining organic matter from leaf litter incubated in microcosms exposed to CeO_2 NPs (mean values ± standard error).
*: Statistically different from control ($p < 0.05$).

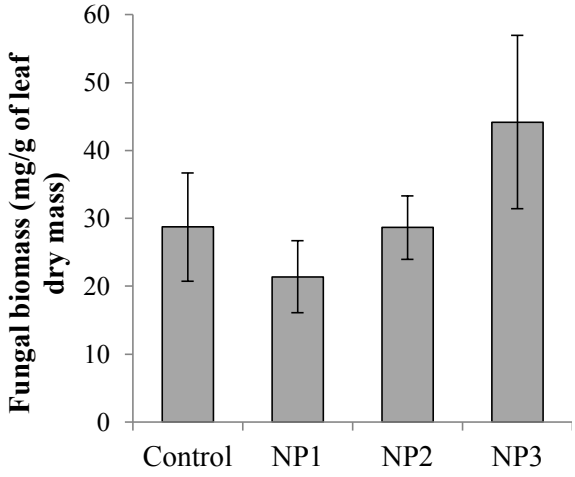


Figure 4: Fungal biomass on alder leaves incubated in microcosms exposed to CeO_2 NPs (mean values ± standard error).

importantly eaten and only hard parts of the leaves (*i.e.* veins) mostly remained. On the contrary, leaves incubated without chironomid larvae were found intact at the end of the experiment (figure 6). Surface analysis indicated a significant ($p < 0.05$) difference between the two groups. Similarly, the assessment of remaining organic matter from the leaves showed that AFDM was significantly lower ($p < 0.01$) in presence of chironomids (figure 7), indicating a greater decomposition rate. AFDM mean values were 8.9 and 13.4 % for groups in presence and absence of larvae, respectively.

4. Discussion

The present study shows that CeO_2 NPs may impact freshwater ecosystems at low concentrations (1 mg/L), with different responses observed depending on the organisms and the type of CeO_2 NP. Fungal biomass on decomposing alder leaves was not impacted after four weeks of NP contamination, for any type of CeO_2 NP. Similarly, Duarte *et al.* (2008a) showed that exposure to low concentrations of Zn and Cu did not impact fungal biomass in streams, while a decrease in fungal reproduction was induced. In our study, no fungal reproduction (assessed at the end of the experiment as hyphomycetes sporulation on decomposing leaves; data not shown) was observed in any conditions, including control, despite the important fungal biomass present on the leaves. The important leaf litter decomposition rates can explain this observation, as a shortage of substrate could impair hyphomycetes reproduction. Pradhan *et al.* (2014) observed an inhibition of fungal biomass production in streams exposed to CuO NPs. However, the very high concentrations studied (5 – 200 mg/L) could explain the greater sensitivity of fungi to NPs in their study. Contrary to fungal communities, bacterial communities were impacted by CeO_2 NPs, but only in presence of NP2 and NP3, and from the third week of contamination. Two hypotheses could explain this delay in bacterial response: the CeO_2 NPs tested could impact bacterial communities only over a long period of time, and/or NP concentrations were not high enough on the

Table 1: Teratogenesis on *C. riparius* larvae exposed to CeO_2 NPs in microcosm.

	Deformity incidence (%)	Deformity ratings[1]	Incidence of "missing tooth/teeth" deformity (%)
Control	28,1	0,64 ±1,24	7,8
NP1	21,1*	0,32 ±0,44 *	8,5
NP2	41,0	1,43 ±1,93	23,0 *
NP3	34,1	1,24 ±2,08	20,6

[1] Mean value ± standard deviation

* Statistically different from control ($p < 0.05$)

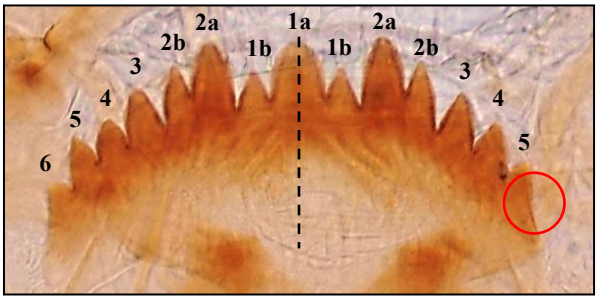


Figure 5: Microscopic observation of *C. riparius* larvae mouthparts (x400). The dashed line represents the horizontal symmetry axis and the red circle indicates the absence of a lateral tooth.

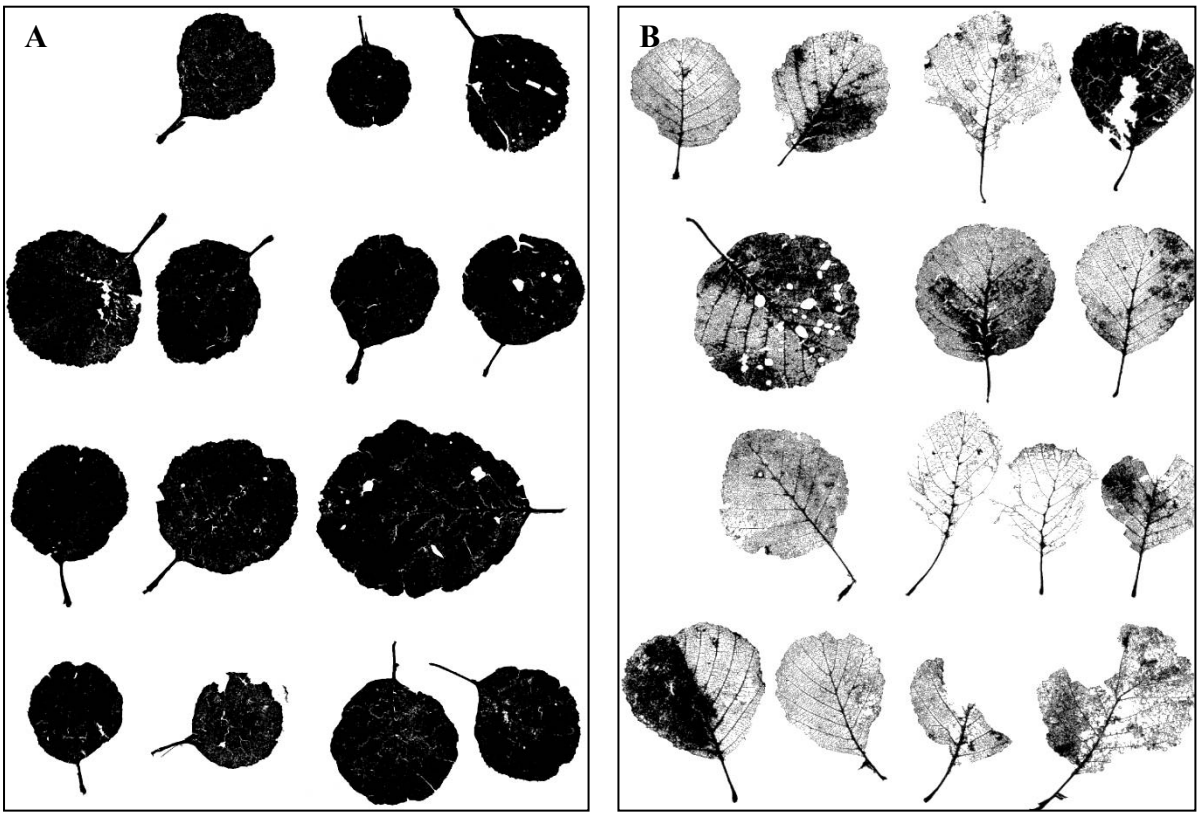


Figure 6: Alder leaves collected after six weeks of incubation in microcosm, in absence (A) or presence (B) of chironomid larvae.

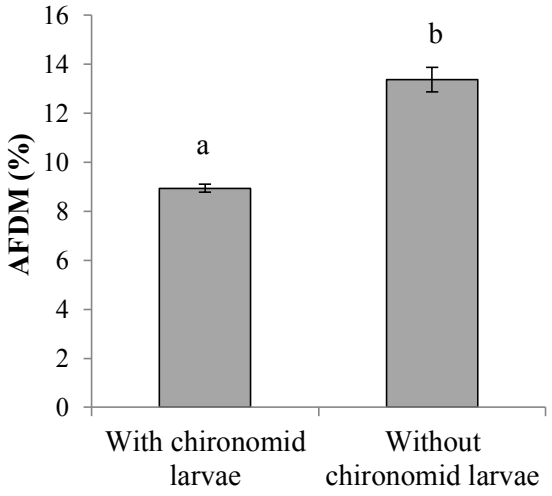


Figure 7: Remaining organic matter from leaf litter in presence or absence of chironomid larvae (mean values ± standard error). Letters (a,b) indicate statistically different groups ($p < 0.01$).

first weeks of contamination to impact bacteria. Indeed, the repeated addition of NPs in the microcosms results in an increase in NP concentration over the weeks, to get to the final nominal concentration of 1 mg/L. Similarly to our results, previous studies have shown metal NP toxicity to freshwater (Dasari and Hwang, 2013; Pradhan *et al.*, 2011), marine (Doiron *et al.*, 2012) and soil (Dinesh *et al.*, 2012) bacterial communities. The absence of effects in our study in presence of NP1 could be explained by the citrate coating of these NPs. Indeed, citrate coatings have been shown to reduce the toxicity of CeO_2 NPs on plants (Trujillo-Reyes *et al.*, 2013) and of Ag NPs on *Caenorhabditis elegans* (Yang *et al.*, 2012). Finally, bacterial communities appeared to be more sensitive than fungal communities, which is in accordance with previous studies (Duarte *et al.*, 2009, 2008a, 2008b; Pradhan *et al.*, 2011).

The small number of chironomid larvae remaining at the end of the experiment (~70 – 100 over 700) is explained by the predation from the amphibian larvae (Bour *et al.*, n.d.). Indeed, a previous study showed that CeO_2 NP exposure did not result in mortality on *C. riparius*, at concentrations ranging from 0.01 to 100 mg/L (Bour *et al.*, 2015). Similarly to this study, no growth inhibition was observed on the larvae exposed in microcosms, whatever the type of CeO_2 NP tested. However, differences in teratogenicity were observed between conditions in microcosms, contrary to the observations made after single-species exposure, carried out for 7 days (Bour *et al.*, 2015). In the present study, the first observation is a decrease in teratogenicity in presence of NP1, compared to control group. The teratogenicity observed in control group represents a normal background, naturally occurring in Chironomidae. Thus, MacDonald and Taylor (2006) found a 5% background of deformities in chironomid larvae from natural streams and lakes, with no taxon found without deformities and 7 taxa over 19 with more than 10% of deformities. Furthermore, laboratory breeding increases the natural background of teratogenicity (Dias *et al.*, 2008; Vermeulen *et al.*, 1998). The significantly decreased teratogenicity observed with NP1 suggests that this type of NP could have a protective action on *C. riparius* larvae. This protective effect could result from the citrate coating of these NPs: citrate indeed plays a major role in the metabolism of many organisms, because of its implication in Krebs cycle for the production of energetic compounds. Contrarily to NP1, teratogenic effects were more important in presence of NP2, compared to control group, with a significantly higher number of missing teeth. The induction of mouthpart deformities has previously been shown on chironomid larvae exposed to uranium (Dias *et al.*, 2008), organic compounds (Meregalli *et al.*, 2001) and heavy metals (Dickman and Rygiel,

1996; Di Veroli *et al.*, 2014, 2012; MacDonald and Taylor, 2006), but as far as we know, this is the first time teratogenic effects were observed on chironomids exposed to NPs.

A significant decrease in alder leaves decomposition was observed in microcosms exposed to NP2. Similar results were observed in freshwater ecosystems with CuO and Ag NPs (Pradhan *et al.*, 2011) and heavy metals (Campos *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2008a; Fernandes *et al.*, 2009; Roussel *et al.*, 2008). Temperature has also been shown to significantly impact leaf litter decomposition (Graça *et al.*, 2001; Taylor and Chauvet, 2014). In the present study, the use of microcosms allows maintaining a constant temperature, and the continuous monitoring of physico-chemical parameters in the microcosms indicated comparable values between conditions. Thus, these factors are not likely to be the source of the differences observed for litter decomposition. Many studies have shown that microbial communities are involved in litter decomposition and that contaminant toxicity on these communities could result in decreased litter decomposition rates (Campos *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2008a; Fernandes *et al.*, 2009; Pradhan *et al.*, 2011; Roussel *et al.*, 2008). In the present study, the observed shift in bacterial communities in presence of NP2 could partly explain the effects on litter decomposition. However, a shift in bacterial communities was also observed in presence of NP3, but litter decomposition was not altered in this condition, compared to control. Furthermore, several studies reported that leaf litter decomposition is mainly due to fungal community activity, rather than bacterial community (Campos *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2008a; Pascoal and Cássio, 2004; Pradhan *et al.*, 2014). The absence of changes in fungal biomass therefore suggests that the decrease in litter decomposition is not likely to be mainly due to micro-organisms in our exposure conditions. Several authors reported that macro-invertebrates, especially shredders, also play a major role in leaf litter decomposition (Graça, 2001; Graça *et al.*, 2001; Jabiol *et al.*, 2013; Pradhan *et al.*, 2012; Roussel *et al.*, 2008; Taylor and Chauvet, 2014). They feed on leaf litter and convert particulate organic matter (OM) to fine particulate OM that can be used by collector species. Chironomid larvae are collector-grazers, and preferentially feed on fine particulate OM or graze biofilms at the surface of sediments. However, they can also decompose and directly feed on leaf litter, especially in absence of shredders (Callisto *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2014). Contaminant-induced inhibition of chironomid feeding behavior, previously reported with heavy metal by Heinis *et al.* (1990), could then result in decreased litter decomposition rates. To determine the relative contribution of micro-organisms and invertebrates on leaf litter decomposition, the second experiment of the present study was carried out in presence or absence of chironomid larvae. The patent decrease in litter decomposition observed in absence of chironomids indicates that these organisms are mainly responsible for leaf litter decomposition in our experimental conditions. It thus could be hypothesized that chironomids mouthparts deformities, only observed with NP2, are related to the decrease in litter decomposition, also observed with NP2 only. For instance, tooth loss in chironomid larvae could alter their feeding activity on leaf litter activity. However, the significantly lower teratogenicity observed with NP1 should then result in higher decomposition rate,

which was not observed with NP1. Moreover, no statistical correlation could be established between mouthparts deformities in chironomids and litter decomposition rates. Despite the absence of a direct link between teratogenesis on chironomids and leaf litter decomposition, the results observed with NP2 indicate that these two bioindicators are congruent concerning the effects of CeO_2 NPs. Similarly, MacDonald and Taylor (2006) reported in a previous study that leaf litter decomposition was congruent with mouthparts deformities in chironomids, in freshwater ecosystems exposed to municipal sewage effluent.

Many studies have reported leaf litter decomposition as a sensitive marker of natural streams contamination (Duarte *et al.*, 2008a; Fernandes *et al.*, 2009; MacDonald and Taylor, 2006; Medeiros *et al.*, 2010; Pascoal *et al.*, 2003; Pascoal and Cássio, 2004; Pradhan *et al.*, 2011; Roussel *et al.*, 2008). Similarly, the induction of mouthparts deformities in chironomid larvae has proven to be a sensitive bioindicator of contamination in natural freshwater ecosystems (Al-Shami *et al.*, 2010; Di Veroli *et al.*, 2014, 2012; MacDonald and Taylor, 2006). The present study evidences that these markers can be used as valuable tools in microcosm experiments, especially for the assessment of NP ecotoxicity. Furthermore, they appeared to be more sensitive than other markers, as chironomids growth inhibition. Indeed, although feeding behavior and larvae growth are closely related, no effects were found on larvae growth while impacts were observed on their feeding behavior, reflected by leaf litter decomposition in our conditions, as discussed above. While the use of AFDM method to assess leaf litter decomposition is now widespread (Cornut *et al.*, 2012; Gessner and Chauvet, 1994; Medeiros *et al.*, 2010; Pascoal and Cássio, 2004; Taylor and Chauvet, 2014), leaf surface analysis is not commonly used. The present study shows the feasibility and sensitivity of this technique: while no differences were observed between conditions by weighing the total litter dry mass at the end of the second experiment (data not shown), leaf surface analysis allowed statistical discrimination between groups.

5. Conclusion

The three types of CeO_2 NPs were shown to have different effects on the reconstituted freshwater system presently studied. A decrease in teratogenicity in chironomid larvae was observed with citrate-coated NPs (NP1), suggesting a protective effect. On the contrary, exposure to non-coated, spherical NPs (NP2) led to an increase in mouthpart deformities in chironomids (missing tooth only), changes in bacterial community diversity and a decrease in leaf litter decomposition. Finally, large, non-coated plates (NP3) also induced changes in bacterial community diversity.

This study shows that leaf litter decomposition and mouthpart deformities in chironomids are sensitive, congruent markers in the present experimental conditions. It also highlights the advantages of using microcosms for NP ecotoxicity assessment. Indeed, these devices allow studying complex biological systems while controlling a number of biotic and abiotic parameters. Thus, the simultaneous use of microcosms and sensitive markers of toxicity should be more widely used in the field of nanoecotoxicology.

References

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Al-Shami, S., Rawi, C.S.M., Nor, S.A.M., Ahmad, A.H., Ali, A., 2010. Morphological deformities in Chironomus spp. (Diptera: Chironomidae) larvae as a tool for impact assessment of anthropogenic and environmental stresses on three rivers in the Juru river system, Penang, Malaysia. Environ. Entomol. 39, 210–222. doi:10.1603/EN09109

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

Battin, T.J., Kammer, F. v. d., Weilhartner, A., Ottofuelling, S., Hofmann, T., 2009. Nanostructured TiO2: Transport Behavior and Effects on Aquatic Microbial Communities under Environmental Conditions. Environ. Sci. Technol. 43, 8098–8104. doi:10.1021/es9017046

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Tella, M., Auffan, M., Gauthier, L., Pinelli, E., n.d. Toxicity of CeO2 nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: an insight in the involved mechanisms through the use of microcosms. Submitt. Nanotoxicology.

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

Boxall, A., Chaudhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B., Watts, C., 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Cent. Sci. Lab. Dep. Environ. Rural Aff. Lond. OK.

Callisto, M., Jr, G., F, J., Graça, M.A.S., 2007. Leaf litter as a possible food source for chironomids (Diptera) in Brazilian and Portuguese headwater streams. Rev. Bras. Zool. 24, 442–448. doi:10.1590/S0101-81752007000200023

Campos, D., Alves, A., Lemos, M.F.L., Correia, A., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., 2014. Effects of cadmium and resource quality on freshwater detritus processing chains: a microcosm approach with two insect species. Ecotoxicol. Lond. Engl. 23, 830–839. doi:10.1007/s10646-014-1223-9

Clivot, H., Pagnout, C., Aran, D., Devin, S., Bauda, P., Poupin, P., Guérold, F., 2012. Changes in soil bacterial communities following liming of acidified forests. Appl. Soil Ecol. 59, 116–123. doi:10.1016/j.apsoil.2011.09.010

Cornut, J., Clivot, H., Chauvet, E., Elger, A., Pagnout, C., Guérold, F., 2012. Effect of acidification on leaf litter decomposition in benthic and hyporheic zones of woodland streams.

Water Res. 46, 6430–6444. doi:10.1016/j.watres.2012.09.023

Dasari, T.P., Hwang, H.-M., 2013. Effect of humic acids and sunlight on the cytotoxicity of engineered zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles to a river bacterial assemblage. J. Environ. Sci. 25, 1925–1935. doi:10.1016/S1001-0742(12)60271-X

Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.-M., 2008. Exposure of Chironomus riparius larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. Chemosphere 71, 574–581. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.029

Dickman, M., Rygiel, G., 1996. Chironomid larval deformity frequencies, mortality, and diversity in heavy-metal contaminated sediments of a Canadian riverine wetland. Environ. Int. 22, 693–703. doi:10.1016/S0160-4120(96)00060-8

Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., Hamza, S., 2012. Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. Geoderma 173–174, 19–27. doi:10.1016/j.geoderma.2011.12.018

Di Veroli, A., Goretti, E., Paumen, M.L., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2012. Induction of mouthpart deformities in chironomid larvae exposed to contaminated sediments. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 166, 212–217. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.029

Di Veroli, A., Santoro, F., Pallottini, M., Selvaggi, R., Scardazza, F., Cappelletti, D., Goretti, E., 2014. Deformities of chironomid larvae and heavy metal pollution: from laboratory to field studies. Chemosphere 112, 9–17. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.03.053

Doiron, K., Pelletier, E., Lemarchand, K., 2012. Impact of polymer-coated silver nanoparticles on marine microbial communities: a microcosm study. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 124-125, 22–27. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.004

Duarte, S., Pascoal, C., Alves, A., Correia, A., Cássio, F., 2008a. Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. Freshw. Biol. 53, 91–101. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01869.x

Duarte, S., Pascoal, C., Cássio, F., 2008b. High diversity of fungi may mitigate the impact of pollution on plant litter decomposition in streams. Microb. Ecol. 56, 688–695. doi:10.1007/s00248-008-9388-5

Duarte, S., Pascoal, C., Cássio, F., 2009. Functional stability of stream-dwelling microbial decomposers exposed to copper and zinc stress. Freshw. Biol. 54, 1683–1691. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02217.x

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

Fernandes, I., Duarte, S., Cássio, F., Pascoal, C., 2009. Mixtures of zinc and phosphate affect leaf litter decomposition by aquatic fungi in streams. Sci. Total Environ. 407, 4283–4288. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.007

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez

Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

Gessner, M.O., Chauvet, E., 1993. Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 59, 502–507.

Gessner, M.O., Chauvet, E., 1994. Importance of Stream Microfungi in Controlling Breakdown Rates of Leaf Litter. Ecology 75, 1807–1817. doi:10.2307/1939639

Graça, M.A.S., 2001. The Role of Invertebrates on Leaf Litter Decomposition in Streams – a Review. Int. Rev. Hydrobiol. 86, 383–393. doi:10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D

Graça, M.A.S., Ferreira, R. C. F., Coimbra, C.N., 2001. Litter processing along a stream gradient: the role of invertebrates and decomposers. J. North Am. Benthol. Soc. 20, 408–420. doi:10.2307/1468038

Heinis, F., Timmermans, K.R., Swain, W.R., 1990. Short-term sublethal effects of cadmium on the filter feeding chironomid larva Glyptotendipes pallens (Meigen) (Diptera). Aquat. Toxicol. 16, 73–85. doi:10.1016/0166-445X(90)90078-4

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 155, 344–357. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004

Jabiol, J., McKie, B.G., Bruder, A., Bernadet, C., Gessner, M.O., Chauvet, E., 2013. Trophic complexity enhances ecosystem functioning in an aquatic detritus-based model system. J. Anim. Ecol. 82, 1042–1051. doi:10.1111/1365-2656.12079

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967. doi:10.1021/es902987d

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 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. Environ. Toxicol. Pharmacol. 28, 86–91. doi:10.1016/j.etap.2009.03.001

MacDonald, E.E., Taylor, B.R., 2006. Incidence of Mentum Deformities in Midge Larvae (Diptera:Chironomidae) from Northern Nova Scotia, Canada. Hydrobiologia 563, 277–287. doi:10.1007/s10750-006-0012-8

Medeiros, A., Duarte, S., Pascoal, C., Cássio, F., Graça, M., 2010. Effects of Zn, Fe and Mn on Leaf Litter Breakdown by Aquatic Fungi: a Microcosm Study. Int. Rev. Hydrobiol. 95, 12–26. doi:10.1002/iroh.200911182

Meregalli, G., Pluymers, L., Ollevier, F., 2001. Induction of mouthpart deformities in Chironomus riparius larvae exposed to 4-n-nonylphenol. Environ. Pollut. 111, 241–246. doi:10.1016/S0269-7491(00)00068-3

Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in Chironomus riparius. Chemosphere 92, 592–599.

doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.060

Pascoal, C., Cássio, F., 2004. Contribution of Fungi and Bacteria to Leaf Litter Decomposition in a Polluted River. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5266–5273. doi:10.1128/AEM.70.9.5266-5273.2004

Pascoal, C., Cássio, F., Gomes, P., 2001. Leaf Breakdown Rates: a Measure of Water Quality? Int. Rev. Hydrobiol. 86, 407–416. doi:10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P

Pascoal, C., Pinho, M., Cássio, F., Gomes, P., 2003. Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river. Freshw. Biol. 48, 2033–2044. doi:10.1046/j.1365-2427.2003.01130.x

Pascoe, D., Williams, K.A., Green, D.W.J., 1989. Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence. Hydrobiologia 175, 109–115. doi:10.1007/BF00765121

Péry, A.R.R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R., Garric, J., 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on Chironomus riparius based on cytosolic accumulation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 869–873. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.04.009

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14, 1–11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9

Pradhan, A., Seena, S., Dobritzsch, D., Helm, S., Gerth, K., Dobritzsch, M., Krauss, G.-J., Schlosser, D., Pascoal, C., Cássio, F., 2014. Physiological responses to nanoCuO in fungi from non-polluted and metal-polluted streams. Sci. Total Environ. 466-467, 556–563. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.073

Pradhan, A., Seena, S., Pascoal, C., Cássio, F., 2011. Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams? Microb. Ecol. 62, 58–68. doi:10.1007/s00248-011-9861-4

Pradhan, A., Seena, S., Pascoal, C., Cássio, F., 2012. Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder Allogamus ligonifer. Chemosphere 89, 1142–1150. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.06.001

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.062

Rao, C.N.R., Cheetham, A.K., 2001. Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects. J. Mater. Chem. 11, 2887–2894. doi:10.1039/B105058N

Roussel, H., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., 2008. Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 27, 637–644. doi:10.1897/07-168

Taylor, B.R., Chauvet, E.E., 2014. Relative influence of shredders and fungi on leaf litter decomposition along a river altitudinal gradient. Hydrobiologia

721, 239–250. doi:10.1007/s10750-013-1666-7

Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. Transfer, transformation, and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b

The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.

Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A.R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO2 nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (Raphanus sativus) seedlings. J. Hazard. Mater. 263 Pt 2, 677–684. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.030

Vermeulen, A.C., Dall, P.C., Lindegaard, C., Ollevier, F., Goddeeris, B., 1998. Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/60272 (accessed 9.4.12).

Warwick, Tisdale, 1988. Morphological Deformities in Chironomus, Cryptochironomus, and Procladius Larvae (Diptera: Chironomidae) from Two Differentially Stressed Sites in Tobin Lake, Saskatchewan. Can J Fish Aquat Sci 45.

Wentsel, R., McIntosh, A., Atchison, G., 1977. Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on midge larvae (Chironomus tentans). Hydrobiologia 56, 153–156. doi:10.1007/BF00023354

Yang, X., Gondikas, A.P., Marinakos, S.M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2012. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in Caenorhabditis elegans. Environ. Sci. Technol. 46, 1119–1127. doi:10.1021/es202417t

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

Supplementary Material

Microbial community diversity assessment

These analyses have been performed at the LIEC (UMR 7360, Metz, France).

DNA extraction: DNA is extracted from filters with PowerSoil DNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA), following producer's instructions. Universal primers 341F-GC and 907R (Muyzer *et al*., 2004, 1993) are used for the partial amplification of rDNA 16S. PCR mix (100 µl) contains 6U of TaqPolymerase (5 PRIME, Hambourg, Germany), 10 µL of Taq 10x buffer, 200 µM of dNTP, 0.5 µM of primers and 50 ng of extracted DNA. PCR protocol consists in 5 minutes of denaturation at 95°C; 20 cycles of 30s at 95°C, 30s at 65-55°C (touchdown -0,5°C per cycle), 35s at 72°C ; followed by 10 cycles of 30s at 95°C, 30s at 55°C and 35s at 72°C and final elongation of 7 minutes at 72°C.

DGGE analysis: PCR products are verified on agarose gel (1% w/v) and separated with the DCODE Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). PCR products migration is then realized on polyacrylamide gel (7% w/v) with TAE 1x buffer at 65V and 60°C for 16h. Gel is then marked with SYBR Green I and visualized with STARION FLA-9000 scanner (Fujifilm Life Sciences FSVT, Courbevoie, France). GelCompar II software was used to normalize and compare DGGE profiles. 1% of tolerance is applied for the position. Grouped analysis of DGGE profiles is realized following the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) method, based on the similarity coefficients. A correlation matrix is then generated for each comparison and data are analyzed by NMDS with SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Similarity analysis is realized with PAST software (Hammer *et al*., 2001) to characterize differences between samples.

References

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4 (1), 9.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. 743–769.

Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Discussion générale

1. Bilan – apport des études en microcosme

1.1 Bilan

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les effets de plusieurs types de NP de CeO_2 chez différents organismes et suivant différents modes d'exposition (tableau 5). Ainsi, aucun effet toxique n'a été mis en évidence chez les diatomées et les chironomes exposés de manière isolée en conditions standardisées. En revanche, une inhibition de croissance significative a été observée chez le xénope, exposé en conditions monospécifiques aux NP sphériques enrobées de citrate et aux NP brutes cubiques, à partir de 1 mg/L. Aucun effet génotoxique n'a été mis en évidence. Enfin, l'exposition aux NP cubiques brutes a entraîné des effets de toxicité chronique chez le pleurodèle en essais monospécifiques, se traduisant par une inhibition de croissance observée à 10 mg/L et une génotoxicité induite de façon dose-dépendante. Notons que l'étude des NP sphériques non enrobées n'a pas pu être réalisée en conditions standardisées (expositions monospécifiques) du fait des faibles quantités disponibles de ces NP.

Les expériences réalisées en microcosme ont mis en évidence des effets des NP de CeO_2 à l'échelle des communautés et du fonctionnement de l'écosystème. En effet, des modifications des communautés bactériennes ont été observées en présence des deux types de NP brutes (cubiques et sphériques). Aucun effet n'a cependant été mis en évidence en présence des NP enrobées de citrate. Une diminution de la décomposition de la litière, marqueur du bon fonctionnement des écosystèmes, a également été observée en présence des NP sphériques brutes. Dans cette même condition, une augmentation significative de malformations des pièces buccales (effet tératogène) a eu lieu chez les larves de chironome, principal décomposeur de la litière dans nos conditions expérimentales. Aucun effet n'a été observé sur ces marqueurs en présence des deux autres types de NP. Aucune inhibition de croissance n'a été observée chez les larves de chironomes exposées en microcosmes, malgré les très fortes concentrations en Ce mesurées dans ces organismes. Ainsi, des concentrations en Ce de 606, 282 et 266 mg/kg ont été mesurées dans les larves exposées aux NP sphériques enrobées, sphériques brutes et cubiques brutes, respectivement. Ces valeurs représentent des facteurs d'accumulation de 47, 35 et 14 par rapport aux concentrations de Ce mesurées dans le sédiment. Elles doivent cependant être interprétées avec précaution. En effet, les très faibles quantités de matière restant après séchage des larves de chironomes entraînent des incertitudes importantes sur la pesée des larves. Les concentrations en Ce étant exprimées en fonction du poids sec des organismes, une sous-estimation du poids sec entraîne une

surestimation importante des concentrations en Ce. Ce biais peut être à l'origine des écarts importants observés entre les réplicats d'une même condition. Les expériences en microcosme ont également permis de mettre en évidence un transfert trophique des NP de CeO_2 jusqu'au maillon supérieur de la chaîne trophique. En effet, des concentrations en Ce proches de 10 mg/kg ont été mesurées dans les larves de pleurodèle. Bien qu'il n'y ait pas eu de phénomène de bioamplification des NP dans cette chaîne trophique expérimentale, ces valeurs représentent une accumulation des NP d'un facteur 10 chez les pleurodèles, par rapport à la quantité initiale introduite dans les microcosmes (1 mg/L). Ce transfert trophique s'accompagne d'effets toxiques chez les larves de pleurodèles. Une génotoxicité importante a été mise en évidence chez ces organismes en présence des trois types de NP, et un taux de mortalité élevé a également été observé en présence des NP cubiques, preuve de la diversité potentielle des modes d'actions toxiques des NP sur ce maillon de la chaîne trophique.

Tableau 5 : Bilan des effets observés chez les différentes espèces exposées aux NP de CeO_2 suivant différentes méthodes.

	Expositions monospécifiques		Expositions en microcosmes			Exposition par voie trophique
	NP sphériques enrobées	NP cubiques brutes	NP sphériques brutes	NP sphériques enrobées	NP cubiques brutes	NP cubiques brutes
Communautés bactériennes	nd[1]	nd	Modification des communautés	Pas d'effet	Modification des communautés	nd
Hyphomycètes	nd	nd	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	nd
Diatomées (*N. palea*)	Pas d'effet	Pas d'effet	nd	nd	nd	nd
Xénopes (*X. laevis*)	Pas de mortalité [2] Inhibition de croissance (dès 1 mg/L) Pas de génotoxicité	35% mortalité (10 mg/L) [2] Inhibition de croissance (dès 1 mg/L) Pas de génotoxicité	nd	nd	nd	nd
Chironomes (*C. riparius*)	Pas d'effet	Pas d'effet	Tératogénicité	Pas d'effet	Pas d'effet	nd
Pleurodèles (*P. waltl.*)	Pas de mortalité [2] Pas d'inhibition de croissance Pas de génotoxicité	Pas de mortalité [2] Inhibition de croissance (10 mg/L) Génotoxicité dose-dépendante	Pas de mortalité Pas d'inhibition de croissance Génotoxicité	Pas de mortalité Pas d'inhibition de croissance Génotoxicité	35% de mortalité Pas d'inhibition de croissance Génotoxicité	Pas d'effet

[1] non déterminé

[2] Expositions réalisées en eau reconstituée (ISO, 2006)

1.2 A nanoparticules différentes, effets différents

Le premier constat qui ressort de ces résultats est la différence d'effets observée en fonction de la nature des NP de CeO_2. Les principales propriétés distinguant ces NP sont leur taille, leur forme et la présence ou non d'un enrobage. Les deux lots de NP sphériques comprennent des NP de tailles identiques et homogènes, comprises entre 2 et 5 nm. En revanche, le lot de NP cubiques est très polydisperse, avec des populations de NP de taille inférieure à 20 nm et supérieure à 50 nm. L'analyse du rôle spécifique de la taille des NP dans notre étude n'est donc pas possible. De nombreuses études portent sur l'influence de ce paramètre sur la toxicité des NP. Si certains auteurs concluent à une absence de corrélation entre taille et toxicité des NP (Ispas *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012), d'autres ont mis en évidence l'effet inverse (Pelletier *et al.*, 2010; Sriram *et al.*, 2012). Manier *et al.* (2013) ont notamment observé une influence de la taille de NP de CeO_2 sur leur toxicité chez des algues, mais suggèrent que ce phénomène est lié à la surface de contact entre les NP et les cellules, qui elle-même dépend de la taille des NP. En effet, une diminution de taille des NP entraîne une augmentation de leur aire de surface spécifique, et donc de leur réactivité (Oberdorster *et al.*, 2005) et surface de contact potentielle avec les organismes. De même, Pal *et al.* (2007) suggèrent que la toxicité de NP d'Ag en plaquettes est liée à la combinaison entre la taille et le plan des NP, les facettes à haute densité d'atomes étant plus réactives et donc potentiellement plus toxiques. La taille des NP jouerait donc un rôle dans leur toxicité, mais de manière indirecte.

La surface spécifique des NP étant aussi liée à leur forme, ce paramètre peut également déterminer en partie la toxicité des NP. Ainsi, George *et al.* (2012) ont montré que les NP d'Ag sous forme de plaquettes étaient plus toxiques que les formes sphériques ou que les nanotubes d'Ag. Les auteurs attribuent ce phénomène aux défauts structuraux des NP, plus nombreux sur les plaquettes et à l'origine d'une plus grande réactivité des NP. Il est en effet reconnu que les bords et les angles des NP polyédriques peuvent être biologiquement et chimiquement plus réactifs que d'autres parties des NP (Pelletier *et al.*, 2010; Preda *et al.*, 2011). Ces résultats sont en accord avec nos observations : dans notre étude, les NP cubiques possèdent la plus grande aire de surface spécifique, du fait de leurs nombreuses facettes, et sont également les NP qui entraînent la toxicité la plus importante, notamment chez les pleurodèles.

Les NP enrobées de citrate se sont révélées globalement moins toxiques que les deux autres types de NP. Ce phénomène a également été observé chez les plantes (Trujillo-Reyes *et al.*, 2013) et les planorbes (Tella *et al.*, 2014), avec une toxicité des NP de CeO_2 enrobées de

citrate plus faible que dans le cas de NP brutes. L'enrobage de citrate pourrait donc jouer un rôle protecteur en diminuant la réactivité de surface des NP. Un effet protecteur de l'enrobage de citrate a également été observé dans le cas de NP d'Ag, par chélation des ions Ag^+, principale source de toxicité lors de la dissolution des NP d'Ag (Yang *et al.*, 2012). En outre, un effet protecteur a été observé dans notre étude sur les chironomes exposés en microcosmes, avec un taux de malformation des pièces buccales significativement plus faible que chez les témoins. De plus, lors des essais monospécifiques, une légère hausse de croissance a été observée chez les pleurodèles et les chironomes exposés à ces NP. Cet effet positif est également retrouvé chez les pleurodèles exposés à une solution de citrate (« témoin citrate » des expositions monospécifiques). Ces résultats sont cependant non significatifs et n'ont donc pas été présentés précédemment (Bour *et al*., 2015b). Il est donc envisageable que l'enrobage de citrate soit à l'origine des effets positifs observés. Son altération en microcosme (Auffan *et al.*, 2014; Manier *et al.*, 2013) entraînerait d'une part, le relargage du citrate, rendu alors disponible pour certaines espèces bactériennes, et d'autre part, la mise à nu des NP, dont la toxicité serait alors potentiellement plus importante. Ceci pourrait notamment expliquer la génotoxicité observée chez les pleurodèles exposés en microcosme en présence des NP enrobées de citrate, non observée lors de l'exposition monospécifique, trop courte pour que l'altération de l'enrobage de citrate ait lieu.

Toutefois, aucun de ces paramètres (taille, forme, enrobage) ne semble cependant expliquer entièrement la toxicité des NP de CeO_2, les effets observés étant assez contrastés. Ainsi, les NP enrobées inhibent la croissance des xénopes mais n'ont aucun effet chez les autres espèces, les NP cubiques entraînent une forte toxicité chez les pleurodèles mais n'ont pas d'effet sur la biomasse mycélienne et les chironomes, et les NP sphériques brutes sont les seules à impacter la décomposition de la litière et à être tératogènes chez le chironome, mais sont moins toxiques que les NP cubiques chez le pleurodèle. La toxicité des NP dépend donc de leurs propriétés mais également de leurs cibles biologiques. Si cette étude a permis de mettre en évidence des différences d'effets suivant les différents types de NP testés, d'autres analyses sont encore nécessaires pour comprendre l'implication de chacune des caractéristiques des NP dans leurs mécanismes de toxicité.

1.3 A méthodes d'exposition différentes, effets différents

Un autre des résultats patents de cette étude est la différence de réponse(s) biologique(s) entre les essais monospécifiques (en conditions standardisées) et les expositions en

microcosme. Cette différence est particulièrement marquée chez le pleurodèle dans le cas des NP cubiques, pour lesquelles une exposition par voie trophique n'entraîne aucune toxicité, une exposition directe entraîne des effets génotoxiques, et une exposition en microcosme conduit à de la toxicité aiguë (tableau 1). Ces différences sont discutées de manière détaillée au chapitre IV, partie 3. Tout d'abord, l'hypothèse d'une altération physiologique des organismes en microcosme due à un dysfonctionnement général de l'écosystème lié aux NP est à écarter. En effet, les paramètres physico-chimiques (pH, conductivité, taux d'oxygène dissous) ne diffèrent pas du témoin, et les NP n'entraînent pas non plus la disparition d'un maillon trophique inférieur, qui aurait alors eu des conséquences néfastes sur les pleurodèles par manque de nourriture.

Les différences de résultat pourraient également provenir d'une accumulation de NP variable suivant l'exposition, entraînant des effets différents. Cette hypothèse est également infirmée. En effet, la comparaison des différentes méthodes d'exposition montre qu'aucune toxicité n'est observée chez le pleurodèle à la plus forte concentration, alors qu'une toxicité aiguë est observée chez cette espèce à une concentration en NP intermédiaire.

De plus, la voie d'exposition aux NP ne permet pas d'expliquer les différences de toxicité observées. En effet, une toxicité aiguë est observée chez les larves de pleurodèle exposées en microcosme, où l'exposition se fait simultanément par voies directe et trophique. En revanche, aucune toxicité n'est observée lors de l'exposition par voie trophique uniquement, et la toxicité observée par voie directe est plus faible en conditions monospécifiques qu'en microcosme, malgré une concentration nominale en NP supérieure lors de l'exposition monospécifique. On peut alors émettre l'hypothèse que la combinaison des deux voies d'expositions en microcosme jouerait un rôle dans la toxicité accrue observée chez les pleurodèles.

L'interaction entre les NP et les différents organismes présents en microcosme peut avoir un rôle majeur dans la toxicité des NP. Tout d'abord, elle pourrait être à l'origine d'une toxicité indirecte des NP chez les pleurodèles. En effet, l'exposition des micro-organismes aux NP pourrait entraîner la production de toxines dans le milieu d'exposition, tels que des mycotoxines ou phycotoxines (Arsuffi and Suberkropp, 1989), en réaction à un stress.

En microcosme, les NP peuvent également subir des modifications de spéciation au contact des organismes, par contact avec des métabolites produits par les micro-organismes (Thill *et al*., 2006), suite à leur ingestion puis excrétion par les larves de chironomes (Tella *et al.*, 2014) ou à l'activité de bioturbation exercée par ces dernières. En effet, des études menées sur des contaminants métalliques ont montré que la bioturbation peut être à l'origine de

modifications de la spéciation des métaux dans le sédiment (Lagauzère *et al.*, 2009). Une première hypothèse serait alors que les formes réduite et oxydée du Ce présentent des toxicités différentes. Une deuxième hypothèse serait que la toxicité des NP de CeO_2 pourrait être due au *passage* d'un état d'oxydation à l'autre, plutôt qu'à l'état d'oxydation en soi. En effet, ce passage d'un état d'oxydation à l'autre met en jeu des échanges d'électrons et la libération de composés réactifs de l'oxygène, selon une réaction de Fenton (Culcasi *et al.*, 2012; Ivana Celardo, 2011; Korsvik *et al.*, 2007) :

$$Ce^{4+} + H_2O_2 \rightarrow Ce^{3+} + HOO^{\bullet} + H^+$$
$$Ce^{4+} + HOO^{\bullet} \rightarrow Ce^{3+} + O_2 + H^+$$

Preda *et al.* (2011) proposent également que la présence de Ce^{III} en surface des NP, due à des lacunes en oxygène, peut entraîner la formation d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) ou d'ions peroxyde (O_2^{2-}).

Les composés réactifs de l'oxygène (en rouge ci-dessus) mis en jeu dans les changements d'état d'oxydation du Ce peuvent être toxiques pour les organismes, malgré leur caractère transitoire et leur durée de vie très courte. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'absence de toxicité observée chez le pleurodèle lors de l'exposition par voie trophique. En effet, il peut être envisagé que les modifications de spéciation des NP aient lieu lors de leur ingestion par les chironomes, notamment du fait du pH acide de leur tube digestif. Les chironomes ne sont pas impactés par ces transformations des NP. Lorsque les pleurodèles ingèrent les chironomes contaminés aux NP, les réactions d'oxydo-réduction du Ce auraient déjà eu lieu, expliquant l'absence de toxicité observée chez le pleurodèle (figure 20).

Enfin, une dissolution des NP peut avoir lieu suite à leur réduction. Bien que les conditions de pH ne soient pas optimales pour la dissolution des NP (pH > 8), la présence de micro-organismes et de nombreux composés organiques pourrait être à l'origine d'une dissolution partielle des NP, notamment observée par MET dans le cas des NP cubiques (*cf.* chap. IV, part. 3). Il peut également être envisagé qu'une dissolution des NP ait lieu suite à leur ingestion par les chironomes, du fait du pH interne très faible des organismes, et que les formes réactives ainsi générées soient ensuite excrétées dans le milieu. Le taux de Ce dissous mesuré dans la colonne d'eau est cependant relativement faible en fin d'expérience. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Il est très probable que les ions Ce libérés lors de la dissolution des NP en microcosme se complexent avec des composés phosphates ou carbonates. On peut alors supposer que ces composés tendent à sédimenter et ne sont donc plus présents dans la colonne d'eau. Un autre phénomène envisagé pour expliquer ce résultat

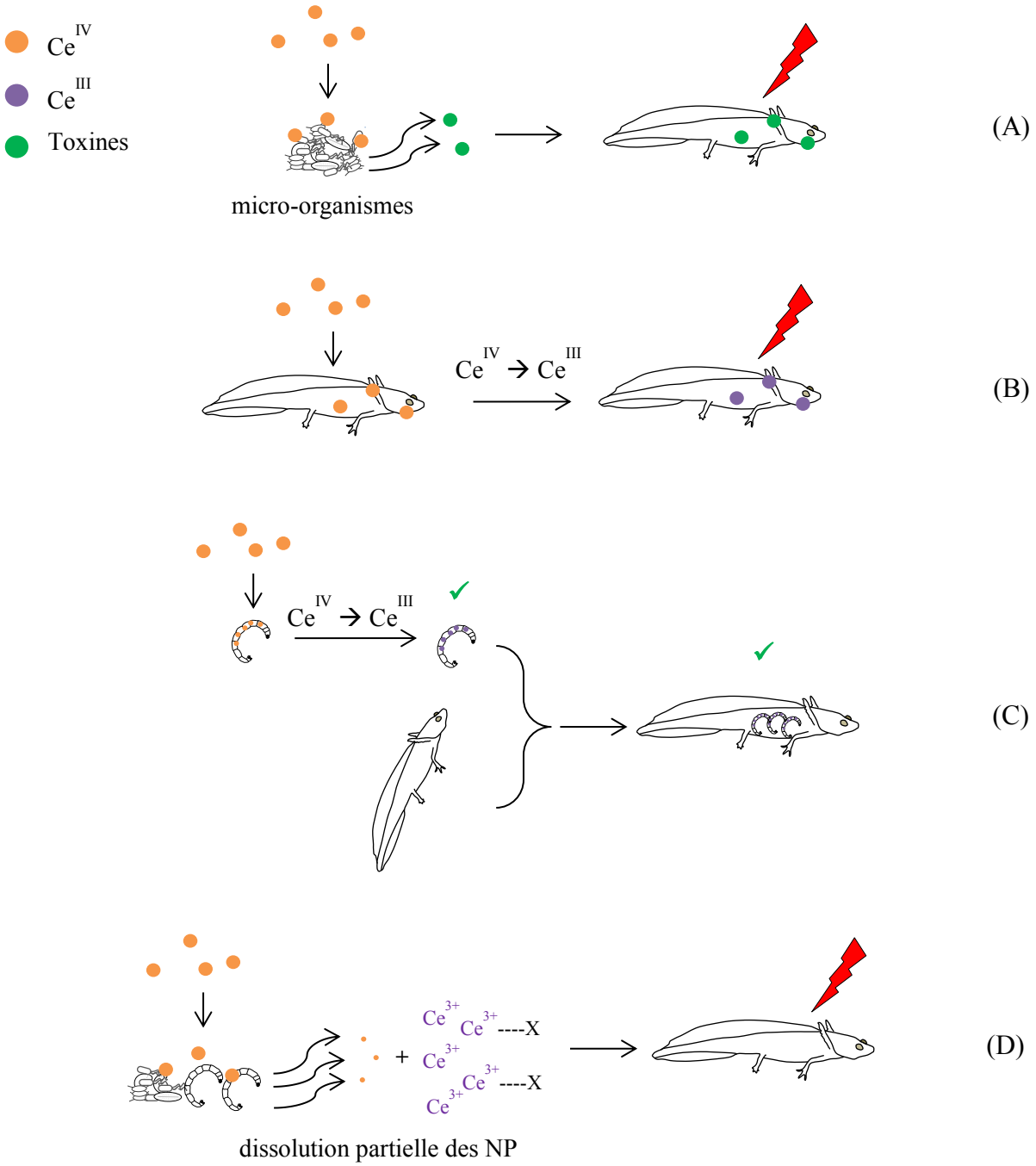


Figure 20 : Illustration des différentes hypothèses proposées pour expliquer les effets des NP de CeO_2 chez les pleurodèles.
(A) Les micro-organismes produisent des toxines en réaction à leur exposition aux NP. (B) La réduction des NP en contact direct avec le pleurodèle entraîne de la toxicité. (C) Lors d'une exposition par voie trophique uniquement, la réduction des NP en contact avec les chironomes n'entraîne pas de toxicité chez cet organisme. L'ingestion des chironomes contaminés par le pleurodèle n'entraîne pas de toxicité, la réduction des NP ayant déjà eu lieu. (D) L'interaction des NP avec les micro ou macro-organismes entraîne leur dissolution partielle et la libération d'ions Ce^{3+}. Ces ions, seuls ou complexés (Ce^{3+}---X), sont responsables de la toxicité chez les pleurodèles.

repose sur la méthode de séparation des NP et du Ce dissous. Les composés formés avec les ions Ce, de poids moléculaire plus important que les ions isolés, peuvent être entraînés avec les NP dans le culot lors de l'ultracentrifugation et ne pourraient donc pas être détectés dans le surnageant. La dissolution des NP pourrait être à l'origine de la toxicité observée chez les pleurodèles, suivant deux modalités. Tout d'abord, les ions Ce^{3+} libérés pourraient être directement toxiques pour les pleurodèles, ou former des complexes toxiques, avec des acides carboxyliques ou des phosphates présents dans le milieu. Une autre hypothèse repose sur la taille des NP, suite à leur dissolution. En effet, les NP observées en microcosme en fin d'expérience sont significativement plus petites que les NP initialement introduites. Il serait donc envisageable que la petite taille de ces NP (2 – 3 nm) soit à l'origine de leur toxicité. Cette taille correspond cependant à celle des autres NP étudiées (sphériques enrobées et brutes), pour lesquelles aucune toxicité aiguë n'a été observée. L'hypothèse d'une toxicité due à la taille des NP est donc infirmée dans ce cas précis.

1.4 Apports de l'utilisation des microcosmes

Il apparaît que la complexité du système (milieu d'exposition et organismes présents) lors des expositions en microcosme joue un rôle primordial dans le devenir des NP et leurs effets sur les organismes. Les NP peuvent notamment subir de multiples transformations telles que des transformations de phase, des restructurations ou de la dissolution de surface, du fait de leur interaction directe avec les organismes ou de la sécrétion de substances dans le milieu, qui peuvent en changer les propriétés (Nel *et al.*, 2006). Les mécanismes d'interaction à l'interface nano-bio, grandement impliqués dans la toxicité des NP en milieu complexe, sont encore peu connus (Xu *et al.*, 2012).

Si cette complexité liée au système d'exposition rend l'interprétation des résultats plus difficile, elle est néanmoins essentielle car elle permet une approche plus représentative des conditions environnementales. En effet, une grande diversité des espèces présentes et des fonctions qu'elles assurent (producteurs primaires, décomposeurs/collecteurs de la matière organique, prédateurs, micro-organismes impliqués dans le cycle de l'azote, *etc.*) permet un fonctionnement de l'écosystème plus stable et efficace (Jabiol *et al.*, 2013), notamment du fait des nombreuses interactions inter-espèces. En système complexe, l'impact d'un polluant sur une espèce peut alors se répercuter et s'amplifier dans le réseau écologique, et impacter l'ensemble du fonctionnement de l'écosystème (Jabiol *et al.*, 2013). Lors d'études en microcosmes, le choix d'espèces représentatives de différents niveaux trophiques et de

différentes fonctions écologiques est donc primordial pour une évaluation des NP la plus représentative possible des conditions environnementales.

Les organismes sélectionnés pour notre étude répondent particulièrement bien à ce besoin. Ainsi, les micro-organismes (communautés bactériennes et hyphomycètes) présents assurent le bon fonctionnement du cycle de l'azote et constituent la base de l'alimentation des espèces de niveau trophique supérieur. Ils sont également impliqués dans la dégradation de la litière, de manière directe ou par influence de la palatabilité des feuilles pour les chironomes (Arsuffi et Suberkropp, 1989; Gessner et Chauvet, 1994). Les larves de chironomes ont également des rôles multiples. Elles ont tout d'abord un impact sur les communautés microbiennes. Elles influencent ainsi l'établissement des biofilms microbiens par leur activité de bioturbation qui permet une oxygénation du sédiment (Poulsen *et al.*, 2014), et exercent également une pression de prédation sur les biofilms, source principale de leur alimentation (Yeager *et al.*, 2001). Leur activité de bioturbation joue également un rôle important dans le déplacement des NP, par enfouissement dans le sédiment et relargage potentiel dans la colonne d'eau des NP liées au sédiment. De plus, cette activité de bioturbation peut être à l'origine de modifications de la spéciation des NP, ainsi que cela a été montré pour d'autres contaminants métalliques (Lagauzère *et al.*, 2009). Les larves de chironomes s'avèrent également être des vecteurs important de transfert trophique, du fait de leur grande résistance aux NP et de leur importante capacité d'accumulation. Enfin, cet organisme permet l'étude d'un marqueur de toxicité sensible qu'est l'induction de malformations des pièces buccales. Pour finir, les larves de pleurodèles exercent une pression de prédation importante sur les chironomes. Elles représentent une espèce sensible, située en haut de la chaîne trophique, et permettent donc l'étude du transfert et de la toxicité des NP le long de la chaîne trophique. Ce modèle permet notamment une étude à court temps d'analyse mais représentative d'une toxicité à long terme, grâce au marqueur de génotoxicité qu'est l'induction de micronoyaux érythrocytaires.

A notre connaissance, cette étude est actuellement la seule proposant une évaluation du devenir et de l'impact des NP en système complexe comprenant trois niveaux trophiques. Cette approche en microcosme permet une évaluation à une échelle de taille et de complexité intermédiaire entre les essais monospécifiques standardisés de laboratoire et les études en mésocosmes de grande taille à ciel ouvert. La complexité du système, combinée à la maîtrise dans une certaine mesure des paramètres biotiques et abiotiques, permet une approche mécanistique tant au niveau du devenir des NP que de leur toxicité, tout en se plaçant dans des conditions pertinentes au niveau environnemental. Néanmoins, cette approche en

microcosme en est encore à ses débuts et ne permet actuellement pas d'expliquer l'ensemble des phénomènes observés ou de fournir des mécanismes de toxicité détaillés. Malgré cela, il est nécessaire que de telles études se développent afin de permettre une évaluation pertinente de l'écotoxicité des NP.

Si le microcosme est un outil essentiel dans la réalisation de cet objectif, le choix initial des espèces présentes est fondamental. En effet, il détermine l'échelle à laquelle l'évaluation écotoxicologique sera réalisée (organisme isolé, communauté et/ou écosystème) et donc les informations que cette évaluation pourra apporter en termes d'impact environnemental. Ainsi, notre système expérimental permet une évaluation à l'échelle (i) de la chaîne trophique, depuis les producteurs primaires jusqu'aux consommateurs secondaires ; (ii) de la communauté, grâce à l'étude de la diversité des communautés bactériennes ; (iii) du fonctionnement de l'écosystème expérimental, grâce à des marqueurs sensibles tels que la décomposition de la litière par les micro-organismes et les macro-invertébrés, et les effets tératogènes chez les larves de chironome.

Notre démarche expérimentale, combinant plusieurs modes d'expositions, dont l'utilisation d'un outil intégratif qu'est le microcosme, ouvre notamment des portes en matière de prévision du risque. L'objectif final du projet MESONNET, dans le cadre du GDRi iCEINT, est notamment de regrouper l'ensemble des résultats issus des expositions réalisées au sein des différents laboratoires afin d'en extraire les indicateurs discriminants et les plus pertinents en termes d'évaluation du risque environnemental, à l'aide d'outils statistiques et de modélisation.

2. Limites des méthodes d'exposition mises en œuvre

2.1 Expositions en microcosme

Un des inconvénients majeur de toute étude en système complexe est la reproductibilité des résultats. Comme vu dans la partie précédente, toutes les espèces présentes en systèmes complexes interagissent entre elles, directement ou indirectement. La moindre variation, biologique ou physico-chimique, risque donc de se répercuter sur l'ensemble du système. Ainsi, la variabilité biologique naturelle, observée lors de toute exposition et à l'origine de la nécessité d'utiliser un nombre important d'organismes au sein d'une même condition d'exposition, se trouve amplifiée en système complexe. Ce phénomène illustre le principe du

lien inversement proportionnel entre la complexité d'un système et la maîtrise que l'expérimentateur en a (figure 21).

Ainsi, dans cette étude, les trois réplicats d'une même condition ne se comportaient pas toujours de la même façon lors des expositions réalisées en microcosme. Nous avons observé que le développement du biofilm lors des premières semaines d'expériences était souvent homogène entre les différents microcosmes, sauf dans un voire deux microcosmes, où le biofilm était moins dense et/ou moins bien réparti, malgré des conditions initiales a priori identiques. De même, des cas de contamination aux algues vertes ont eu lieu ponctuellement, alors que cette espèce n'est théoriquement pas présente dans nos systèmes. Le développement des algues vertes s'est alors avéré très rapide et conséquent, et a potentiellement créé des phénomènes de compétition avec d'autres espèces. Une autre conséquence de la variabilité biologique concerne les quantités de Ce mesurées dans les organismes. Ainsi, il existe un premier niveau de variabilité avec les chironomes, dont l'ingestion de sédiment contaminé varie d'un organisme à l'autre. Cette variabilité est amplifiée au niveau des pleurodèles, qui d'une part ingèrent des chironomes contaminés de manière hétérogène, et d'autre part dont l'activité de prédation varie également d'un organisme à l'autre. Enfin, le cas de variabilité le plus marquant de cette étude est la mortalité observée chez les pleurodèles exposés aux NP cubiques. Le pourcentage moyen de mortalité est de 35%, mais la mortalité observée dans chacun des réplicats est de 64,7%, 41,2% et 0% respectivement. Notons cependant que l'état physiologique de tous les pleurodèles exposés à ce type de NP était gravement altéré (*i.e.* larves couchées sur le flan, pas de réponse à un stimulus mécanique).

Cette variabilité importante soulève donc le problème du traitement des résultats. Chaque microcosme pourrait en effet être considéré comme un système indépendant, et non comme un réplicat d'exposition. Nous avons cependant fait le choix de grouper les réplicats pour l'analyse de chaque paramètre. En effet, les microcosmes sont considérés dans notre étude comme un outil d'évaluation écotoxicologique. La présence de réplicats est donc primordiale. L'importante variabilité biologique propre à l'étude des systèmes complexes nécessiterait d'autant plus de réplicats que le système est complexe, et donc sujet à variations. Cependant, la difficulté de mise en œuvre (durée des expériences, maintenance régulière importante, lancement et arrêt des expériences lourds à mettre en œuvre) et les contraintes matérielles (espace nécessaire, matériel d'expérimentation) ne permettent pas de multiplier les réplicats. Dans notre étude, la mise en place de trois réplicats par condition correspond à un compromis acceptable entre un nombre suffisant de réplicats et la faisabilité des expériences.

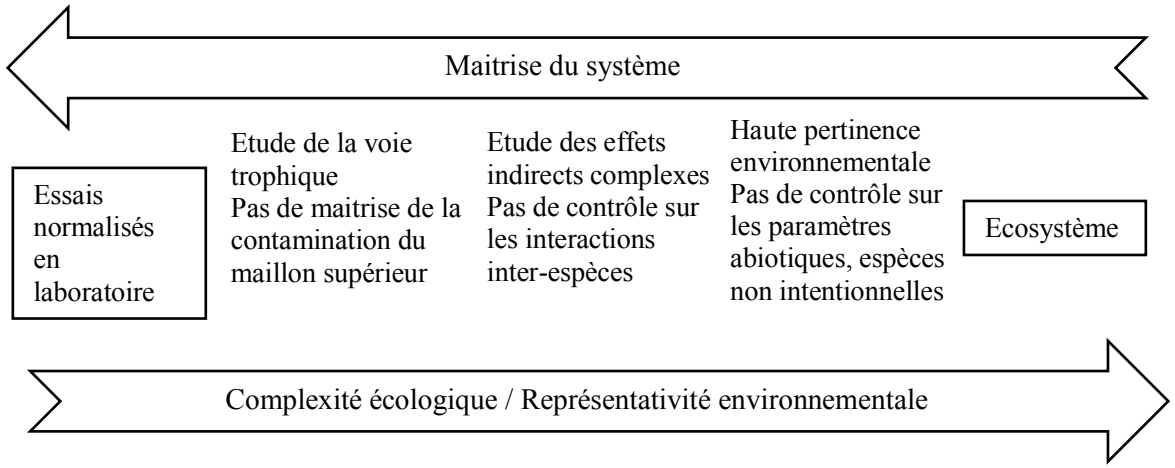


Figure 21 : Schéma représentant le lien inversement proportionnel entre la maîtrise et la complexité d'un système biologique (d'après Bour *et al.,* 2015a).

Si le problème de reproductibilité des résultats est généralisable à l'ensemble des études de systèmes biologiques complexes, certaines limites rencontrées durant cette étude sont intrinsèques à notre système. Ainsi, il a été observé que le biofilm microbien recouvre l'ensemble de la surface du sédiment en un temps relativement court (environ 10 jours), mais fini par régresser après une phase de stabilisation et est brouté relativement vite (une semaine) par les larves de chironome, quel que soit le temps alloué au développement du biofilm. Cette période d'une semaine est suffisante à la croissance des chironomes, mais il aurait pu être profitable qu'elle soit plus importante. Une plus grande surface de sédiment aurait permis l'établissement d'un biofilm plus important et donc disponible plus longtemps pour les larves de chironome.

De plus, nous avons observé que malgré leur croissance rapide, un nombre négligeable de chironomes arrivait jusqu'à la phase adulte. En effet, lorsque les nymphes de chironomes remontent la colonne d'eau, elles rencontrent plusieurs écueils limitant leur passage en phase adulte. Tout d'abord, la remontée de la colonne d'eau entraîne une grande dépense d'énergie pour les nymphes, du fait de la hauteur d'eau importante et de la zone intermédiaire difficile à franchir, à cause des nombreux remous dus au débit important des pompes (600 L/h). La transformation en imagos, qui nécessite une énergie métabolique conséquente, est alors souvent impossible pour les nymphes. D'autre part, lors de leur remontée, les nymphes sont particulièrement exposées à la prédation par les pleurodèles. La colonne d'eau à remonter étant importante, cette phase est relativement longue et entraîne alors de grandes pertes chez les chironomes.

Enfin, l'état physiologique général des larves de pleurodèle n'est pas optimal lors des expositions en microcosme, et ce indépendamment de l'exposition aux NP. En effet, en fin

d'expérience, bien que le stade de développement théorique soit atteint, les larves sont de taille inférieure à celle attendue selon la table de développement de Gallien et Durocher (1957), et les ponctions intracardiaques révèlent des larves anémiées, avec de faibles volumes de sang, pauvre en cellules érythrocytaires. Ces observations suggèrent un manque de ressources, entraînant une allocation énergétique au développement des larves au détriment de leur croissance. Une des causes envisagées serait des quantités de nourriture disponibles pour les larves trop faibles dans le système. Cependant, comme développé au chapitre IV, partie 1, l'obtention d'un système biologique fonctionnel et autonome implique de devoir limiter les apports à certaines espèces pour permettre le développement d'autres espèces. Dans notre cas, ceci revient à limiter les quantités de nourriture des pleurodèles (*i.e.* nombre de chironomes) pour éviter un épuisement trop rapide du compartiment primaire, du fait d'un taux de broutage par les chironomes trop important. Une autre explication possible de l'état physiologique des pleurodèles relève de l'énergie dépensée par les larves dans la colonne d'eau. De même que pour les chironomes, il est probable que les remous importants de la zone intermédiaire de la colonne d'eau entraînent des dépenses énergétiques conséquentes lorsque les larves ont à traverser cette zone.

Ces observations ouvrent des perspectives en termes d'amélioration du système. Il est ainsi envisageable de développer des microcosmes aux dimensions différentes, avec une surface de sédiment plus importante et une colonne d'eau plus basse. Ceci permettrait notamment de réduire le débit d'eau, tout en conservant une homogénéisation suffisante du milieu.

2.2 Application des tests normalisés à l'évaluation des nanoparticules

Les tests normalisés impliquent plusieurs contraintes pour l'évaluation des NP. L'une d'elles est la source de nourriture des organismes. En effet, lors d'essais standardisés d'une durée de plusieurs jours, les normes préconisent généralement le nourrissage des organismes avec un type de nourriture bien défini. Dans le cas de l'exposition des xénopes, il s'agit de flocons de Tétraphyll® contenant des antioxydants (appelés « antioxygène », voir annexe 1). Or, il a été montré qu'un des mécanismes impliqués dans la toxicité des NP est la génération d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant chez les organismes un stress oxydant pouvant conduire à des dommages à l'ADN (voir Petersen et Nelson, 2010, pour revue). L'induction de stress oxydant en présence de NP de CeO_2 a notamment été mise en évidence chez les nématodes (Zhang *et al.*, 2011), les algues (Rodea-Palomares *et al.*, 2012) et les bactéries (Rodea-Palomares *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2010). L'utilisation d'une nourriture riche en antioxydants lors d'essais standardisés peut donc entraîner un biais en protégeant les

organismes du stress oxydant. Ceci pourrait expliquer l'absence de génotoxicité chez les xénopes lors de ces essais, alors que des effets génotoxiques ont été observés chez les pleurodèles, nourris avec des larves de chironomes non enrichies en antioxydants.

L'utilisation de Tétramin® pour le nourrissage des chironomes, tant pour l'élevage que lors d'essais, peut également entraîner un biais dans des études écotoxicologiques. En effet, cette nourriture contient des quantités importantes de vitamine A (voir annexe 1), source potentielle d'effets tératogènes chez les animaux (Guillonneau et Jacqz-Aigrain, 1997). Le taux basal de malformation chez les larves de chironomes pourrait donc être en partie lié à leur nourriture.

Une autre contrainte des essais normalisés provient de la nature des milieux d'exposition préconisés par les normes. Ces milieux sont adaptés aux espèces considérées et varient donc d'une norme à l'autre. Or, il est maintenant reconnu que le comportement des NP en milieu aqueux dépend grandement de la nature de ce milieu (Baalousha *et al.*, 2013; Chambers *et al.*, 2014; Handy *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2010; Manier *et al.*, 2011; Rodea-Palomares *et al.*, 2011). En effet, la force ionique du milieu joue sur l'agrégation des NP et donc sur leur sédimentation (voir annexe 3). Il serait donc nécessaire que les essais d'écotoxicité des NP soient réalisés dans des milieux de nature identique.

Notre étude nous a menés à tester deux milieux d'exposition lors des essais monospécifiques sur pleurodèle : l'Eau Déionisée Reconstituée (EDR) préparée selon la norme ISO (2006) et l'eau minérale de Volvic®. Afin de déterminer le comportement des NP de CeO_2 dans ces milieux, nous avons dosé et mesuré l'état d'agrégation de NP dans la colonne d'eau au cours du temps (figure 22, résultats complémentaires présentés en annexe 6). La quantité de NP dans la colonne diminue au cours du temps dans les deux milieux et est visiblement plus faible en EDR qu'en Volvic®, indiquant une sédimentation plus importante. L'EDR étant bien plus dure que l'eau de Volvic® (*i.e.* force ionique plus importante), les résultats observés sont en accord avec la littérature. En revanche, aucune toxicité n'a été observée chez le pleurodèle exposé en eau de Volvic®, alors que des effets génotoxiques dose-dépendants ont été mis en évidence en EDR. Ces résultats vont à l'encontre de la plupart des publications, qui reportent une diminution de la toxicité des NP avec l'augmentation de la force ionique du milieu, du fait de l'agrégation des NP (Mwaanga, 2012; Rodea-Palomares *et al.*, 2011; Van Hoecke *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène repose sur le fait que lors des expositions monospécifiques, les larves de pleurodèle restent au fond des cristallisoirs. L'exposition en milieu à force ionique plus grande (*i.e.* EDR) entraîne une sédimentation des NP plus importante et augmenterait donc leur contact avec les pleurodèles, entraînant une plus forte toxicité.

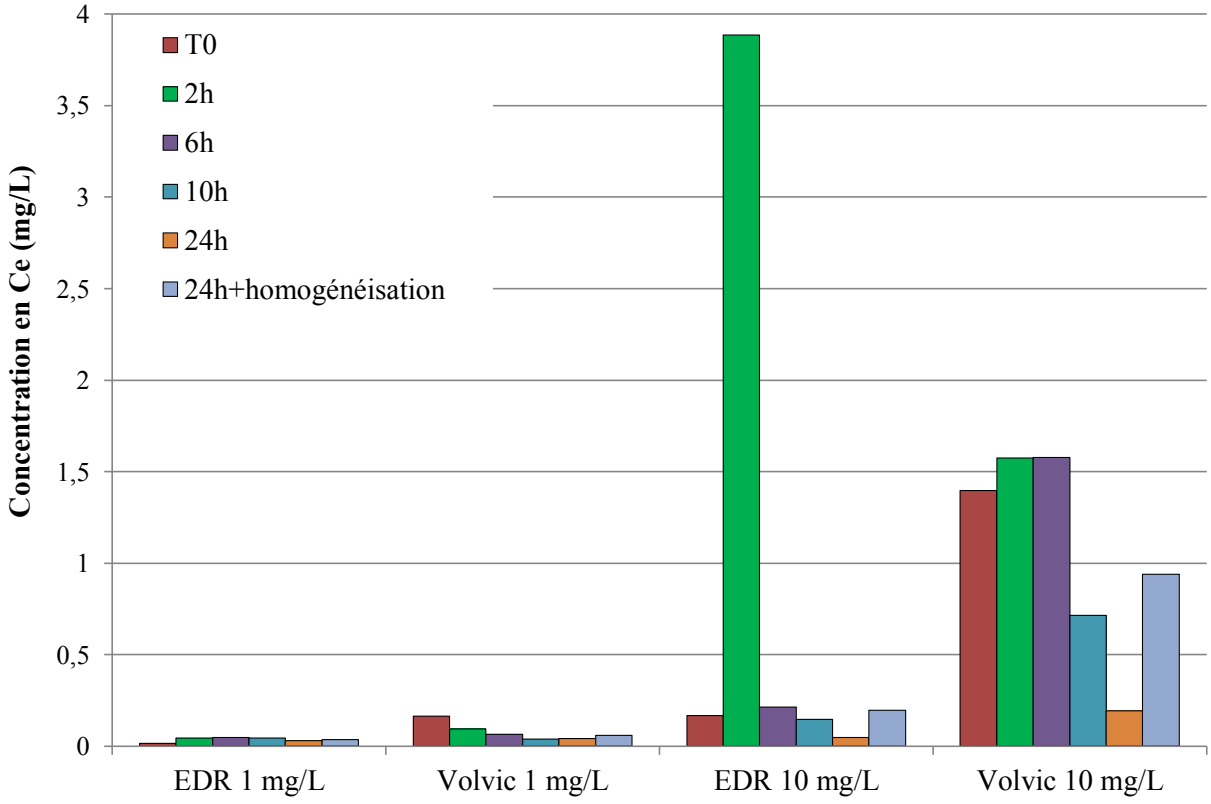


Figure 22 : Concentrations en Ce mesurées au cours du temps dans les milieux contaminés à différentes concentrations initiales de NP (EDR et eau de Volvic®).

La sédimentation rapide des NP lors d'expositions statiques/semi-statiques soulève le problème de la pertinence de telles expositions pour des organismes pélagiques, tels que les daphnies. De plus, toutes les transformations que peuvent subir les NP en milieu complexe sont susceptibles de moduler leur toxicité. De manière plus générale, les tests normalisés sont adaptés à l'évaluation de substances solubles, et leur pertinence pour une évaluation correcte de l'écotoxicité des NP devrait être évaluée de manière systématique. Il serait alors nécessaire que les tests jugés non appropriés à l'évaluation des NP soient modifiés et adaptés aux NP, ou explicitement présentés comme non conformes à l'évaluation de ces contaminants. Notons qu'un groupe de travail a été formé dans ce but, donnant lieu à un rapport de l'OCDE (OECD, 2009). Celui-ci passe en revue 24 tests normalisés concernant les effets sur systèmes biotiques et met en évidence les limites de ces tests dans le cadre d'une évaluation des NP. Cependant, aucune adaptation ou modification concrète de ces tests n'est proposée.

3. Verrous technologiques et conceptuels

3.1 Verrous technologiques liés à l'étude des nanoparticules

3.1.1 Maîtrise de l'exposition

L'expérience de sédimentation évoquée précédemment (figure 22, annexe 6) soulève le problème de la maîtrise de l'exposition aux NP lors des essais. En effet, toutes les concentrations en Ce mesurées dans les milieux sont beaucoup plus faibles que les valeurs attendues, d'un facteur 6 à 70 suivant les concentrations et les milieux. Une bonne maîtrise de l'exposition lors d'essais est fondamentale pour une évaluation pertinente en écotoxicologie. Cependant, de nombreux verrous technologiques limitent actuellement le contrôle des expositions aux NP.

Le premier écueil rencontré lors des expositions concerne la dose de NP effectivement introduite, comme l'illustrent les dosages effectués sur la suspension mère de NP de CeO_2 pour laquelle 2,56 g/L de Ce ont été dosés, au lieu des 8,14 g/L attendus (suspension mère théoriquement à 10 g de CeO_2 /L, soit 8,14 g de Ce /L). Un premier biais pourrait donc venir d'une inadéquation entre les concentrations théoriques et celles effectivement présentes dans les suspensions mère. Il existe notamment une incertitude sur l'état de dispersion d'une suspension au moment de son utilisation, pouvant entraîner un biais lors des prélèvements. En effet, une suspension à l'origine considérée comme homogène peut vite évoluer du fait de l'agrégation des NP et de leur sédimentation (Handy *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2014). Une technique couramment employée pour remédier à ce problème est l'homogénéisation des suspensions par sonication avant d'effectuer les prélèvements. Ceci peut s'effectuer dans un bain ou grâce à une sonde à ultrasons directement plongée dans la suspension. Cependant, ces techniques peuvent elles-mêmes introduire des artefacts lors des essais. En effet, l'utilisation d'ultrasons induit localement de très fortes augmentations de température et de pression pouvant conduire à des modifications de structure des NP (changements de forme, dissolution) et donc en affecter la toxicité (Farré *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2014). De plus, la puissance des sondes à ultrasons entraîne une légère dégradation de leur extrémité, qui conduit à la contamination potentielle de l'échantillon par libération de particules aux propriétés similaires à celles des NP (Betts *et al.*, 2013). Outre l'agrégation des NP, leur stockage, même à court terme, peut également entraîner des phénomènes de dissolution (Handy *et al.*, 2012) ou d'altération de leur enrobage le cas échéant.

Une fois la contamination aux NP effectuée, se pose le problème du maintien de la concentration (Handy *et al.*, 2012). En effet, et comme détaillé précédemment, les NP ont tendance à s'agréger et sédimenter rapidement en milieu aqueux. De plus, les NP peuvent s'adsorber sur toutes les surfaces solides, notamment si celles-ci présentent des imperfections ou sont poreuses, entraînant un risque important de perte d'une certaine quantité de NP sur la verrerie (Handy *et al.*, 2012). L'expérience de sédimentation (figure 22, annexe 6) illustre aussi ce problème : après 24h de sédimentation, le milieu a été homogénéisé afin de remettre en suspension les NP, et un prélèvement du milieu a été effectué directement après homogénéisation. Les quantités de Ce dosées, plus faibles qu'à T0, indiquent une perte de NP, probablement sur les parois du cristallisoir en verre. Handy *et al.* (2012) suggèrent également que les NP peuvent s'adsorber aux sondes utilisées pour le suivi des paramètres physico-chimiques et entraîner des interférences avec les propriétés électrochimiques des solutions ou gels présents dans les sondes. Les valeurs obtenues seraient donc à considérer avec précaution.

3.1.2 Caractérisation de l'exposition

Un autre verrou actuellement important concerne la caractérisation de l'exposition. Le premier niveau de caractérisation est la détermination de la dose effectivement présente dans le milieu. Ainsi que nous l'avons vu avec l'exemple de la concentration en Ce mesurée dans la suspension mère de NP, l'écart entre les concentrations théoriques et les valeurs mesurées peut être important (écart d'un facteur 3,2 dans notre cas). Cet écart peut être dû à des biais rencontrés à plusieurs niveaux.

Le premier, qui se rapproche de celui évoqué pour l'introduction des NP dans le milieu, concerne l'échantillonnage. En effet, étant donné que les suspensions de NP ne sont pas des solutions homogènes, la zone où est effectué le prélèvement est déterminante, notamment dans le cas d'une suspension très hétérogène. Ainsi, il suffit qu'un agrégat important se trouve dans l'échantillon prélevé, ou au contraire que l'échantillon soit particulièrement dépourvu de NP pour qu'il ne soit pas représentatif. C'est notamment sur ce biais que repose la principale hypothèse avancée pour expliquer le point observé à 2h en EDR contaminée à 10 mg/L (figure 22). La très forte concentration, par comparaison aux autres valeurs, peut être due à la présence d'un agrégat de NP dans l'échantillon prélevé pour le dosage.

Le dosage des NP (dosage du Ce dans notre cas), effectué par ICP, nécessite une attaque acide des NP avant analyse. Les méthodes classiques d'attaque employées pourraient ne pas être totalement appropriées. La méthode utilisée pour les NP de CeO_2 consiste en une attaque

à l'acide nitrique (HNO_3 à 2%). Cependant, les dosages effectués dans la suspension mère ne sont pas en adéquation avec la concentration théorique attendue. Durant plusieurs années, le dosage de NP de TiO_2 a été réalisé suite à une attaque à l'acide nitrique (Galloway *et al.*, 2010; McShane *et al*., 2012). Ce n'est que plus récemment qu'il a été montré que seule une attaque par un mélange d'acides nitrique et fluorhydrique permettait une meilleure mise en solution du titane (Krystek *et al*., 2014). Il se peut donc que la méthode d'attaque retenue ne soit pas parfaitement adaptée aux NP de CeO_2 que nous avons étudiées.

Un autre biais dans le dosage des NP pourrait provenir de l'appareillage utilisé. En effet, il se peut que les équipements classiques d'ICP ne soient pas adaptés à l'analyse des NP. Une méthode d'analyse par ICP a notamment été développée spécifiquement pour l'étude des NP (Laborda *et al.*, 2014), et permet la détection de chaque particule de manière individuelle (technique de « Single Particle ICP-MS » ; SP-ICP-MS). Ces avancées récentes tendent à montrer que les marges de progrès sont importantes en termes d'équipement pour la caractérisation des NP.

La caractérisation de l'exposition comprend également la détermination du devenir des NP, notamment leur état d'agrégation. Pour cela, on mesure classiquement le potentiel zêta des NP ainsi que leur diamètre hydrodynamique, par DLS. Ces techniques ne sont cependant pas appropriées aux études en milieu complexe du fait de la présence de nombreux autres objets pouvant interférer lors de la mesure, dont des débris cellulaires, des colloïdes organiques ou encore des particules de sédiment en suspension. En outre, la méthode de DLS est basée sur le coefficient de diffusion et le mouvement brownien des NP. Une interprétation correcte des résultats de DLS nécessite donc la connaissance précise des caractéristiques des NP, ce qui ne peut pas être le cas lorsque celles-ci évoluent en milieu complexe (Handy *et al.*, 2012). De plus, si la méthode de DLS est une méthode puissante pour des suspensions homogènes, elle n'est pas fiable pour des échantillons polydisperses (Rosenkranz *et al.*, 2012). Ceci pourrait alors expliquer les résultats a priori aberrants obtenus lors de la mesure du diamètre hydrodynamique des NP lors de l'expérience présentée en annexe 6. En effet, celle-ci a été effectuée sur le lot de NP de CeO_2 cubiques, qui présente plusieurs populations de tailles.

Enfin, un autre verrou important concerne la caractérisation des NP dans les matrices biologiques. La détection par MET des NP dans les organismes n'est pas aisée, particulièrement à de faibles concentrations d'exposition. Les observations effectuées en MET au niveau des branchies et de l'intestin des larves de pleurodèle (*cf.* chap. IV, part. 3) n'ont pas permis de détecter la présence de NP dans ces tissus, malgré les concentrations non négligeables de NP dosées dans les organismes (environ 10 mg/kg). Ces deux organes ont été

sélectionnés car ils représentent les deux premières voies d'entrée des NP dans l'organisme : voie directe par filtration dans le cas des branchies et voie trophique dans le cas de l'intestin. Les coupes effectuées dans les tissus biologiques pour des analyses en MET étant très fines (50 – 90 nm), la probabilité qu'une NP isolée ou un agrégat de NP se trouve dans la section réalisée est extrêmement faible, et la quantité de sections à analyser par organisme devrait par conséquent être considérable. De plus, les NP pouvant subir des transformations morphologiques dans les organismes ou avant leur entrée dans les organismes, l'expérimentateur ne sait pas par avance ce qu'il cherche, ou peut voir des NP sans pour autant en avoir conscience, influencé par la forme des NP qu'il s'attend à voir. Ce problème rend l'analyse extrêmement lourde. Ainsi, au vu du temps nécessaire et du coût des analyses en MET, cette méthode ne semble pas adaptée à une analyse en routine. Par ailleurs, des artefacts peuvent provenir de la présence de cristaux non métalliques, tels que des cristaux de silice provenant du sédiment, et un couplage à une analyse chimique des éléments doit être systématique. Plusieurs auteurs affirment entre autre que l'utilisation de la MET n'est pas adaptée aux applications environnementales (Baalousha *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2011).

D'autres techniques permettent de caractériser les NP dans les matrices biologiques, telles que la micro ou la nano-tomographie. La tomographie, basée sur la détection des éléments selon leur densité, nécessite également un couplage à une analyse chimique de la nature des éléments. De plus, il est nécessaire de mettre au point des techniques de préparation des échantillons en vue de leur conservation durant l'analyse. Il est également possible de déterminer la spéciation des NP (par exemple l'état d'oxydation du Ce) dans les organismes, par spectroscopie d'absorption des rayons X. Cette technique nécessite une source de rayons X très importante, fournie en synchrotron. Ces analyses par tomographie ou en synchrotron sont très puissantes mais très lourdes à mettre en œuvre, et ne permettent pas non plus une utilisation en routine. De plus, ces équipements, comme beaucoup d'outils de caractérisation des NP, sont coûteux et donc peu souvent disponibles dans les laboratoires (particulièrement dans le cas de la nano-tomographie et des synchrotrons, équipements rares au niveau européen), et nécessitent un savoir-faire important (Handy *et al.*, 2008).

Il apparait donc que la caractérisation des NP dans les matrices naturelles est actuellement un verrou majeur, du fait de techniques non adaptées aux matrices environnementales, lourdes à mettre en œuvre, coûteuses en temps et en moyens financiers, et qui nécessitent un savoir-faire important.

3.1.3 Incertitudes sur l'origine des effets observés

L'origine des effets observés est une question primordiale lors de l'évaluation écotoxicologique des NP. En effet, lors de l'exposition à des NP, il est difficile de distinguer la toxicité due aux NP elles-mêmes de l'influence de leur dissolution partielle, de leur enrobage le cas échéant, ou encore de l'impact d'impuretés potentiellement présentes dans les suspensions mère. Petersen *et al.* (2014) suggèrent donc qu'il serait plus pertinent de considérer l'ensemble {NP ; enrobage ; ions libérés ; impuretés} lors d'essais écotoxicologiques, plutôt que de considérer les effets observés comme dus aux NP uniquement.

De plus, lors de l'évaluation de NP, il convient de comparer les effets observés à ceux obtenus en présence du même matériau à l'état non-nanoparticulaire. Cependant, pour que cette comparaison soit exacte, il faudrait que les deux matériaux testés, nanoparticulaire ou non, possèdent exactement les mêmes caractéristiques, mise à part leur taille. Or ceci s'avère pratiquement impossible dans les faits, comme le soulignent Handy *et al.* (2012). De la même façon, la détermination de l'influence d'un paramètre en particulier sur la toxicité des NP, tel que l'aire de surface par exemple, nécessiterait de comparer des NP aux propriétés strictement similaires, excepté le paramètre étudié, ce qui semble a priori difficile à mettre en œuvre.

3.2 Verrous conceptuels pour l'évaluation du risque des nanoparticules

Un des objectifs de cette étude est d'appréhender le passage d'une évaluation écotoxicologique à l'échelle d'essais en laboratoire, à une évaluation à une échelle de complexité supérieure grâce à l'étude d'un système complexe en microcosme. L'objectif final, qui se situe au-delà de cette étude, est de fournir des outils pertinents pour l'évaluation du risque environnemental des NP. Pour cela, il est nécessaire de déterminer dans quelle mesure ces expériences sont extrapolables aux milieux naturels. Il convient donc de s'interroger sur (i) la pertinence des expositions standardisées et des expositions en microcosme ; (ii) les verrous technologiques présents et comment les dépasser ; et (iii) la pertinence des paramètres biologiques étudiés dans une perspective d'évaluation du risque. Les deux premiers points sont l'objet de la discussion menée précédemment. Pour répondre au dernier point, une hiérarchisation des différents paramètres de toxicité observés est nécessaire. Cette démarche soulève donc d'autres questions :

- En quoi un paramètre étudié sur une espèce est-il représentatif de l'écosystème auquel appartient cette espèce ?

- Des paramètres de toxicité précoce sur une espèce sont-ils plus pertinents que des paramètres étudiés à l'échelle d'une population ou d'une communauté ?

- Quelles sont les espèces dont la disparition impacterait le plus un écosystème ?

- Dans le cas de notre étude, en quoi la mortalité ou les effets génétiques chez les pleurodèles sont-ils plus prédictifs du danger des NP sur un écosystème que des modifications des communautés bactériennes ou une diminution de la décomposition de la litière ?

Ces questions, non exhaustives, n'ont actuellement pas de réponse bien définie et une réflexion approfondie sur ce sujet est encore nécessaire. Cela permettrait notamment une hiérarchisation des paramètres biologiques étudiés en terme de pertinence au niveau environnemental, et donc la sélection ou le développement d'outils pertinents pour l'évaluation du risque des nanoparticules.

Références bibliographiques

Arsuffi, T.L., Suberkropp, K., 1989. Selective feeding by shredders on leaf-colonizing stream fungi: comparison of macroinvertebrate taxa. Oecologia 79, 30–37. doi:10.1007/BF00378236

Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., Rose, J., 2014. Long-term aging of a CeO2 based nanocomposite used for wood protection. Environ. Pollut. 188, 1–7. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.016

Baalousha, M., Nur, Y., Römer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. Sci. Total Environ. 454-455, 119–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.093

Betts, J.N., Johnson, M.G., Rygiewicz, P.T., King, G.A., Andersen, C.P., 2013. Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 32, 889–893. doi:10.1002/etc.2123

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. J. Hazard. Mater. In press.

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

Chambers, B.A., Afrooz, A.R.M.N., Bae, S., Aich, N., Katz, L., Saleh, N.B., Kirisits, M.J., 2014. Effects of Chloride and Ionic Strength on Physical Morphology, Dissolution, and Bacterial Toxicity of Silver Nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 48, 761–769. doi:10.1021/es403969x

Culcasi, M., Benameur, L., Mercier, A., Lucchesi, C., Rahmouni, H., Asteian, A., Casano, G., Botta, A., Kovacic, H., Pietri, S., 2012. EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. Chem. Biol. Interact. 199, 161–176. doi:10.1016/j.cbi.2012.08.007

Farré, M., Gajda-Schrantz, K., Kantiani, L., Barceló, D., 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. Anal. Bioanal. Chem. 393, 81–95. doi:10.1007/s00216-008-2458-1

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114.

Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine

polychaete. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 158, 1748–1755. doi:10.1016/j.envpol.2009.11.013

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano 6, 3745–3759. doi:10.1021/nn204671v

Gessner, M.O., Chauvet, E., 1994. Importance of Stream Microfungi in Controlling Breakdown Rates of Leaf Litter. Ecology 75, 1807–1817. doi:10.2307/1939639

Guillonneau, M., Jacqz-Aigrain, E., 1997. Les effets tératogènes de la vitamine A et de ses dérivés. Arch. Pédiatrie 4, 867–874. doi:10.1016/S0929-693X(97)88158-4

Handy, R.D., van den Brink, N., Chappell, M., Mühling, M., Behra, R., Dušinská, M., Simpson, P., Ahtiainen, J., Jha, A.N., Seiter, J., Bednar, A., Kennedy, A., Fernandes, T.F., Riediker, M., 2012. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? Ecotoxicol. Lond. Engl. 21, 933–972. doi:10.1007/s10646-012-0862-y

Handy, R.D., von der Kammer, F., Lead, J.R., Hassellöv, M., Owen, R., Crane, M., 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicol. Lond. Engl. 17, 287–314. doi:10.1007/s10646-008-0199-8

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Ispas, C., Andreescu, D., Patel, A., Goia, D.V., Andreescu, S., Wallace, K.N., 2009. Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish. Environ. Sci. Technol. 43, 6349–6356. doi:10.1021/es9010543

Ivana Celardo, M.D.N., 2011. Ce^3 ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. ACS Nano 5, 4537–49. doi:10.1021/nn200126a

Jabiol, J., McKie, B.G., Bruder, A., Bernadet, C., Gessner, M.O., Chauvet, E., 2013. Trophic complexity enhances ecosystem functioning in an aquatic detritus-based model system. J. Anim. Ecol. 82, 1042–1051. doi:10.1111/1365-2656.12079

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967. doi:10.1021/es902987d

Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., Self, W.T., 2007. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. Chem. Commun. 1056–1058. doi:10.1039/B615134E

Krystek, P., Tentschert, J., Nia, Y., Trouiller, B., Noël, L., Goetz, M.E., Papin, A., Luch, A., Guérin, T., de Jong, W.H., 2014. Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by

inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 406, 3853–3861. doi:10.1007/s00216-013-7580-z

Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J., 2014. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. Anal. Chem. 86, 2270–2278. doi:10.1021/ac402980q

Lagauzère, S., Boyer, P., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of Chironomus riparius larvae (Insecta, Diptera) and Tubifex tubifex worms (Annelida, Tubificidae). Chemosphere 76, 324–334. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.062

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70. doi:10.1016/j.envpol.2013.04.040

Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests. J. Phys. Conf. Ser. 304, 012058. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012058

McShane, H., Sarrazin, M., Whalen, J.K., Hendershot, W.H., Sunahara, G.I., 2012. Reproductive and behavioral responses of earthworms exposed to nano-sized titanium dioxide in soil. Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 184–193. doi:10.1002/etc.714

Mwaanga, P., 2012. The Behavior and Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Aqueous Solution. Dissertation. Clemson University.

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science 311, 622–627. doi:10.1126/science.1114397

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environ. Health Perspect. 113, 823–839. doi:10.1289/ehp.7339

OECD, 2009. Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No 15.

Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06

Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R., Brown, S.D., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Effects of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles on Bacterial Growth and Viability. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7981–7989. doi:10.1128/AEM.00650-10

Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements. Environ. Sci. Technol. 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999

Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. 398, 613–650. doi:10.1007/s00216-010-3881-7

Poulsen, M., Kofoed, M.V.W., Larsen, L.H., Schramm, A., Stief, P., 2014. Chironomus plumosus larvae increase fluxes of denitrification products and diversity of nitrate-reducing bacteria in freshwater sediment. Syst. Appl. Microbiol. 37, 51–59. doi:10.1016/j.syapm.2013.07.006

Preda, G., Migani, A., Neyman, K.M., Bromley, S.T., Illas, F., Pacchioni, G., 2011. Formation of Superoxide Anions on Ceria Nanoparticles by Interaction of Molecular Oxygen with Ce3+ Sites. J. Phys. Chem. C 115, 5817–5822. doi:10.1021/jp111147y

Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., García-Calvo, E., Santiago, J., Rosal, R., 2011. Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO2 nanoparticles using two aquatic micro-organisms. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. 119, 135–145. doi:10.1093/toxsci/kfq311

Rodea-Palomares, I., Gonzalo, S., Santiago-Morales, J., Leganés, F., García-Calvo, E., Rosal, R., Fernández-Piñas, F., 2012. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 122-123, 133–143. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.005

Rogers, N.J., Franklin, N.M., Apte, S.C., Batley, G.E., Angel, B.M., Lead, J.R., Baalousha, M., 2010. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO2 in freshwater. Environ. Chem. 7, 50. doi:10.1071/EN09123

Rosenkranz, P., Fernández-Cruz, M.L., Conde, E., Ramírez-Fernández, M.B., Flores, J.C., Fernández, M., Navas, J.M., 2012. Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: An assessment of cytotoxicity and methodology. Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA 26, 888–896. doi:10.1016/j.tiv.2012.04.019

Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Barathmanikanth, S., Gurunathani, S., 2012. Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. Nanosci. Methods 1, 56–77. doi:10.1080/17458080.2010.547878

Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. Transfer, transformation, and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b

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

Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A.R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO2 nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (Raphanus sativus) seedlings. J. Hazard. Mater. 263 Pt 2, 677–684. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.030

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K.A.C., Van der Meeren, P., Smagghe, G., Janssen, C.R., 2011. Aggregation and ecotoxicity of CeO2 nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. Environ. Pollut. 159, 970–976. doi:10.1016/j.envpol.2010.12.010

Weinberg, H., Galyean, A., Leopold, M., 2011. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. TrAC Trends Anal. Chem. 30, 72–83. doi:10.1016/j.trac.2010.09.006

Xu, M., Li, J., Iwai, H., Mei, Q., Fujita, D., Su, H., Chen, H., Hanagata, N., 2012. Formation of Nano-Bio-Complex as Nanomaterials Dispersed in a Biological Solution for Understanding Nanobiological Interactions. Sci. Rep. 2. doi:10.1038/srep00406

Yang, X., Gondikas, A.P., Marinakos, S.M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2012. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in Caenorhabditis elegans. Environ. Sci. Technol. 46, 1119–1127. doi:10.1021/es202417t

Yeager, P.E., Foreman, C.L., Sinsabaugh, R.L., 2001. Microbial community structure and function in response to larval chironomid feeding pressure in a microcosm experiment. Hydrobiologia 448, 71–81. doi:10.1023/A:1017504114692

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2011. Nano-CeO2 Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 45, 3725–3730. doi:10.1021/es103309n

Conclusions et Perspectives

Ce travail de thèse visait à évaluer l'écotoxicité de NP de CeO_2 en milieu aquatique d'eau douce. Une première approche a consisté à exposer aux NP des espèces représentatives de différents niveaux trophiques (*i.e.* diatomées, larves de chironomes et d'amphibiens), en conditions monospécifiques normalisées. Une seconde approche visait à étudier les NP de CeO_2 à une échelle de complexité supérieure, sur une chaîne trophique expérimentale. Pour cela, l'utilisation de microcosmes a permis l'exposition simultanée des espèces dans un système autosuffisant en termes de nourrissage des organismes.

Ces travaux ont montré que les conditions d'exposition influencent de manière importante la toxicité observée chez les organismes. En effet, une toxicité accrue a été mise en évidence chez les larves de pleurodèle exposées en microcosme, en termes de mortalité et de génotoxicité. Ce phénomène est attribué à des interactions complexes entre les NP et les organismes et/ou le milieu d'exposition. Les microcosmes présentent en effet les conditions requises pour (i) des modifications des NP en termes de spéciation et de dissolution, et (ii) des phénomènes de toxicité secondaire qui pourraient être dus au compartiment microbien. De plus, la durée des expositions en microcosme permet l'observation de phénomènes à long terme. Ces conditions ne sont en revanche pas présentes lors des expositions monospécifiques. L'utilisation de microcosmes a permis de mettre en évidence un transfert des NP de CeO_2 le long de la chaîne trophique, et des effets à différents niveaux de l'écosystème expérimental. Ainsi, comme indiqué précédemment, une importante toxicité a été observée chez les larves de pleurodèle, maillon supérieur de la chaîne trophique étudiée. Des effets ont également été mis en évidence à des échelles d'organisation supérieures, avec des modifications des communautés bactériennes observées en présence des NP. Enfin, des impacts à l'échelle du fonctionnement de ce micro-écosystème ont été mis en évidence grâce à des marqueurs fonctionnels, tels que la décomposition de la litière. Une inhibition de la décomposition de la litière dans l'environnement pourrait conduire à une diminution du taux de carbone organique dissous, élément de base pour l'alimentation d'un grand nombre d'espèces aquatiques. L'étude de NP de CeO_2 de natures différentes en termes de forme, de taille et d'enrobage, a également permis de mettre en évidence des effets différents suivant le type de NP, soulignant ainsi l'importance de leurs caractéristiques intrinsèques en termes de toxicité.

L'ensemble de ces résultats apporte donc des réponses aux questions que nous nous sommes initialement posées. Si les bio-essais monospécifiques permettent de mettre en évidence de manière rapide des effets toxiques des NP de CeO_2 chez les organismes isolés, ils ne permettent cependant pas de prendre en compte le comportement et les effets des NP en

milieux biologiques complexes, plus représentatifs des conditions environnementales. L'utilisation de microcosmes permet quant à elle une évaluation plus fine de l'écotoxicité des NP de CeO_2. Cet outil permet en effet de prendre en compte les interactions directes et indirectes qui ont lieu entre les différentes espèces, et permet par conséquent d'observer des effets liés à ces interactions, à différents niveaux d'organisation du système. Cette méthode d'évaluation est cependant moins aisée à mettre en œuvre et limite la maîtrise du système par l'expérimentateur. La comparaison directe des effets observés suivant les différents outils utilisés (*i.e.* essais monospécifiques ou microcosmes) n'est en aucun cas possible, les conditions d'exposition étant trop différentes (organismes présents, méthode de contamination aux NP, renouvellement du milieu, *etc.*). En revanche, les différentes méthodes d'exposition employées représentent des approches complémentaires en termes d'évaluation du risque, et permettent notamment d'appréhender des mécanismes impliqués dans la toxicité des NP de CeO_2. Malgré les informations que ces expositions apportent, l'extrapolation des résultats obtenus dans nos conditions d'étude aux conditions environnementales réelles semble peu appropriée, les milieux naturels présentant un niveau de complexité bien supérieur à celui présentement étudié. Il apparait donc que si ces travaux de thèse ont mis en évidence tout l'intérêt et l'importance des expositions en système complexe, ils ne permettent actuellement pas une évaluation pertinente et complète du risque environnemental lié aux NP de CeO_2, notamment du fait de multiples verrous technologiques. En revanche, ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives et pistes de réflexion sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité des NP.

Il serait intéressant en premier lieu de réaliser des analyses complémentaires afin de vérifier les différentes hypothèses formulées au cours de ces travaux, concernant (i) la spéciation des NP tout au long de leur parcours jusqu'à l'organisme/organe cible ; (ii) l'impact de différentes formes de cérium sur les espèces étudiées ; (iii) le rôle des micro-organismes dans la toxicité observée en microcosme.

Ainsi, l'étude de la spéciation des NP de CeO_2 pourrait être effectuée dans l'eau et le sédiment des microcosmes ; au contact direct avec les organismes ; dans le tube digestif des larves de chironome ; et dans différents organes chez le pleurodèle, notamment le foie, au sein duquel ont lieu de nombreuses réactions métaboliques. Ceci permettrait de savoir sous quelle forme les NP atteignent leur organisme/organe cible, et quelles matrices sont impliquées dans leur transformation, le cas échéant.

L'exposition des organismes à du CeO_2 non nanoparticulaire permettrait de déterminer l'implication du caractère « nano » dans la toxicité des NP. De même, l'exposition à du

cérium ionique sous forme de Ce^{3+} ($CeCl_3$ par exemple) ou Ce^{4+} ($Ce(SO_4)_2$ par exemple) permettrait d'étudier la toxicité des ions potentiellement libérés dans le milieu.

Enfin, plusieurs pistes peuvent être envisagées pour déterminer le rôle des micro-organismes dans la toxicité observée en microcosme. Tout d'abord, l'étude des espèces bactériennes affectées par les NP, couplée à des analyses fonctionnelles de l'expression des gènes impliqués dans les grands cycles (*i.e.* azote, carbone, *etc.*), permettrait de déterminer si certaines grandes fonctions sont impactées, ce qui permettrait de prédire les conséquences de la présence de ces NP sur le fonctionnement d'un écosystème. Il serait également intéressant d'étudier la production de métabolites secondaires par les micro-organismes suite à l'exposition aux NP de CeO_2, et de tester la toxicité de ces composés vis-à-vis des pleurodèles.

Outre la vérification des hypothèses formulées, d'autres analyses permettraient d'approfondir la compréhension des mécanismes de toxicité. Ainsi, des études biochimiques permettraient de déterminer des réponses de stress oxydant, potentiellement impliquées dans les effets génotoxiques, ou encore les impacts sur le métabolisme énergétique des organismes.

Une autre perspective est l'étude de l'internalisation des NP, afin de connaître les organes dans lesquels s'accumulent préférentiellement les NP et déterminer si une internalisation cellulaire a lieu.

Un volet essentiel de l'étude des NP est la détermination des phénomènes ayant lieu à l'interface « nano-bio » (*i.e.* entre les NP et les organismes et/ou des molécules organiques, telles que des protéines, toxines, exopolysaccharides, *etc.*). Actuellement, de telles études sont majoritairement réalisées *in vitro*, dans le domaine de la toxicologie. Leur transfert dans le domaine de l'écotoxicologie serait un atout important dans la compréhension des mécanismes physiologiques à l'origine de la toxicité des NP.

Enfin, l'utilisation d'outils statistiques et de modélisation intégrant l'ensemble des effets observés dans différentes conditions d'exposition, sur différentes espèces, voire sur des NP de nature différente, permettrait d'identifier des indicateurs discriminants et pertinents pour l'évaluation du risque environnemental des NP. Cette dernière perspective représente notamment l'objectif final du projet MESONNET, dans le cadre duquel ces travaux de thèse ont été réalisés.

La connaissance du comportement des NP en conditions représentatives des milieux naturels et la compréhension de l'ensemble des réactions/interactions complexes qui ont lieu au contact des organismes sont la clé de la compréhension des mécanismes de toxicité des NP. La connaissance de ces mécanismes permettrait une évaluation pertinente du risque

environnemental des NP, qui serait alors un appui solide pour un encadrement législatif de la production et de l'utilisation des nanomatériaux. Il peut également être envisagé que la connaissance des mécanismes de toxicité ouvrent de nouvelles pistes de recherche pour la synthèse de NP non toxiques, afin de permettre aux sociétés de bénéficier des possibilités et progrès techniques qu'offrent les NP, tout en limitant leur impact environnemental.

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture / d'élevage et de la nourriture des organismes

1. **Composition du milieu de culture pour diatomées CHU-10 basique** (Canadian Phycological Culture Centre)

Eléments	Composition finale (mg/L)
$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$	60
$MgSO_4$ $7H_2O$	25
K_2HPO_4	10
Na_2CO_3	20
Na_2SiO_3 $5H_2O$	60
H_3BO_3	2,86
Fe-EDTA	5
$MnSO_4$, H_2O	1,5
$CuSO_4$, $5H_2O$	0,8
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,22
$Co(NO_3)_2$, $6H_2O$	0,05
Na_2MoO_4, $2H_2O$	0,39
Biotine (B7) : $C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,01
Vitamine B12 : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	0,005
Thiamine HCl : $C_{12}H_{17}CIN_4OS$, HCL	0,00055

2. **Composition du milieu d'élevage et d'exposition de *Chironomus riparius*** (AFNOR, 2004)

Eléments	Composition finale (mg/L)
$CaCl_2$, $2H_2O$	66,2
$MgSO_4$, $7H_2O$	61,4
$NaHCO_3$	96
KCl	4
$CaSO_4$, $2H_2O$	63
NaBr	1

3. Composition du milieu d'exposition de *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl.* (AFNOR, 2000; ISO, 2006)

Eléments	Composition finale (mg/L)
$CaCl_2$, $2H_2O$	294
$MgSO_4$, $7H_2O$	123,25
$NaHCO_3$	64,75
KCl	5,75

4. Composition de l'eau minérale de Volvic®

Les données suivantes sont celles indiquées sur le produit commercial :

Eléments	Composition finale (mg/L)
Calcium	11,5
Magnésium	8,0
Sodium	11,6
Potassium	6,2
Chlorures	13,5
Nitrates	6,3
Sulfates	8,1
Silice	31,7
Bicarbonates	71,0
Minéralisation totale (résidus à sec à 180°C)	130
Autre : pH 7	

5. Composition des flocons de TetraMin®

Les données suivantes sont celles indiquées sur le produit commercial :

Composition : Poissons et sous-produits de poissons, céréales, levures, extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucres, substances minérales.

Constituants analytiques :

Eléments	Quantité
Protéine brute	47,0 %
Matières grasses brutes	8,5 %
Cellulose brute	2,0 %
Teneur en eau	6,0 %
Vitamine A	31220 UI/kg
Vitamine D3	1717 UI/kg
Manganèse (E5)	96 mg/kg
Zinc (E6)	57 mg/kg
Fer (E1)	37 mg/kg
Cobalt (E3)	0,7 mg/kg
Colorants	n.d.[1]
Antioxygènes	n.d.[1]

[1]n.d. : non déterminé

6. Composition analytique des flocons de Tétraphyll®

Les données suivantes sont celles indiquées sur le produit commercial :

Composition : Poissons et sous-produits de poissons, céréales, levures, extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucres, substances minérales.

Constituants analytiques :

Eléments	Quantité
Protéine brute	47,0 %
Matières grasses brutes	10,0 %
Cellulose brute	3,0 %
Teneur en eau	6,0 %
Vitamine A	37600 UI/kg
Vitamine D3	2000 UI/kg
Manganèse (E5)	96 mg/kg
Zinc (E6)	57 mg/kg
Fer (E1)	37 mg/kg
Cobalt (E3)	0.7 mg/kg
Colorants	n.d.[1]
Antioxygènes	n.d.[1]

[1] n.d. : non déterminé

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Canadian Phycological Culture Centre. CHU-10 (Modified by J. Acreman, CPCC) https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/chu-10 Consulté le 09/08/14.

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Annexe 2

Elevage de *Chironomus riparius* au sein du laboratoire EcoLab

1. Elevage

L'élevage est réalisé au laboratoire EcoLab sur le site de l'ENSAT, d'après les recommandations des normes Environnement Canada (1997) et AFNOR (2004) relative à la détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de *C. riparius*. La souche initiale provient de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE, Vaulx-en-Velin, France). L'élevage comprend plusieurs aquariums d'une capacité de 20 litres, situés dans une pièce acclimatée à 21 ± 1°C et soumise à une photopériode de 16h. Chaque aquarium contient une couche de sable de Fontainebleau d'une épaisseur de 3 ou 4 cm, et est rempli de milieu de culture adapté à l'élevage de chironomes (annexe 1). Les aquariums sont surmontés d'un couvercle de même dimension que l'aquarium permettant le vol et l'accouplement des adultes. De plus, ce couvercle est muni de glissières à sa base, permettant de glisser un support solide lors de l'entretien des aquariums et d'éviter ainsi la dispersion des adultes. L'aération du milieu est assurée par un tuyau souple relié à une pompe. Le bullage est régulier et léger, celui-ci ne devant créer trop de remous à la surface ni dans le sable. L'apport de nourriture consiste en 400 mg de nourriture pour poisson (Tétramin®, composition analytique présentée en annexe 1) par aquarium, tous les jours ouvrés. Les flocons de Tétramin® sont préalablement broyés et dispersés par ultra-sons (bain à ultra-sons Bioblock 89863 572 HF, Freq. 35 kHz, I : 0,73 , Af : 50/60 HZ) dans du milieu de culture. La solution ainsi obtenue (40 g/L) est alors conservée à 4°C pendant un maximum de 5 jours.

Les aquariums sont initialement ensemencés avec 2 masses d'œufs ayant éclos et placées au préalable pendant 48h dans un cristallisoir contenant 1L de milieu de culture, une fine couche de sable et 150 mg de nourriture. Les premiers adultes apparaissent au bout de deux semaines environ. Les exuvies et les masses d'œufs non récupérées sont alors retirées de l'aquarium tous les deux jours. Cet entretien permet de récupérer des masses d'œufs âgées de 48h maximum, et n'ayant donc a priori aucun retard d'éclosion, signe potentiel de mauvaise qualité de la ponte. Une à deux masses peuvent être laissées de temps en temps (10 – 20 jours) dans l'aquarium afin de permettre un réensemencement naturel. Le milieu est renouvelé au deux-tiers lorsque celui-ci devient trop turbide ou lorsqu'un retard (ou absence) d'émergence est observé.

2. Obtention des larves avant exposition

Quatre à cinq jours avant le début des expériences, toutes les masses présentes en aquarium d'élevage sont récupérées et placées individuellement en pilulier contenant du milieu de culture. Les masses ayant éclos le même jour sont gardées et placées en cristallisoir comme décrit précédemment, à raison de deux à quatre masses par cristallisoir. Cette technique permet de réaliser des expositions de larves du même âge (décalage inférieur à 24h) et donc de s'affranchir du biais de l'âge des larves. 48h après éclosion, les jeunes larves sont récupérées à l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire. L'obtention de masses d'œufs étant plus probable suite à une première vague d'émergence, il est conseillé d'ensemencer un aquarium manuellement une vingtaine de jours avant la date prévue de l'expérience.

Références bibliographiques

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

Annexe 3

Stabilité d'une suspension de nanoparticules : forces impliquées, théories explicatives et principes de mesures.

Cette annexe a pour but de fournir les notions de base concernant la stabilité des suspensions de NP, sans pour autant détailler l'ensemble des paramètres impliqués dans les mécanismes d'agrégation des NP / stabilisation des suspensions (source : Handy *et al*., 2008).

1. Caractéristiques des NP en milieu aqueux

Les NP dispersées en milieu aqueux forment une dispersion colloïdale. Les principes qui gouvernent la chimie des colloïdes s'appliquent donc aux suspensions de NP.

En milieu aqueux, une particule chargée s'entoure d'ions de charge opposée, adsorbés à la surface de la particule et donc immobiles. Ces contre-ions forment la couche de Stern. Une seconde couche, dite diffuse, est composée d'ions mobiles au voisinage de la particule et affectés par le champ électrique généré par la particule chargée (figure 1). La couche de Stern et la couche diffuse forment la Double Couche Electrique (DCE). Cette couche est à l'origine de forces répulsives à longue portée : elles peuvent agir sur de grandes distances (quelques centaines d'Å).

Parmi les ions de la couche diffuse, certains ions les plus proches de la particule, bien que non adsorbés à la surface, suivent la particule dans ses mouvements au sein de la suspension. Ils forment une sous-couche au sein de la DCE dont la limite est appelée plan de cisaillement.

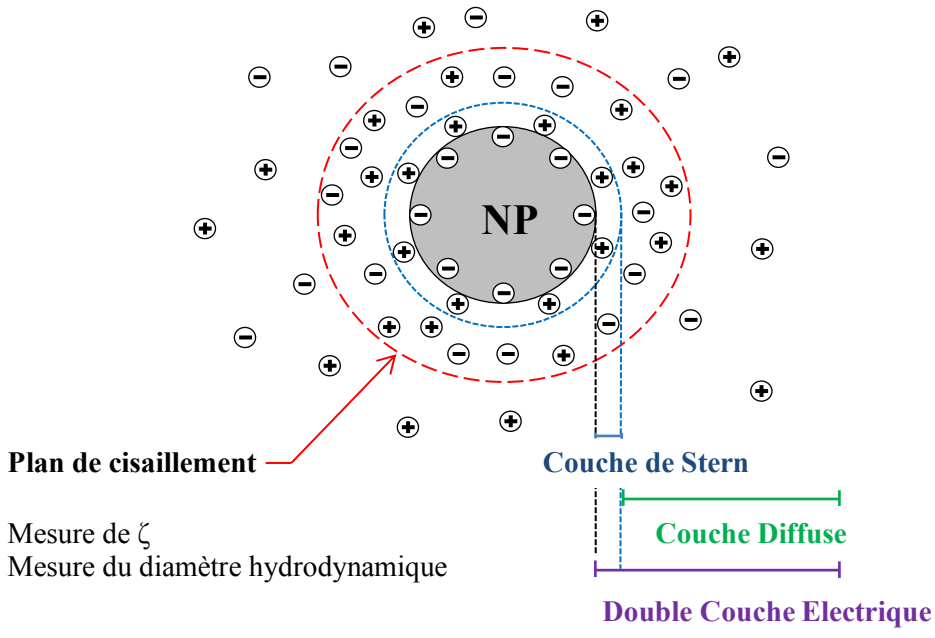


Figure 1 : Représentation schématique de la Double Couche Electrique et du plan de cisaillement.

2. Stabilité des NP en milieux aqueux

Une dispersion peut être thermodynamiquement instable, tout en étant cinétiquement stable. C'est-à-dire que des flux d'énergie sont présents dans le système et les particules sont en mouvement permanent (instabilité thermodynamique), mais ne s'agrègent pas et restent en suspension sur le long terme (stabilité cinétique). En chimie des colloïdes, une dispersion stable décrit donc un milieu aqueux dans lequel les particules sont soumises au mouvement Brownien et entrent en collision, mais ne s'agrègent pas suite à ces collisions.

L'agrégation des particules dépend des forces en actions, qui peuvent être répulsives ou attractives et agissent à des distances différentes. Les forces considérées sont généralement la répulsion de Borne, le potentiel de DCE (force répulsive de longue portée) et les forces de Van der Waals (forces électromagnétiques faibles, attractives de courte portée), prises en compte dans la théorie étendue de DLVO. Cette théorie, nommée d'après ses fondateurs Derjaguin et Landau (1941) puis Verwey et Overbeck (1948), indique que l'interaction entre deux particules est gouvernée par la somme des forces précédemment citées. Si la force résultante est attractive, les particules s'agrègent. Cette force est hautement dépendante de la distance entre les particules (figure 2). Ainsi, si le potentiel de DCE (répulsif) diminue, les particules peuvent se rapprocher l'une de l'autre et être affectées par les forces de Van der Waals (attractives) qui n'agissent qu'à faible distance. Si les forces attractives deviennent supérieures aux forces répulsives, la collision de deux particules peut alors entraîner leur agrégation.

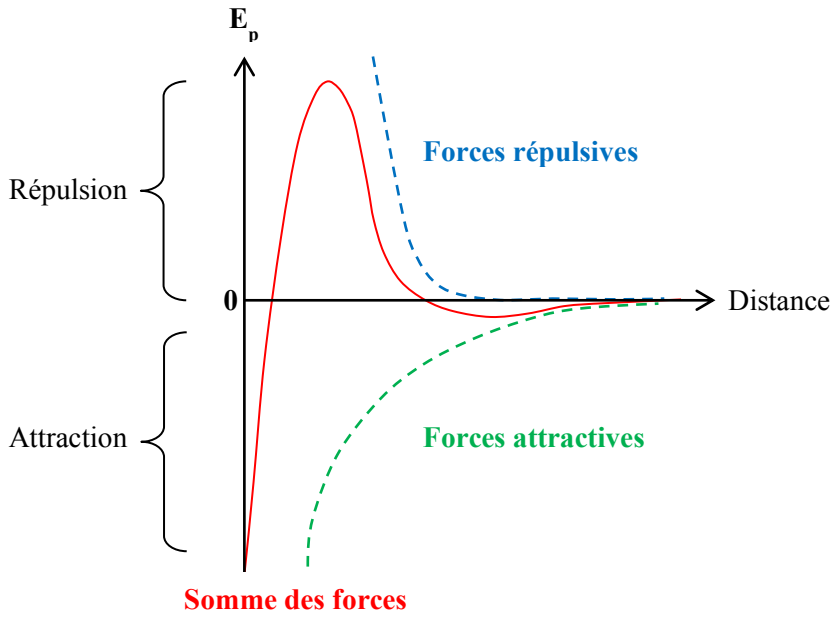


Figure 2 : Evolution de l'énergie potentielle (E_p) et forces mises en jeu entre deux particules, en fonction de la distance les séparant.

L'agrégation est l'évolution naturelle d'une suspension de NP. En effet, elle entraîne une réduction de la surface spécifique des particules, et donc une diminution de la tension de surface et de l'enthalpie libre du système. Certains facteurs peuvent cependant ralentir l'agrégation, ou au contraire la favoriser.

3. Facteurs influençant la stabilité

Il est possible de modifier la stabilité d'une suspension de NP en jouant sur des facteurs tels que le pH ou la force ionique. En effet, le pH contrôle la charge de surface de la particule, et donc la portée de la DCE. De plus, les ions présents en quantités importantes dans le milieu ont tendance à s'accumuler dans la DCE et jouer le rôle d'écran autour de la charge de surface. Ces phénomènes tendent à diminuer l'épaisseur de la DCE et donc la portée des forces répulsives stabilisatrices. Ainsi, l'ajout de sels dans le milieu aura tendance à promouvoir l'agrégation des NP. Les ions divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}…) forment des écrans particulièrement efficaces, notamment lorsqu'ils arrivent à s'adsorber à la surface des particules. Une présence importante d'ions divalents entraîne donc une agrégation des NP importante, comme cela a été observé par de nombreux auteurs (Baalousha *et al*., 2013; Chambers *et al*., 2014; Manier *et al*., 2011; Mwaanga, 2012; Rodea-Palomares *et al*., 2011).

A l'inverse, la présence de matière organique naturelle dans le milieu a tendance à stabiliser les suspensions en augmentant la répulsion entre les particules. Ainsi, les acides humiques ou fulviques, chargés négativement, s'adsorbent à la surface des nanoparticules chargées positivement et diminuent de manière importante les forces attractives entre particules (Hyung *et al*., 2007; Li and Chen, 2012).

Enfin, une stabilisation stérique des NP est rendue possible par ajout de surfactants ou de polymères (PVP [PolyVinyl Pyrrolidone], CMC [CarboxyMéthyl Cellulose], GA [Gomme Arabique],…) à leur surface, créant ainsi une barrière physique limitant le contact entre particules. La greffe de polymères, ou « enrobage » des NP est un procédé particulièrement apprécié dans l'industrie car il permet l'obtention de suspensions stables dans le temps. Certaines NP manufacturées sont ainsi enrobées d'une couche de maltose ou de citrate d'ammonium, comme c'est le cas pour un type de NP de CeO_2 employé dans cette étude.

En jouant sur l'agrégation des NP et donc sur leur sédimentation, le pH et la force ionique d'un milieu d'exposition, la présence de matière organique naturelle ou la nature même d'une suspension de NP (avec ou sans surfactant/enrobage) peuvent moduler la toxicité des NP vis-à-vis des organismes lors d'essais écotoxicologiques (Chambers *et al*., 2014; Rodea-Palomares *et al*., 2011; Wiesner *et al*., 2011).

4. Mesure de la stabilité d'une suspension de NP

L'étude de la stabilité d'une suspension de NP se fait par mesure du potentiel d'agrégation des NP et de la taille des agrégats présents en suspension.

Le potentiel électrique des NP est un indicateur de leur capacité d'agrégation : plus il est élevé plus les forces répulsives sont importantes. Les NP sont donc moins susceptibles de s'agréger et la suspension est potentiellement stable. Le potentiel électrique de la particule est maximum à la surface de celle-ci et diminue avec la distance, pour atteindre une valeur nulle à la limite de la DCE, au-delà de laquelle le champ électrique de la particule n'agit plus. En pratique, il est difficile de mesurer directement le potentiel électrique à la surface de la NP, et la mesure est effectuée au niveau du plan de cisaillement. On parle alors de mesure du potentiel zêta (ζ). Plus le potentiel zêta est important en valeur absolue, plus la suspension est considérée comme stable. Le potentiel zêta étant corrélé à la mobilité des particules, sa valeur est obtenue par calcul à partir de la mesure de la vitesse de déplacement des NP dans le milieu, lorsqu'un champ électrique est appliqué sur l'échantillon.

La taille des NP, ou des agrégats de NP, est donnée par la mesure de leur diamètre hydrodynamique. Cette mesure est effectuée au niveau du plan de cisaillement par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). Pour cela, un faisceau laser est dirigé vers l'échantillon à analyser, et la mesure de l'angle de déviation du laser permet de déterminer la taille de la particule, à laquelle il est proportionnel.

Références bibliographiques

Baalousha, M., Nur, Y., Römer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. Sci. Total Environ. 454-455, 119–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.093

Chambers, B.A., Afrooz, A.R.M.N., Bae, S., Aich, N., Katz, L., Saleh, N.B., Kirisits, M.J., 2014. Effects of Chloride and Ionic Strength on Physical Morphology, Dissolution, and Bacterial Toxicity of Silver Nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 48, 761–769. doi:10.1021/es403969x

Handy, R.D., von der Kammer, F., Lead, J.R., Hassellöv, M., Owen, R., Crane, M., 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicol. Lond. Engl. 17, 287–314. doi:10.1007/s10646-008-0199-8

Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.-H., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. Environ. Sci. Technol. 41, 179–184. doi:10.1021/es061817g

Li, K., Chen, Y., 2012. Effect of natural organic matter on the aggregation kinetics of CeO2 nanoparticles in KCl and CaCl2 solutions: measurements and modeling. J. Hazard. Mater. 209-210, 264–270. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.01.013

Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests. J. Phys. Conf. Ser. 304, 012058. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012058

Mwaanga, P., 2012. The Behavior and Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Aqueous Solution. Dissertation. Clemson University.

Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., García-Calvo, E., Santiago, J., Rosal, R., 2011. Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO2 nanoparticles using two aquatic micro-organisms. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. 119, 135–145. doi:10.1093/toxsci/kfq311

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Casman, E., Bertsch, P.M., Matson, C.W., Di Giulio, R.T., Liu, J., Hochella, M.F., 2011. Meditations on the Ubiquity and Mutability of Nano-Sized Materials in the Environment. ACS Nano 5, 8466–8470. doi:10.1021/nn204118p

Annexe 4

Principe de la Spectrométrie de Masse quadripolaire par Plasma à Couplage Inductif (ICP-MS).

Le principe de l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) est basé sur la séparation, l'identification et la quantification d'éléments chimiques en fonction de leur charge et de leur masse.

L'ICP-MS peut être divisée en quatre étapes (figure 1) : l'introduction-nébulisation, l'ionisation, la séparation des éléments et leur détection. L'échantillon sous forme liquide est introduit dans la chambre de vaporisation, où un nébuliseur à argon le transforme en aérosol liquide composé de fines gouttes de quelques microns. Cet aérosol est ensuite envoyé dans une torche à plasma à argon à très hautes températures (6000 à 10 000°C), qui le transforme en plasma. Après cette étape, la plupart des composants ont été dissociés, vaporisés, atomisés et ionisés. L'échantillon est alors introduit dans une chambre où un vide différentiel dévie les ions chargés positivement vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre sépare les ions suivant leur rapport masse/charge. Un détecteur d'ions détecte le nombre d'électrons produits (coups) lorsqu'un ion dévié par le filtre heurte les dynodes du détecteur. Grâce à un système d'étalons internes et externes, le nombre de coups enregistrés permet de calculer, pour un isotope donné, la concentration de l'élément analysé.

Cette technique permet de mesurer des éléments traces à des concentrations de l'ordre du ppb (µg/L).

(Source : Zeyons, 2008)

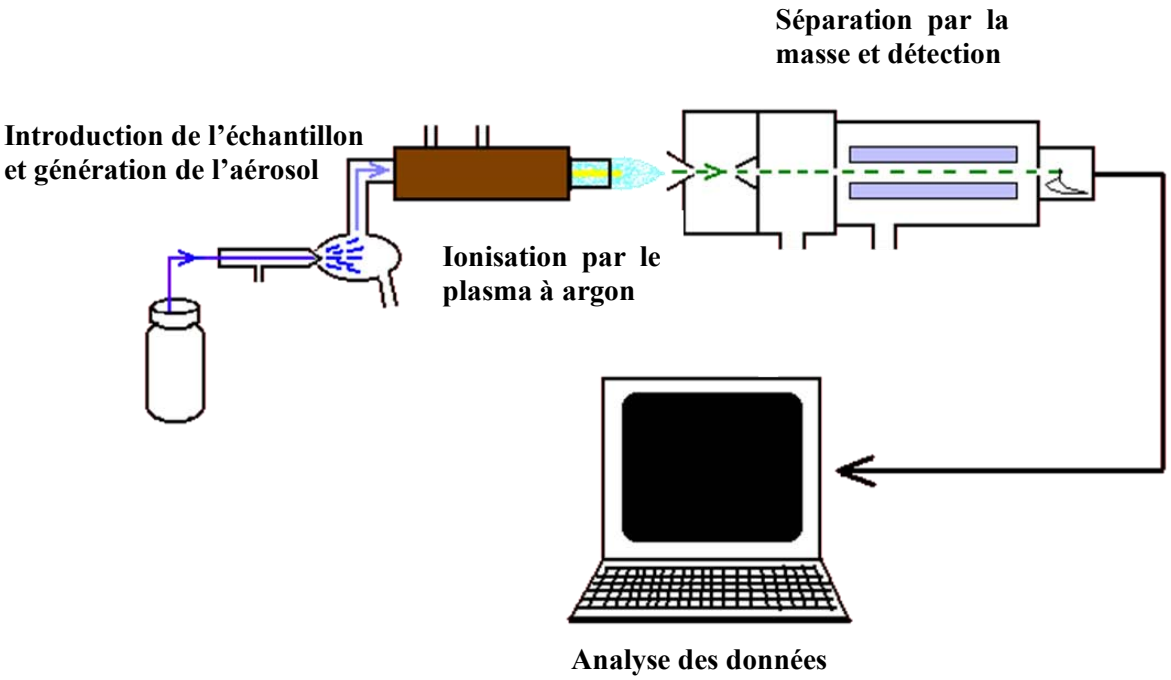


Figure 1 : Représentation schématique des principales étapes du fonctionnement de l'ICP-MS.

(Source : Worley and Kvech)

Références bibliographiques :

Worley, Kvech, ICP-MS. http://www.webapps.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm#Introduction. Consulté le 10/07/14.

Zeyons, O., 2008. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Annexe 5

Matériel utilisé lors des expositions en microcosme.

Les microcosmes utilisés lors de cette étude ont été spécialement développés dans le cadre du projet ANR P2N MESONNET, et sont présents en neuf exemplaires au sein des laboratoires EcoLab (UMR 5245, Toulouse), LIEC (UMR 7360, Metz) et CEREGE (UMR 7330, Aix-en-Provence). Les systèmes décrits dans cette partie (microcosmes, appareillage, composition du sédiment, eau), ainsi que les protocoles de contamination aux nanoparticules, sont communs aux trois laboratoires. En revanche, les espèces utilisées et le fonctionnement des systèmes biologiques sont spécifiques à chaque laboratoire.

Les microcosmes sont des systèmes rectangulaires, en verre, d'une contenance de 60 L et de dimensions 75 x 20 x 60 cm (L x l x h). Ils sont équipés de glissières latérales dont la fonction initiale n'a pas pu être prise en compte lors de cette étude. Pour chaque microcosme, une circulation d'eau en système fermé est assurée par une pompe (débit 600 L/h) reliée au microcosme à mi-hauteur grâce à un système de tuyauterie. L'arrivée d'eau est dirigée vers le haut de la colonne d'eau afin d'éviter la remise en suspension du sédiment. Les tuyaux par lesquels s'effectue la sortie d'eau sont dirigés vers le bas, et sont équipés de crépines empêchant l'aspiration des organismes (figures 1 et 2).

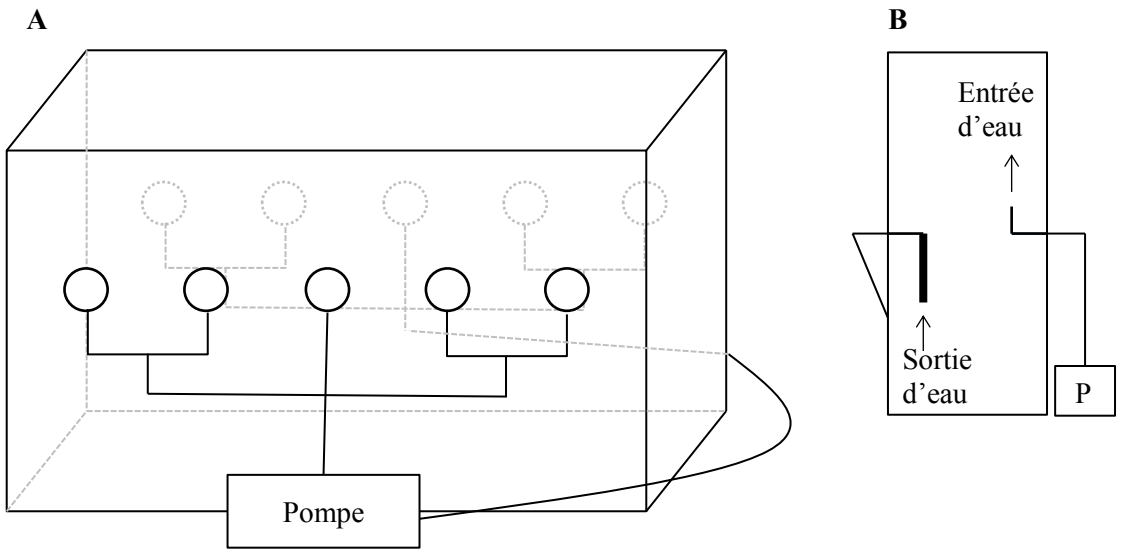


Figure 1 : Représentation schématique des microcosmes, vue de face (A) et latérale (B).

Chaque microcosme contient 6,5 L de sédiment reconstitué. Celui-ci est composé d'un mélange homogène de 89% de sable quartzique (granulométrie 0,08 - 1,25 mm), 10% de kaolinite et 1% de carbonate de calcium ($CaCO_3$). L'eau constituant la base du milieu est de l'eau minérale naturelle de Volvic®. Le sédiment est hydraté avec 4,5 L d'eau, et le volume surnageant est de 56 L. Chaque microcosme est également équipé d'un néon individuel (T5, NATUR, JBL) placé à 10 cm de la surface de la colonne d'eau. Enfin, un multimètre effectue un enregistrement horaire des paramètres physico-chimiques du milieu, à quelques centimètres de la surface du sédiment (2 – 4 cm). Les paramètres relevés sont la température, la conductivité, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction et le taux d'oxygène dissous. Le tableau 1 récapitule les caractéristiques des différents matériaux et appareillages du système.

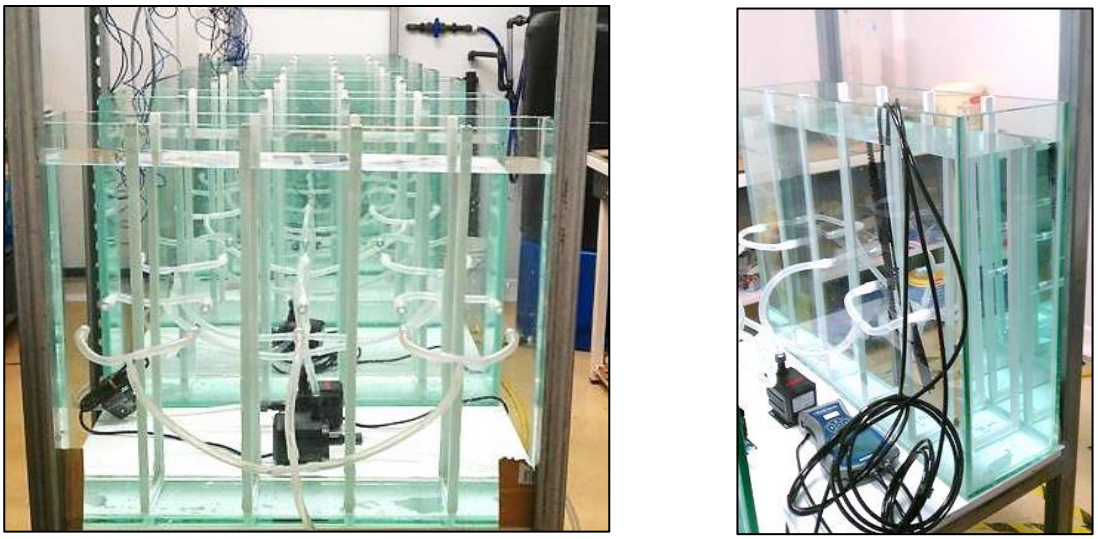


Figure 2 : Photographie des microcosmes avant leur mise en fonctionnement.

Tableau 1 : Caractéristiques du matériel utilisé pour le fonctionnement des microcosmes.

Parois du microcosme	Verre (épaisseur : 1 cm)
Tuyaux (circulation d'eau)	Silicone ($Ø_{int.}$: 12 mm)
Embouts de raccord des tuyaux	Polypropylène / polyéthylène
Eau d'exposition	Eau minérale naturelle Volvic, 56 L (composition en annexe 1)
Pompe	Pompe Eheim universal 600L/h 10W 230V 50Hz
Eclairage	Néon T5 (24W, spectre complet, Ø16mm, 55cm, JBL), 10 cm de la surface
Multimètre et sondes	Kit Ponsel Odéon open X ; sondes PHEHT, C4E et ODOT

Annexe 6

Cinétique de sédimentation de nanoparticules de CeO_2 dans différents milieux d'exposition.

Cette annexe présente le suivi de la sédimentation de NP de CeO_2 dans deux milieux utilisés pour l'exposition de larves de pleurodèles en conditions normalisées. Le lot de NP étudié correspond aux NP cubiques brutes. Le premier milieu étudié est le milieu d'exposition des amphibiens *X. laevis* et *P. waltl.*, préparé selon les normes ISO 21427-1 (2006) et AFNOR (2000) ; le second est l'eau minérale de Volvic®. La composition de ces deux milieux est présentée en annexe 1.

Les NP de CeO_2 ont été ajoutées aux milieux à des concentrations de 1 et 10 mg/L, selon le protocole employé pour l'exposition des organismes. Des prélèvements ont été effectués au centre de la colonne d'eau sur une période de 24h. Après le dernier prélèvement, les milieux ont été homogénéisés manuellement et un dernier prélèvement a été effectué (point « 24h+homogénéisation »). Les échantillons prélevés, ainsi qu'un échantillon de suspension mère, ont ensuite été dosés par ICP-MS. Les milieux ont également été photographiés afin d'illustrer la sédimentation des NP au cours du temps (figure 1). Le pH des milieux a été mesuré après chaque prélèvement (tableau 1). Un suivi de la taille des agrégats a également été réalisé en DLS sur chaque échantillon prélevé, avant dosage (tableau 2).

La concentration de la suspension mère en NP indiquée par le fournisseur est de 10 g de CeO_2/L, soit 8,14 g de Ce/L. La concentration en Ce mesurée dans la suspension mère est de 2,56 g/L, soit un écart d'un facteur 3,2 par rapport à la concentration théorique.

Tableau 1 : Suivi du pH des milieux au cours de l'expérience.

	T0	2h	6h	10h	24h
EDR (1 mg/L)	7,84	7,76	7,74	7,81	7,90
Volvic (1 mg/L)	8,09	7,94	7,86	7,86	8,21
EDR (10 mg/L)	7,93	7,85	7,80	8,03	7,94
Volvic (10 mg/L)	7,79	7,86	7,70	7,86	8,08

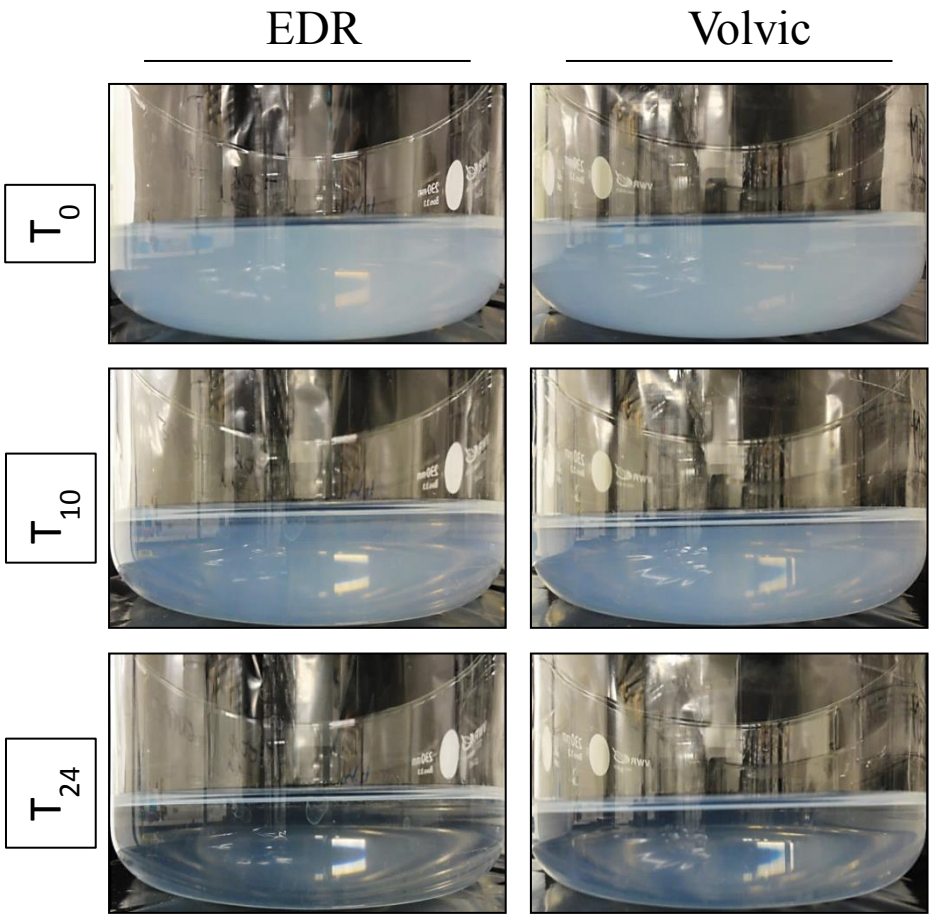


Figure 1 : Sédimentation des NP de CeO_2 au cours du temps dans les différents milieux d'exposition. Concentration initiale théorique de 10 mg/L.

Tableau 2 : Suivi du rayon hydrodynamique (nm) des NP au cours de l'expérience.

	2h	6h	10h
EDR (1 mg/L)	354	191	96
Volvic (1 mg/L)	988	138	> 1000
EDR (10 mg/L)	964	106	> 1000
Volvic (10 mg/L)	988	597	393

Références bibliographiques

AFNOR, 2000. NF T 90-325. Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl).

ISO 21427-1, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Annexe 7

Publications et communications.

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015. Toxicity of CeO_2 nanoparticles at different trophic levels – effects on diatoms, chironomids and amphibians. Chemosphere 120, 230–236. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.012

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. Journal of Hazardous Materials, *in press*.

Communications dans des colloques

A. Bour, F. Mouchet, L. Verneuil, J. Silvestre, H. Clivot, C. Pagnout, E. Pinelli and L. Gauthier. *Assessment of nanoparticles toxicity on aquatic environment: from single-species to mesocosm studies*.
CEINT internal meeting, 2014, Durham, USA, 22 – 23 mai 2014

A. Bour, F. Mouchet, L. Verneuil, L. Evariste, A. Perrault, J. Silvestre, E. Pinelli and L. Gauthier. *Ecotoxicological evaluation of cerium dioxide nanoparticles at different aquatic trophic levels, using diatoms, chironomids and amphibians.*
Nano 2013, Aix-en-Provence, France, 5 – 6 juillet July 2013.

Posters

A. Bour, F. Mouchet, L. Verneuil, A. Perrault, J. Silvestre, E. Pinelli and L. Gauthier.*Impact of cerium dioxide nanoparticles on a reconstructed aquatic ecosystem: a mesocosm study*.
SETAC 2014, Basel, Switzerland, 12 – 15 mai 2014.

A. Bour, F. Mouchet, L. Verneuil, L. Evariste, A. Perrault, J. Silvestre, E. Pinelli and L. Gauthier.*Assessment of cerium dioxide nanoparticles toxicity on four aquatic species at different trophic levels*.
SEGH (Society for Environmental Geochemistry and Health), Toulouse, France, 8 – 12 juillet 2013.

Ecotoxicological effects of cerium dioxide nanoparticles in freshwater ecosystems: from an evaluation in monospecific conditions to the study of experimental trophic chains in microcosm.

ABSTRACT

The ecotoxicity of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) was studied on freshwater organisms (i) in standardized monospecific conditions and (ii) on experimental trophic chains exposed in microcosms. No toxicity was observed on *Nitzschia palea* and *Chironomus riparius* in monospecific conditions. Growth inhibition was observed on the amphibian species *Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl.*, as well as acute toxicity and dose-dependent genotoxicity observed on *Xenopus* and *Pleurodeles*, respectively. Microcosm experiments revealed acute effects on *Pleurodeles*, changes in bacterial communities, a decrease in leaf litter decomposition and teratogenicity on chironomids. The observed effects vary depending on the type of CeO_2 NPs. The use of complex biological system enables the study of toxicity mechanisms in environmentally relevant conditions.

Key-words: Amphibian – Dipteran – Micro-organisms – (Geno)Toxicity – Bioaccumulation – Teratogenesis

AUTEUR : **Agathe BOUR**

TITRE : **Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosme**.

DIRECTEURS DE THESE : **Dr. Laury GAUTHIER ; Pr. Eric PINELLI**

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : **8 janvier 2015 ; ENSAT** (Castanet-Tolosan, 31326)

RESUME :

L'écotoxicité de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO_2 NP) en milieu dulçaquicole a été évaluée à l'aide (i) d'essais monospécifiques standardisés et (ii) de chaînes trophiques expérimentales exposées en microcosme. Aucune toxicité n'a été observée chez *Nitzschia palea* et *Chironomus riparius* en conditions monopsécifiques. Une inhibition de croissance a été observée chez les amphibiens *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl.*, ainsi qu'une toxicité aiguë chez le xénope et une génotoxicité dose-dépendante chez le pleurodèle. Les expositions en microcosme ont mis en évidence une toxicité aiguë chez le pleurodèle, des modifications des communautés bactériennes, une diminution de la décomposition de la litière, ainsi que des effets tératogènes chez le chironome. Les effets observés varient suivant la nature des CeO_2 NP étudiées. L'utilisation d'un système biologique complexe permet l'étude des mécanismes de toxicité dans des conditions plus représentatives des conditions environnementales.

MOTS CLES : Amphibiens – Diptères – Micro-organismes – (Géno)Toxicité – Bioaccumulation – Tératogenèse

---

DISCIPLINE : Sciences de l'Environnement – Ecotoxicologie

LABORATOIRE : EcoLab, UMR CNRS 5245
Campus ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole
BP 32607, Auzeville-Tolosane
31326 Castanet-Tolosan