

Impact d'un sédiment dopé aux nanoparticules d'or ou de sulfure de cadmium sur un invertébré et un poisson d'eau douce

Amina Dedeh

► To cite this version:

Amina Dedeh. Impact d'un sédiment dopé aux nanoparticules d'or ou de sulfure de cadmium sur un invertébré et un poisson d'eau douce. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0068 . tel-01133681

HAL Id: tel-01133681 https://theses.hal.science/tel-01133681

Submitted on 20 Mar 2015 $\,$

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 PRESENTÉE À

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE « Sciences et Environnements »

SPECIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

par Amina DEDEH

IMPACTS D'UN SÉDIMENT DOPÉ AUX NANOPARTICULES D'OR OU DE SULFURE DE CADMIUM SUR UN INVERTÉBRÉ ET UN POISSON D'EAU DOUCE

Sous la direction de : Jean-Paul BOURDINEAUD

Soutenue le 01 Juillet 2014

Membres du jury :

Daniel Brèthes, Directeur de recherche CNRS, Université de BordeauxPrésidentCatherine Mouneyrac, Professeur, Université Catholique de l'OuestRapporteurJean-Yves Bottero, Professeur, Université Aix-MarseilleRapporteurFarida Akcha, Chercheur, Ifremer NantesExaminatriceJean-Paul Bourdineaud, Professeur université de BordeauxExaminateurAurélie Ciutat, Chargé de recherche CNRS, Université BordeauxMembre invité



L'UNIVERSITÉ de BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE « Sciences et Environnements »

Numéro d'ordre :

par Amina DEDEH

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR SPECIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

IMPACTS D'UN SÉDIMENT DOPÉ AUX NANOPARTICULES D'OR OU DE SULFURE DE CADMIUM SUR UN INVERTÉBRÉ ET UN POISSON D'EAU DOUCE



-2014-

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Antoine Gremare, directeur de l'UMR EPOC 5805, Frédéric Garabetian, directeur de la Station marine d'Arcachon, ainsi que Jean-Charles Massabuau, directeur de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire et m'avoir donné la chance de d'accomplir ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Catherine Mouneyrac, Professeur à l'Université Catholique de l'Ouest et Jean-Yves Bottero, Professeur l'Université Aix-Marseille, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Farida Akcha, Chercheur, Ifremer Nantes, pour avoir accepté d'être examinatrice, et enfin Daniel Brèthes, DR CNRS (IBGC) qui me fait l'honneur d'être le président du jury.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Jean Paul Bourdineaud ; merci de m'avoir donné ma chance, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci également de m'avoir encadrée, accordé du temps et donné de si précieux conseils. Tu as toujours été encourageant et si je sors aujourd'hui grandie de cette expérience c'est principalement grâce à toi. Merci de m'avoir fait confiance.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Aurélie Ciutat pour m'avoir encadré, aidé et avoir été disponible pour moi malgré ses nombreuses occupations. Aussi pour sa gentillesse, et sa grande maitrise de la bioturbation. Merci de m'avoir fait partager ton domaine.

Je tiens également à remercier Mona Treguer-Delapierre pour m'avoir permis de travailler sur ses nanoparticules mais aussi pour m'avoir appris à les synthétiser malgré mon statut de novice en chimie.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique de la Station marine d'Arcachon, avec une attention particulière pour Damien Tran pour ces précieux conseils et réponses à toutes mes questions et Mohamedou Sow pour son aide en statistique et ses précieuses discussions.

Je tiens également à remercier Régine Maury-Brachet, pour sa grande maitrise des appareils de mesure, ces machines capricieuses. Merci pour ta gentillesse tout au long de ces trois années.

Merci également à Nathalie Mesmer-Dudons pour sa bonne humeur et surtout pour son immense travail de microscopie sur mes échantillons. Encore une fois désolé de t'avoir autant fait bosser. Je tiens aussi à remercier Bruno Etcheverria pour sa précieuse aide pour la mise en place de mes manips, Henri pour m'avoir aidé à la collecte de mon sédiment mais aussi pour sa gentillesse et ton travail que mes unités expérimentales en PVC.

Je tiens particulièrement à remercier Florence Daniel pour son aide, sa gentillesse avec moi, tu es toujours présente pour les étudiants à donner un coup de main par-ci par-là. Encore une fois merci Flo. Un grand Merci aussi à Catherine Charlot pour ton aide avec les bons de commandes et les livraisons.

Merci également à Patrice Gonzalez, Cerise, Alexia legeay, Magalie Baudrimont Angés Feurtet-Mazel, Fabien Pierron et Pierre Ciret ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique.Merci également à Guillaume Bernard pour sa précieuse aide avec les lumiophores, à Sabrina et l'ensemble de l'équipe ECOBIOC.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été la même sans la présence et le soutien de tous ceux qui m'ont accompagné au labo et dans le bureau des thésards, un grand merci aux anciens Adeline, Audery, Dalia, et Hugues pour m'avoir accueillie dans le bureau. Merci à vous pour votre gentillesse, bonne humeur, disponibilité et surtout votre aide.

Un merci tout particulier à mes nouveaux collègues de bureau Pierre-Yves, Sophie, Houssem et Mohcine mais aussi mes collègues des autres bureaux Lucie et Laura. Une pensée toute particulière à Lucie qui a partagé avec moi cette aventure, Merci pour ta joie ta gentillesse, ton écoute et ton amitié. Un grand Merci à Houssem et Pierre-Yves mes deux voisins de bureau, de train et d'adresses (Pessac), Merci pour nos précieuses discussions. Je n'oublierai jamais les merveilleux moments que j'ai passé en votre compagnie au laboratoire et en dehors. Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui m'ont aidé dans ce travail, un merci à Mélanie, Amel et Caroline, Bon courage pour la suite.

Cette thèse je la dois aussi à ma famille. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents et mon frère qui m'ont suivie, soutenu et encouragé malgré l'éloignement. Merci pour votre soutien je vous dois beaucoup de ce que je suis aujourd'hui. Merci du fond du cœur, je vous aime. Une pensée à ma chère tante Nadia et Lydia, Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi.

Enfin, une pensée toute particulière pour mon époux. Merci de m'avoir soutenu dans cette aventure malgré la distance qui nous séparait de l'avoir vécue avec moi au quotidien, plus que quiconque, tu étais là dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour ta confiance et ton amour.

À mes parents.

SOMMAIRE

Objectifs de la thèse	-9-
Chapitre -I- Synthèse bibliographique	-15-
A. Généralités sur les nanomatériaux	-16-
1. Les nanomatériaux	-16-
1.1. Nanotechnologie, utilisation et développement	-16-
1.2. Origines et synthèses des nano-objets	-20-
1.3. Caractéristiques des nano-objets	-22-
2. Applications présentes et futures de la nanotechnologie	-24-
3 Les nano-obiets et les systèmes biologiques / environnementaux	-26-
3.1 Interactions des systèmes biologiques avec les nano-obiets	-28-
3.2 Voies d'entrée des nano-objets dans les systèmes biologiques et	20
anvironnementaux	20
2.2. Devenir et comportement des pare objets dans l'environnement	-29-
2.4. Les effets des none chiets sur l'environnement et les enconiernes	-34-
5.4. Les effets des nano-objets sur l'environmement et les organismes	24
	-54-
3.5. Les mecanismes d'action des nanoparticules	-3/-
	41
B. Nanoparticules : potentiel contaminant des systèmes aquatiques	-41-
1. Les nanoparticules et les eaux de surface/ les sédiments	-41-
2. Biodisponibilité et caractéristiques des nanoparticules en milieu aquatique	-43-
3. Impacts des nanoparticules sur les organismes aquatiques	-45-
3.1. Impacts des nanoparticules sur les bactéries aquatiques	-46-
3.2. Impacts des nanoparticules sur les algues	-46-
3.3. Impacts des nanoparticules sur les invertébrés	-47-
3.4. Impacts des nanoparticules sur poissons	-50-
3.5. Impacts des nanoparticules sur d'autres organismes aquatiques	-51-
3.6. Impacts des nanoparticules sur la chaîne trophique aquatique	-51-
C. Nanoparticules d'or et de sulfure de cadmium	-60-
1. Nanoparticule d'or (Au NPs).	-60-
2 Effets des nanoparticules d'or sur les organismes biologiques	-64-
3 Nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS NPs)	-67-
4 Effets des nanonarticules de cadmium sur les organismes biologiques	-69-
4. Effets des hanopartieures de cadmirain sur les organismes orologiques	0)
D Le compartiment sédimentaire : une source notentielle de contamination des	
sustèmes aquetiques	71
1 Cónórolitós sur la sódiment	-/1-
2 Dôle du compartiment sódimentaire dans le contamination des écocaratèmes	-/1-
2. Note un compartiment seumentaire dans la contamination des ecosystemes	72
2 La historhation at ann influence and hereitiking dat with the	-/3-
5. La ploturbation et son influence sur la repartition des metaux et la	
remobilisation des particules sédimentaires	-75-

Chapitre -II- Bases méthodologiques	-82-
A Systèmes et dispositifs expérimentaux	-86-
1 Structure du dispositif expérimental	-86-
2 La colonne d'eau	-86-
3 Suivi des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau	-88-
4 Le sédiment	-88-
5 Dispositifs expérimentaux	-00- -02-
5.1 Contamination du sédiment aux narticules de sulfure de cadmium	-92- -92-
5.2 Contamination du sédiment aux particules d'or	-9 <u>2</u> -
5.2. Containination du seament dux nanopartieules d'or	74
B. Les vers tubifex : organismes bioturbateurs en milieu aquatique	-96-
1. Systématique.	-96-
2 Écologie et biologie	-96-
3 Anatomie	-97-
4 Intérêts en écotoxicologie	-98-
5 Échantillonnage	-100-
e . 2 e	100
C. Le poisson zèbre : organisme bio-indicateur de contamination en milieu aquatique	-103-
1. Systématique.	-103-
2. Écologie et biologie	-103-
3. Anatomie	-104-
4. Intérêts en écotoxicologie	-106-
5. Échantillonnage	-107-
C	
D. Synthèse et caractérisation des nanoparticules	-109-
1. Nano- et micro-particules de sulfure de cadmium	-109-
2. Nanoparticules d'or.	-111-
E. Techniques d'analyses	-113-
1. Techniques de quantification des métaux	-113-
1.1. Préparation des échantillons	-113-
1.2. Dosage des métaux	-116-
2. Techniques de quantification enzymatique et protéique	-118-
2.1. L'activité de neurotransmission « acétylcholinestérase »	-118-
2.2. La concentration protéique	-120-
2.3. Les métallothionéines	-120-
3. Techniques de biologie moléculaire	-123-
3.1. Extraction des ADNs totaux	-123-
3.2. Extraction des ARNs totaux et synthèse des ADNs complémentaires	-124-
3.3. PCR quantitative en temps réel	-127-
3.5. PCR par amorcage aléatoire RAPD.	-128-
4. Étude de la bioturbation par mesure de profils verticaux des traceurs sédimentaires.	-134-
4.1. Carottage et échantillonnage sédimentaire	-136-
4.2. Observation des échantillons sous UV et calculs des pourcentages de	
luminophores et Modélisation.	-136-
▲	

Chapitre -III- Résultats et Discussion	-139-			
A. Impact sur les vers oligochètes tubifex d'un sédiment dopé aux formes nano ou microparticulaires de sulfure de cadmium ; effet sur leur activité de bioturbation	-142-			
"Genotoxic impact of cadmium sulfide nano and microparticles on tubificidae worms exposed through the sediment- Effect on their bioturbation activity"				
B. Impact sur des poissons zèbres d'un sédiment dopé aux nanoparticules d'or	-179-			
"Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed through the sediment"	-180-			
C. Impact des nanoparticules d'or incluses dans un sédiment sur un biotope double comprenant des vers tubifex et des poissons zèbres	-196-			
"Impact of gold nanoparticles delivered from the sediment on a mixed biotope comprising of tubificidae worms and zebrafish"	-197-			
D. Approche multi-contaminants et multi-organismes : Comment mimer en microcosme la pollution métallique de la baie de Skikda, et impact sur deux organismes marins.	-238-			
"DNA alterations triggered by relevant polymetallic concentrations in marine clams <i>Ruditapes philippinarum</i> and polychaete worms <i>Hediste diversicolor</i> "	-239-			
 Chapitre –IV- Synthèse générale et perspectives. 1. Transfert des nanoparticules depuis le sédiment vers la colonne d'eau	-258- -261- -267- -267- -270- -274- -274- -276- -277- -281- -283- -284-			
Chapitre –V- Références bibliographiques	-285-			
Chapitre –VI- Annexes Résumé – Abstract	-312- -320-			

OBJECTIFS DE LA THÉSE

L'environnement est compris comme le milieu de vie de tous les organismes; c'est un système complexe, à plusieurs compartiments (air, sol, eau), naturellement équilibrés. Il arrive malheureusement que l'Homme en trouble l'harmonie. Ses rejets de déchets à la mer, les fumées provenant des usines qui envahissent l'air par exemple, y provoquent des modifications considérables auxquelles le système ne peut faire face. En effet, l'activité anthropique croissante entraîne un profond bouleversement qui porte atteinte à la structure, l'intégrité et le fonctionnement de ces écosystèmes. Parmi les milieux touchés par ces formes de pollution, les milieux aquatiques constituent de véritables réservoirs pour les contaminants, que ce soit les écosystèmes côtiers ou les cours d'eau. Les contaminants peuvent être présents dans l'ensemble des compartiments de l'écosystème aquatique, on les trouve dans la colonne d'eau, le sédiment et les organismes dans lesquels ils peuvent être accumulés à de fortes concentrations.

Le compartiment sédimentaire peut constituer une véritable source endogène de contamination à la suite de perturbations naturelles, ce qui engendre parfois d'importantes modifications de spéciation ou de biodisponibilité des contaminants sous leurs différentes formes. Il est donc très important d'étudier le devenir et le transfert de ces contaminants dans les différents compartiments abiotiques et biotiques des écosystèmes aquatiques, leur capacités de bioaccumulation et enfin caractériser leurs effets toxiques sur les espèces biologiques qui peuplent ces milieux.

Des recherches récentes ont conduit à l'élaboration et à la commercialisation de centaines de produits contenant des nanomatériaux. Les scientifiques et les industriels ont trouvé une occasion prometteuse dans le domaine des nanosciences pour améliorer la qualité et la performance de leurs produits, mais ces derniers ont montré de très nombreux impacts nocifs sur la santé humaine tels que les inflammations et le risque de cancers, alors que leur distribution dans les compartiments de l'écosystème et leurs effets sur les organismes aquatiques restent encore méconnues. La problématique de la contamination des milieux aquatiques aux nouveaux composés de synthèse « nanomatériaux » reste encore ignorée mais plusieurs recherches confirment l'éventuelle contamination de ces milieux (Moore, 2006). On estime la quantité de nanoparticules rejetée dans les milieux aquatiques à 65 tonnes par année (Blaser *et al*, 2008). Ces composés proviennent du déversement des produits manufacturés au cours de l'expédition et de la manutention ou de l'élimination délibérée (Handy *et al*, 2008a ; Handy *et al*, 2008b). Par conséquent, les différents compartiments de l'écosystème aquatique peuvent être touchés par la nocivité de ces nanomatériaux. (Moore *et al*, 2004; Wiesner *et al*, 2006).

Plusieurs recherches ont démontré que la contamination des milieux aquatiques aux nanoparticules présentait des effets toxiques sur les organismes (Moore, 2006); la plupart de ces recherches comprenaient des expériences de contaminations par voie directe (contamination de la colonne d'eau) à des concentrations ne reflétant pas l'état naturel ou plus rarement par voie trophique. Il existe néanmoins quelques études qui se sont intéressées aux effets de la contamination du compartiment sédimentaire aux nanoparticules (García-Alonzo et al, 2011; Unrine et al, 2010), mais ceci reste limité, d'où l'intérêt de cette recherche où nous proposons de répondre à la problématique de la contamination du compartiment sédimentaire aux nanoparticules métalliques. L'originalité de ce travail de recherche est l'utilisation du sédiment comme une source de contamination.

Le principal **objectif** de ce travail de recherche est de déterminer les effets du sédiment dopé aux nanoparticules métalliques (cadmium-Cd- et or-Au-) sur deux modèles d'organismes dans deux compartiments de l'écosystème aquatique (compartiment sédimentaire et colonne d'eau). Cette recherche s'inscrit dans un contexte prédictif d'une contamination du compartiment sédimentaire et ne reflète pas nécessairement les concentrations naturelles.

Notre programme de recherche consiste à doper le sédiment de la Garonne avec deux métaux (Cd et Au) sous forme nanoparticulaire et de caractériser l'effet de cette contamination sur deux organismes biologiques. Nous avons mis en place une approche expérimentale à l'échelle du laboratoire afin de reproduire et de respecter les conditions naturelles. Nos expérimentations ont été effectuées et développées dans une démarche pluridisciplinaire afin de profiter de moyens de recherche complémentaires et d'un nombre important de techniques mises en œuvre simultanément pour analyser et comparer les impacts de cette contamination.

La perspective de ce travail est purement écotoxicologique, nous nous somme seulement intéressés à l'observation des effets du sédiment dopé aux nanoparticules sans expliquer le devenir et la spéciation des contaminants utilisés dans les différents compartiments biotiques et abiotiques de nos expérimentations qui demandaient d'avantages d'expériences, d'analyses et d'observations chimiques. *Le point original de ce travail est la contamination du sédiment et l'exposition d'un poisson au sédiment dopé aux nanoparticules*.

Nos recherches reposent sur la mise en place de systèmes expérimentaux de types microcosmes incluant un biotope mixte « colonne d'eau - sédiment » et d'une ou plusieurs composantes biologiques ; le sédiment étant dopé avec les nanoparticules.

Le premier modèle biologique, le ver oligochète tubifex, a été choisi en raison de son mode de vie qui l'expose directement aux contaminants présents dans le sédiment ainsi que son comportement de bioturbation responsable du remaniement sédimentaire et du transfert des contaminants vers le compartiment sus-jacent. En effet les vers tubifex se positionnent verticalement dans le sédiment, le positonium en bas assurant un transfert des sédiments ingérés depuis les couches réduites en profondeur jusqu'à la zone d'interface avec la colonne d'eau via le dépôt des pelotes fécales.

Le poisson zèbre a été utilisé comme deuxième modèle biologique afin de caractériser le transfert potentiel et la biodisponibilité des nanoparticules dans la colonne d'eau en présence et en absence de source de bioturbation. La connaissance du génome entièrement séquencé du poisson zèbre nous a permis d'effectuer des analyses au niveau moléculaire afin de préciser le mécanisme d'action et les altérations provoquées par ces nanoparticules dans chaque tissu.

Les analyses enzymatiques et moléculaires sur les deux organismes nous ont permis de caractériser l'impact des contaminants nanoparticulaire sur les espèces aquatiques et de répondre au principal objectif de la présente étude. À titre comparatif et afin de pouvoir identifier l'impact des formes nanoparticulaires, des expériences similaires ont été conduites en utilisant les formes ioniques des métaux.

Les principales problématiques posées dans ce travail de recherche sont :

- *Les nanoparticules sont-elles biodisponibles pour les organismes vivants à l'interface entre le compartiment sédimentaire et la colonne d'eau en cas de contamination du sédiment ?*
- La contamination du sédiment aux nanoparticules (CdS, Au) présenteelle un effet toxique sur les organismes vivants à l'interface entre le compartiment sédimentaire et la colonne d'eau (vers aquatiques) au niveau enzymatique et moléculaire?
- La bioturbation engendrée par le mouvement des vers en surface contribue-t-elle au transfert du métal vers la colonne d'eau ? ce métal devient-il biodisponible pour les organismes vivant dans le compartiment sus-jacent (poisson) ?
- Quels sont les effets du sédiment dopé aux nanoparticules d'or sur le poisson zèbre (enzymatiques et génétiques) ?

Le *premier chapitre* de ce mémoire présente une synthèse bibliographique et un état des connaissances relatives aux nanomatériaux et leurs effets sur les organismes aquatiques ainsi qu'une introduction du compartiment sédimentaire et sa contamination dans les systèmes aquatiques.

Le *deuxième chapitre* est consacré à la présentation détaillée de la mise en place des systèmes expérimentaux, des différentes techniques effectuées et des organismes utilisés durant ce travail de recherche.

Les résultats obtenus sont ensuite détaillés et discutés dans le *troisième chapitre* sous forme d'articles.

Le <u>premier article</u> portera sur l'impact d'un sédiment dopé aux formes nano et microparticulaires de sulfure de cadmium sur les vers oligochètes tubifex et l'effet sur leur activité de bioturbation.

Le <u>deuxième article</u> abordera l'impact d'un sédiment dopé aux nanoparticules d'or sur les poissons zèbres.

Le <u>troisième article</u> présentera l'impact des nanoparticules d'or incluses dans un sédiment sur un biotope double comprenant des vers tubifex et des poissons zèbres.

Nous présenterons également dans <u>l'article quatre</u> une approche multicontaminants et multi-organismes où nous avons mimé en microcosme la pollution métallique de la baie de Skikda-Nord Est Algérien .

Le *quatrième chapitre* du mémoire constituera une synthèse générale des résultats et de l'ensemble des expériences réalisées, afin d'en sortir les principales conclusions, d'examiner l'éventuelle extrapolation aux processus se déroulant en milieu naturel et d'en tirer des perspectives de recherches. Les *cinquième* et *sixième chapitres* regrouperont les références bibliographiques et les annexe.

CHAPITRE I SYNTHÉSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. GÉNERALITES SUR LES NANOMATERIAUX

1. Les nanomatériaux

1.1. Nanotechnologie, utilisations et développement

Les concepts associés aux nanotechnologies ont été proposés pour la première fois en 1959 par le physicien Richard Feynman quand il évoquait l'infiniment petit. Cependant, le terme nanotechnologie ne fut utilisé pour la première fois qu'en 1974 lorsque Norio Taniguchi, un chercheur de l'Université de Tokyo, l'employa pour décrire la capacité de fabriquer des matériaux à l'échelle nanométrique. La Nanoscience vise à comprendre la structure des matériaux à l'échelle nanométrique (0,1-100 nm de diamètre), alors que la nanotechnologie cherche à synthétiser, modifier et manipuler la matière à ce niveau (Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004). Selon la US National Nanotechnology Initiative, la nanotechnologie s'intéresse aux matériaux et aux systèmes dont les structures et les composants présentent une amélioration considérable des propriétés, des phénomènes et des processus physiques, chimiques et biologiques en raison de leur taille nanométrique. L'objectif est d'exploiter ces propriétés en prenant le contrôle des structures et des dispositifs à l'échelle atomique, moléculaire et supramoléculaire et d'apprendre à fabriquer et d'utiliser efficacement ces dispositifs¹. La nanoscience repose sur la connaissance et la maîtrise de l'infiniment petit, et constitue un champ de recherche et de développement multidisciplinaire impliquant la fabrication de nouveaux matériaux et de nouveaux dispositifs à partir d'outils ou de techniques permettant de structurer la matière. Les nanotechnologies sont la formalisation des concepts et des procédés issus des nanosciences².

¹ www.nano.gov/nni2.htm

² www.inrs.fr



Figure 1. Exemples de produits contenant des nanomatériaux (www.nanotechproject.org)

En décembre 2010, le Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) a donné les conclusions suivantes concernant les caractéristiques des nano-objets et une nouvelle proposition de définition³ :

- ✓ Les propriétés physiques et chimiques des matériaux peuvent changer avec leur taille, mais il n'existe pas de taille minimale ou maximale qui puisse être associée à ces changements pour tous les nano-objets.
- ✓ La taille est le meilleur moyen de définir tous les nano-objets. Une taille comprise entre 1 et 100 nm pour au moins une dimension.
- ✓ Une dimension comprise entre 1 et 100 nm pour au moins 0.15% des composants du matériau.
- ✓ Une surface spécifique en volume supérieure à 60 m²/cm³. La surface spécifique représente la surface réelle d'un objet, par opposition à la surface apparente. Elle représente la surface qu'occuperait un gramme de cet objet si cette surface était entièrement développée. Elle rend ainsi compte de la surface totale du nano-objet en contact avec l'extérieur, qui peut être différente de la surface apparente de l'objet. Elle s'exprime en m²/g. Une autre manière d'exprimer la surface spécifique d'un objet consiste à la rapporter au volume total de l'objet, au lieu de sa masse. Cette surface spécifique exprimée en volume s'obtient en divisant la surface spécifique de l'objet exprimée par unité de masse par sa densité, qu'on suppose égale à celle du même objet à l'échelle non nanométrique. Cette façon d'exprimer la surface spécifique présente l'avantage d'être indépendante de la densité du matériau, et d'être donc comparable entre des objets de compositions chimiques différentes.

Un nano-objet est appelé un **nano feuillet (a)** s'il dispose d'une dimension nanométrique (exemple : graphite), un **nanotube (b)** si 2 de ses dimensions sont nanométriques (exemple : les nanotubes de carbone) et une **nanoparticule(c)** (NP) si ses 3 dimensions sont nanométriques (exemple : nanoparticule d'or) (Fig. 2).

³ www.ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_032.pdf



1 m	10º	• Homme
	10 ⁻¹	• Verre
	10 ⁻²	• Grain de riz
1mm	10 ⁻³	 Tête d'épingle
	10-4	• Limite de la vision humaine
	10 ⁻⁵	
1µm	10 ⁻⁶	MICROTECHNOLOGIES
	10 ⁻⁷	Gravure des circuits intégrés
	10 ⁻⁸	
1nm	10 ⁻⁹	• NANOTECHNOLOBIES
	10 ⁻¹⁰	Taille de l'atome
	10 -11	

Figure 2. Les différents types de nano-objets (a. nano feuillet, b. nanotube et c. nanoparticule) (www.nanotechproject.org). Comparaison des tailles de certains produits et organismes avec les nanoparticules.

1.2. Origines et synthèses des nano-objets

On distingue plusieurs origines des nano-objets :

- ✓ Les nano-objets d'origine naturelle: ils sont produits par différents phénomènes dont la condensation de gaz dans l'atmosphère, mais aussi l'activité volcanique, les feux, les marées, l'érosion. C'est ce qui est plus communément connu sous le nom de particules ultrafines.
- ✓ Les nano-objets d'origine anthropique: produits du fait des activités humaines. Ces nano-objets peuvent eux-mêmes être divisés en 2 catégories :
 - Les nano-objets d'origine **non intentionnelle** : ils peuvent être générés par la combustion des moteurs, les industries, les procédés métallurgiques...
 - Les nano-objets manufacturés, produits intentionnellement pour être utilisés. La présente étude traitera plus spécifiquement de ce type de nano-objets.

Il existe deux procédés de fabrication pour obtenir des nanomatériaux : le procédé dit « **ascendant** » ou **bottom-up** et le procédé dit « **descendant** » ou **top-down** (Fig. 3). La première méthode, principalement utilisée dans les laboratoires, consiste à construire des nanomatériaux atome par atome. Alors que la seconde, utilisée dans l'industrie, consiste à fractionner et à réduire des structures de taille plus importante jusqu'à atteindre le stade nanométrique. Cette méthode est moins précise mais permet d'obtenir de plus grandes quantités de matière.

Il existe trois grandes classes de méthodes de production des nanomatériaux. Les procèdes physiques et chimiques sont employés dans l'approche **ascendante**, les procèdes mécaniques quant à eux, sont caractéristiques de l'approche **descendante**. Le procédé physique fait intervenir le changement d'état vapeur liquide en phase saturée en atomes ou en ions métalliques suivi d'un refroidissement brutal (la trempe).

20



Figure 3. Procédés d'élaboration de nanomatériaux (www.inrs.fr)

La condensation brutale de la vapeur métastable dans un gaz inerte (généralement l'argon) favorise la germination de très petits agrégats. Ce sont les nanomatériaux. Leur taille sera en ²fonction de la vitesse de refroidissement et de la sursaturation locale en matériaux. Cette catégorie de procédés inclut notamment la pyrolyse laser. Le procédé chimique, quant à lui, repose sur des réactions chimiques au sein du réacteur. Dans cette catégorie, on peut citer les réactions en phase vapeur (CVD). Enfin, les procédés mécaniques consistent en un broyage de poudre micrométrique jusqu'à l'obtention d'une poudre nanométrique homogène et de taille désirée.

1.3. Caractéristiques des nano-objets

La réactivité chimique des nano-objets est susceptible d'être fortement modifiée lorsqu'ils sont comparés à leurs formes de taille micrométrique ou supérieure. Le nombre d'atomes en surface du nano-objet est fortement supérieur à l'état nanométrique comparé à l'état micrométrique. Or, ce sont principalement les atomes présents en surface qui interagissent avec l'environnement du nano-objet lors des réactions chimiques. L'énergie d'activation (quantité d'énergie à apporter à un composé pour provoquer une réaction chimique), décroît lorsque la taille diminue. C'est également le cas de la surface spécifique. La réactivité chimique, qui dépend de ces propriétés, augmente donc lorsque la taille des objets diminue. (Fig. 4 et 5)

Il est évident que la réactivité d'un matériau dépend de la zone de contact qu'elle offre. Sa réactivité est donc une fonction croissante de sa surface. En effet, en réduisant la taille des matériaux on augmente considérablement la surface susceptible de réagir avec le milieu environnant. A titre de comparaison, un lingot d'or d'1 kg possède une surface d'environ 289 cm² alors qu'un ensemble d'1 kg de nanoparticules d'or sphériques de 6 nm de diamètre possèdent de manière cumulée $5,14.10^8$ cm² de surface réactive.



Figure 4. Effet de la diminution de la taille d'un cube sur l'augmentation du rapport surface/volume. (www.nano.gov)



Figure 5. Rapport surface/volume (en bleu) et fraction des molécules présentes à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (pour une particule sphérique).

Il y a augmentation d'un facteur d'environ 2.10⁶ de cette surface. On comprend alors pourquoi la réactivité d'un même matériau pour une même quantité peut complètement changer quand on passe de sa forme massive à sa forme nanométrique. L'augmentation de la réactivité des matériaux à l'échelle nanométrique est une de leur propriété remarquable à l'origine de leurs applications. Ceci peut expliquer que l'or, inerte à l'échelle micrométrique, soit réactif à l'échelle du nanomètre (par exemple ; des nanoparticules d'or de 20 nm ont une bande de résonance de plasmon à 520 nm (absorption dans le vert) et sont rouges. L'or sous forme de nanoparticules perd donc sa couleur dorée si caractéristique).

2. Applications présentes et futures de la nanotechnologie (Fig. 1)

Premier secteur à s'approprier le nanomonde, *l'électronique* qui cherche à repousser toujours plus loin la taille de ses composants élémentaires : les transistors. La barre des 100 nanomètres étant franchie depuis 2002, les ingénieurs sont à présent confrontés à toutes les difficultés inhérentes à l'utilisation d'objets aux propriétés plus quantiques que physiques (« fuite » des particules de leur transistor, par exemple)⁴ (Tableau.1).

Avec un marché mondial estimé à 340 milliards de dollars d'ici 2015, d'après une étude de la Commission Européenne⁵, les nanomatériaux regroupent des secteurs comme *l'aéronautique*, *l'automobile* ou *l'espace*. Les débouchés potentiels sont nombreux, même si peu de prototypes peuvent encore espérer s'imposer sur le marché. Résistance à la traction à l'aide d'argile nanométrique, imperméabilité au gaz plus importante du nanocomposite à base de polyamide et d'argile, béton autonettoyant et dépolluant grâce au TiO₂ nanométrique, aérogels superisolants... sont des exemples de propriétés, envisagées ou bien déjà réalisées, que peuvent avoir les nanomatériaux.

⁴www.cnano-paca.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=76 ⁵www.ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanoarticle hullmann nov2006.pdf

Tableau 1. Applications utilisant les nanotechnologies, par secteur d'activité (www.inrs.fr)				
Secteur d'activité	Exemples d'applications actuelles et envisagées			
Automobile, aéronautique et espace	matériaux renforcés et plus légers; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, anti-rayures, anticorrosion et antisalissure; capteurs optimisant les performances des moteurs; détecteurs de glace sur les ailes d'avion; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion; pneumatiques plus durables et recyclables			
Electronique et communications	mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés; cellules solaires; bibliothèques électroniques de poche; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides; technologies sans fil; écrans plats			
Chimie et matériaux	pigments; poudres céramiques; inhibiteurs de corrosion; catalyseurs multifonctionnels; vitres antisalissures et autonettoyantes; textiles et revêtements antibactériens et ultrarésistants; membranes pour la séparation des matériaux (traitement de l'eau); couches ou multicouches fonctionnelles: isolation thermique			
Pharmacie, biomédical et biotechnologie	médicaments et agents actifs; surfaces adhésives médicales antiallergènes; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis; surfaces bio- compatibles pour implants; vaccins oraux; régénération des os et des tissus; kits d'autodiagnostic			
Cosmétique	crèmes solaires transparentes; pâtes à dentifrice plus abrasives; maquillage et notamment rouge à lèvres avec une meilleure tenue			
Santé	appareils et moyens de diagnostic miniaturisés et nano-détection; tissus et implants munis de revêtements améliorant la bio-activité et la biocompatibilité; capteurs multifonctionnels; analyses d'ADN; membranes pour dialyse; destruction de tumeurs par chauffage; thérapie génique : nano-vecteurs pour transfert de gènes; microchirurgie et médecine réparatrice : nano-implants et prothèses			
Energie	cellules photovoltaïques nouvelle génération; nouveaux types de batteries; fenêtres intelligentes; matériaux isolants plus efficaces; photosynthèse artificielle (énergie « verte »); entreposage d'hydrogène combustible			
Environnement et écologie	diminution des émissions de dioxyde de carbone; production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables; couches non toxiques fonctionnelles de capteurs pour la dépollution environnementale; récupération et recyclage des ressources existantes; analyseurs chimiques spécifiques			
Défense	détecteurs et correcteurs d'agents chimiques et biologiques; systèmes de surveillance miniaturisés; systèmes de guidage plus précis; textiles légers et qui se réparent d'eux- mêmes			
Secteur manufacturier	ingénierie de précision pour la production de nouvelles générations de microscopes et d'instruments de mesure et de nouveaux outils pour manipuler la matière au niveau atomique			

- Bien qu'encore très largement au stade expérimental, la *nanomédecine* a un énorme potentiel devant elle. Il existe, à l'heure actuelle, plusieurs nanomédicaments commercialisés, principalement dans le domaine de la cancérologie, même si d'autres domaines sont ciblés. Par exemple, on peut citer la délivrance de substances actives via l'enrobage dans des nanocapsules pour un meilleur ciblage des cellules à traiter, la visualisation de tumeurs rendue possible grâce à des nanoparticules d'oxyde de fer, des diagnostics plus précoces et précis (Grognet, 2008).
- Les applications liées à l'environnement ne sont pas en reste : sont envisagées des applications telles qu'augmenter l'autonomie des voitures électriques grâce à des nanoparticules de phosphate de fer lithié (meilleur conducteur que le cobalt actuellement utilisé), retenir les médicaments grâce à des membranes de filtration d'eaux usées contenant des nanoparticules, ou encore d'ajouter du TiO₂ dans des cellules solaires pour accroître leur efficacité (Gratzel, 2001)
- Enfin, et bien qu'il soit difficile de savoir ce qu'il en est exactement, la Défense investit lourdement dans le secteur des nanotechnologies. En 2010, le ministère de la Défense américain a reçu plus d'un quart (soit environ 436 millions de dollars) du budget alloué par le gouvernement américain aux nanotechnologies. L'arsenal nanotechnologique serait, à terme, très diversifié : caméras multi-spectrales, lasers, détecteurs chimiques, blindages et armures n'en sont que des exemples.

3. Les nano-objets et les systèmes biologiques/ environnementaux

Le domaine de la nanotechnologie est très prometteur et englobe de nombreux domaines de la science et de l'application technologique. Toutefois, en raison de la relative nouveauté de cette technologie, très peu d'évaluations des risques de ces produits ont été effectués sur les systèmes biologiques et des inquiétudes quant à leurs utilisations sont de plus en plus exprimées en public et



Figure 6. Les potentiels voies d'exposition de l'être humain aux nanoparticules (www.internetactu.net)

dans les médias (Colvin, 2003, 2004; Dowling, 2004; Howard, 2004; Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004; Warheit, 2004). Le récent rapport de la Royal Society et Royal Academy of Engineering sur les nanosciences et les nanotechnologies se concentre désormais, à l'attention des gestionnaires de l'environnement et des décideurs politiques, sur les possibles risques toxicologiques et pathologiques pour la santé humaine et l'environnement que peuvent présenter les produits issus des nanotechnologies comme dans le cas de développement et d'administration de médicaments basés sur les systèmes de nanotechnologie (Dowling, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004; Warheit, 2004).

3.1. Interactions des systèmes biologiques avec les nano-objets

La préoccupation majeure chez les toxicologues de l'environnement et les pathologistes, c'est que les nano-objets manufacturés peuvent interagir avec les organismes vivants et donc les confronter à un nouveau défi, car de tels matériaux ne sont pas généralement rencontrés par les organismes vivants au cours de l'évolution biologique (Dowling, 2004; Colvin, 2003, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Warheit, 2004). Par conséquent, il y aura peu ou pas de sélection pour les systèmes de défense ou de protection pour contrer toute propriété néfaste de ces matériaux mis à part ceux déjà utilisés contre les produits de combustion naturelle, cendres volcaniques, métaux toxiques et xénobiotiques organiques.

Il y a un très grand nombre de preuves que les petites particules produites par les procédés de combustion dites « particules ultrafines » peuvent être dangereuses pour la santé humaine (Brook, 2002; Donaldson *et al*, 2000; Lam *et al*, 2004; Oberdörster , 2000; Oberdörster *et al*, 2004b; Schwartz, 1994, 2004; Shi *et al* , 2001; Warheit *et al*, 2003). Les nano-objets ont une très grande surface d'échange et cette surface peut avoir une forte affinité pour les métaux (par exemple le fer) et les composés organiques issus de la combustion tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP (Cheng *et al*, 2004). L'agence américaine de protection de l'environnement a attribué 60.000 décès par an à l'inhalation de nanoparticules dans l'atmosphère, et il existe des preuves directes de transfert de ces particules au cerveau (Oberdörster *et al*, 2004b; Raloff, 2003). En thérapie médicale, de nombreux médicaments ne parviennent pas à leurs cibles ce qui peut limiter leur efficacité (Brigger *et al*, 2002; Oppenheim, 1981). Cependant, lorsque des médicaments sont encapsulés avec des particules nanométriques et traités pour éviter leur agrégation, le résultat est souvent un matériau stable et soluble dans l'eau, ce qui peut engendrer un effet potentiel inattendu (Brigger *et al*, 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003).

D'autres médicaments à base de nanoparticules sont également à l'étude pour une utilisation dans les traitements et les diagnostics du cancer, les propriétés nanométriques de ces médicaments facilitant l'entrée et le ciblage spécifique intracellulaire des sites à traiter (Brigger *et al*, 2002).

3.2. <u>Voies d'entrée des nano-objets dans les systèmes biologiques et</u> <u>environnementaux</u>

L'être humain peut entrer en contact avec les nano-objets à différents moments de la vie de ceux-ci, que ce soit dans le contexte professionnel, environnemental ou de consommation. On peut voir dans la figure.6 que l'exposition est susceptible de varier en fonction du stade du cycle de vie du nanoobjet : au stade de fabrication, les travailleurs sont les plus susceptibles d'être exposés, alors qu'au stade de distribution et de commercialisation, les consommateurs peuvent également être exposés. L'exposition peut également avoir lieu en fin de vie du nano-objet, en particulier s'il y a dégradation du produit. Enfin, à tous les stades de vie du nano-objet existe la possibilité qu'il contamine l'environnement. Ainsi, pour le même nano-objet, le nombre de personnes exposées ainsi que les modalités de l'exposition sont des paramètres qui peuvent



Transcytosis

Figure 7. Les voies d'entrée des nanoparticules dans la cellule (Shin and Abraham, 2001; van der Goot and Gruenberg, 2002)

énormément varier. L'absorption des nanoparticules par inhalation ou ingestion est susceptible d'être la principale voie de contamination pour les organismes terrestres (Brigger *et al*, 2002.; Dowling, 2004; Colvin, 2003, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Warheit, 2004). Cependant, chez les animaux aquatiques, il peut y avoir d'autres voies d'entrée comme le passage direct à travers les branchies et autres cellules épithéliales de surface externe. Au niveau cellulaire, l'internalisation des nanoparticules se produit par endocytose. Les voies d'endocytose dans les cellules peuvent soit conduire aux endosomes et lysosomes ou bien à la formation de vésicules de surface connues sous le nom de cavéole via le radeau lipidique qui évite la dégradation du matériel entrant (Na *et al*, 2003; Panyam and Labhasetwar, 2003; Panyam *et al*, 2003; Pelkmans and Helenius, 2002 et Fig. 7). Cette dernière voie est une voie exploitée par de nombreux agents pathogènes viraux et plusieurs nanoparticules sont conçus pour pénétrer selon cette modalité en nanotechnologie médicale (Na *et al*, 2003; Panyam and Labhasetwar, 2003).

La dissémination de nanomatériaux dans l'environnement peut se faire de différentes façons. Lorsque la dissémination est involontaire, on différencie les contaminations chroniques des contaminations aigües. On peut citer comme exemples de contaminations chroniques, les nanotubes de carbone (NTC) qui peuvent être libérés dans les sols en raison des frottements des pneus sur les routes ou les NPs de TiO₂ contenu dans les crèmes solaires et peut se répandre dans l'eau pendant les baignades. Enfin, les NPs d'Ag entrant dans la composition des chaussettes de sport peuvent polluer les eaux après une lessive. A l'inverse, la contamination aigüe met en jeu de fortes concentrations en polluant sur des temps courts. Ce type de contamination pourrait avoir lieu lors d'accidents dans des unités de production ou de grandes quantités de nanomatériaux peuvent être émises en un même endroit. Lors de contaminations, l'écosystème se trouve au centre des flux de polluants puisqu'il est à la fois un compartiment puits qui reçoit les contaminations mais également un compartiment source qui peut transmettre la pollution vers d'autres compartiments jusqu'à la population.

Du fait de leur petite taille, les NPs sont susceptibles d'être très mobiles dans l'environnement et donc d'être aisément transférées d'un milieu à l'autre et vers les populations animales ou végétales. Les simulations réalisées par des chercheurs suisses (Mueller and Nowack, 2008; Gottschalk *et al*, 2009) ont estimé la quantité de nanomatériaux susceptible de s'accumuler dans l'environnement. D'après leur modélisation en 2008, le nanomatériau le plus préoccupant en termes de concentrations dans l'environnement est le TiO₂. Il s'accumulerait à hauteur de 16 μ g TiO₂/L dans les eaux de surface, 4 μ g TiO₂/L dans les effluents de station d'épuration et sa teneur dans les sols amendés par des boues de stations d'épuration augmenterait de 89 μ g TiO₂/kg tous les ans.

La dissémination peut également être volontaire en raison de l'utilisation de nanomatériaux dans l'industrie des pesticides afin d'augmenter la pénétration des substances actives dans le végétal. De plus, les nanomatériaux sont déjà employés dans la filière de dépollution des eaux de surface et des sols. En effet certains NMs comme les NPs de fer sont utilisés pour assainir les sols contaminés (Zhang and Elliott, 2006). Les sites traités peuvent être des sites privés, des installations militaires, industrielles ou encore pétrolières et sont majoritairement situés aux Etats-Unis. Ces sites sont pour la plupart contaminés au trichloréthylène (TCE) ou au dichloroéthylène (DCE) et dépollués par des NPs de fer. Ainsi, par exemple, le sol d'un site militaire québécois a vu ses valeurs de TCE passer de 300 ppb à moins de 5 ppb après un traitement de 12 mois à l'aide de nanoparticule de fer⁸. En outre, les NPs présentes dans les peintures, les tissus et les produits de soin et de santé personnels incluant les écrans solaires et les cosmétiques entrent dans l'environnement d'une manière proportionnelle à leurs utilisations (Biswas and Wu, 2005). Il existe ainsi de nombreuses sources de NPs pouvant interagir avec les différents compartiments de l'environnement et perturber leurs populations animales ou végétales (Fig.8).



Figure 8. Schéma décrivant le devenir potentiel des nanoparticules (NPs) dans le milieu marin et les organismes à risque d'exposition. (extrait de Buffle *et al*, 1998)

Il est donc important de connaître le comportement de ces NPs dans l'air (agglomération, distance de transport,...), dans l'eau (agglomération, adsorption à d'autres molécules comme des polluants,...) ou encore dans les sols (adsorption aux particules du sol, biodisponibilité,...). L'étude de leurs effets sur les organismes vivants, ainsi que leur transfert trophique dans ces milieux est indissociable.

3.3. Devenir et comportement des nano-objets dans l'environnement

Il n'existe pas de résultats directs concernant le devenir et le comportement des nanomatériaux dans les systèmes aquatiques et terrestres. Néanmoins ceci est en plein développement. Il a été indiqué que les plus petites nanoparticules (< 10 nm) représentent les fractions les plus pertinentes où les propriétés changent dramatiquement (Madden *et al*, 2006).

Pour les colloïdes d'origine naturelle, leur devenir et comportement sont dominés par l'agrégation formant des particules >1µm, leur transport se fait par sédimentation (Gustafsson and Gschwemd, 1997 ; Buffle and Leppard, 1995, fig I.A.9). Les nanoparticules ont tendance aussi à sédimenter après agrégation ce qui contribue à leur accumulation dans les compartiments sédimentaires. D'autres facteurs comme le mouvement des organismes benthiques et la bioturbation du sédiment peuvent modifier leur répartition (Harrison *et al*, 2003). Les NPs et les colloïdes naturels peuvent interagir et par conséquent affecter le comportement des nanomatériaux. Un modèle de boîte simple basé sur de nombreuses hypothèses simplificatrices a indiqué que quelques nanoparticules comme celle d'argent, d'oxyde de titanium, cérium ou zinc pourraient être présentes en milieu aquatique naturel à des concentrations de 1 à 10 µg/L (Boxall *et al*, 2007).

3.4. Les effets des nano-objets sur les organismes biologiques et l'environnement

Les approches classiques d'évaluation des risques peuvent être moins aisément applicables pour les nanomatériaux puisque ces approches dépendent de la prédiction des fractions solubles des contaminants (Klaine *et al*, 1996). La caractérisation du devenir et du comportement des NPs dans l'environnement est très importante pour pouvoir étudier les scénarios d'exposition, et implique la connaissance des différences de spéciation (fractions dissoute, colloïdale et particulaire) dues aux phénomènes de dissolution et d'agrégation des NPs sous l'effet des conditions environnementales.

Les propriétés particulières des nanomatériaux ont fait émerger des questionnements de la part des instances dirigeantes et des particuliers, quant à leur impact sur l'environnement et les populations. De plus, leurs effets dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques comme leur taille, leur forme, leur structure cristalline ou encore leur composition chimique.

Les nanoparticules manufacturées représentent un état supramoléculaire intermédiaire de la matière entre le matériau en vrac et sa forme moléculaire. Ces molécules ont montré une forte interaction avec les membranes cellulaires *in vitro*, déterminée par leur réactivité et chimie de surface (Hoet *et al*, 2002). Tous ces critères peuvent moduler les effets toxiques provoqués par les NPs. Ainsi, des matériaux qui auraient la même composition chimique mais avec des tailles ou des formes différentes produiraient également des effets différents sur les organismes. Cette grande diversité de propriétés rend difficile l'évaluation de l'impact des NPs sur la santé et sur l'environnement.

De nombreuses études prouvent que les nanomatériaux ont un effet délétère sur les écosystèmes. Leur biodisponibilité varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu récepteur (eau, sol, air). Le type d'effets toxiques observés varie selon le modèle biologique, le nanomatériau et ses caractéristiques physico-chimiques, le milieu d'exposition ou encore le mode de préparation. Il est ainsi très difficile de comparer les études entre elles pour en tirer des conclusions générales sur le risque associé à la dissémination des nanomatériaux dans l'environnement. De même, il n'est toujours pas possible d'imputer les effets toxiques d'une NP à l'une de ses caractéristiques physico-chimiques (diamètre nominal, diamètre hydrodynamique, phase cristalline, forme,...).

Très souvent les études comparent la toxicité des nanomatériaux aux ions qui proviendraient de la dissolution de la particule dans le milieu ainsi qu'à la particule
de taille micrométrique correspondante. Différents mécanismes peuvent conduire aux effets toxiques observés, ils varient selon la composition chimique des nanomatériaux. Ainsi, pour des NPs à base de zinc ou d'argent une partie des effets est imputable à la dissolution de la NP alors que ce n'est pas le cas pour des NPs inertes comme celle de TiO_2 et d'or. La proportion d'effets toxiques imputables aux ions et aux NPs varie selon le nanomatériau considéré. De plus, il apparaît que les NPs sont plus toxiques que les microparticules. La toxicité peut être «directe» entrainant une augmentation de la mortalité, des dommages à l'ADN, des malformations ou encore des problèmes de reproduction. Dans de nombreux cas, un des mécanismes mis en avant est la génération d'un stress oxydant par les nanomatériaux. La toxicité peut aussi être « indirecte », c'est-à-dire que la présence de nanomatériaux dans le milieu empêche l'accomplissement dans de bonnes conditions de processus biologiques indispensables à la survie de l'organisme (nutrition, photosynthèse). Les nanomatériaux peuvent être internalisés dans les organismes et entrer ainsi dans la chaîne alimentaire. La plupart des auteurs mettent en évidence une toxicité des nanomatériaux même si les mécanismes restent encore à élucider. Néanmoins, il faut noter que la majorité de ces premières études a été réalisée dans des conditions de laboratoire très éloignées de conditions environnementales. Ainsi, les concentrations testées sont souvent très supérieures à celles attendues dans l'environnement (Gottschalk et al, 2009).

Ce sont des polluants potentiels de tous les milieux : air (Quadros and Marr, 2010) et eau, mais aussi sol et réseau trophique, via la bioaccumulation, que ce soit seuls, en groupe ou en synergie avec d'autres polluants. De plus, ces nanoparticules sont souvent plus toxiques et écotoxiques que leurs homologues de taille supérieure. La très grande surface d'échange des nanoparticules peut entraîner la production directe des radicaux spécifique de l'oxygène (ROS): ce qui peut causer des dommages dans les cellules en attaquant l'ADN, les protéines et les membranes (Brown *et al*, 2001).

En outre, la tendance naturelle de nombreuses nanoparticules à fixer les métaux et les polluants chimiques organiques est soupçonné d'augmenter la toxicité de certaines nanoparticules (Cheng *et al*, 2004; Gilliland *et al*, 2004). Par ailleurs, l'aptitude des particules à pénétrer dans les cellules (par exemple, via l'endocytose en phase fluide et cavéole; Fig.7) offre des itinéraires potentiels pour la livraison de nanoparticules associés aux polluants toxiques vers (Berry *et al*, 2004; Lacava *et al*, 2003; Na *et al*, 2003; Panyam and Labhasetwar, 2003; Panyam *et al*, 2003; Pelkmans and Helenius, 2002).

3.5. Les mécanismes d'action des nanoparticules

Les nanoparticules induisent des effets toxicologiques qui reposent sur des mécanismes liés à l'inflammation et au stress oxydant. Ce dernier est à l'origine de la formation de radicaux libres. Ces substances très réactives, et parfois présentes en grande quantité, peuvent altérer les tissus biologiques environnants si les mécanismes antioxydants de l'organisme n'ont pas la capacité suffisante pour les inactiver. En parallèle l'inflammation, qui est un mécanisme de défense de l'organisme, doit se résorber spontanément. Si ce n'est pas le cas, elle peut entraîner un dysfonctionnement de l'organe où siège la réaction ou se développer à distance, dans d'autres organes, par l'intermédiaire de la sécrétion de médiateurs⁶. Les mécanismes des nanomatériaux se traduisent par : la perturbation de la membrane, l'oxydation des protéines, la génotoxicité, l'interruption de la transduction de l'énergie, formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la libération de constituants toxique (Fig.9). Les nanomatériaux de la forme hydroxylée du C₆₀ génèrent de l'oxygène réactif qui peut se comporter comme un agent oxydant potentiel (Pickering and Wiesner, 2005), ou provoquer une peroxydation lipidique et des dommages cellulaires (Kai et al, 2003).

⁶ http://www.ineris.fr



Figure 9. Les mécanismes possibles toxicité des nanomatériaux chez les bactéries (Klaine et al, 2008)

Les nanoparticules d'argent altèrent les propriétés des membranes en affectant la perméabilité et la respiration cellulaire ; en effet, ils peuvent pénétrer à l'intérieur des bactéries et causer des dommages à l'ADN (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). Les espèces réactives oxygénées libérées par les nanomatériaux peuvent causer indirectement l'oxydation et la déstabilisation des protéines ; en effet, les ROS peuvent contribuer à la formation de ponts disulfures avec les thiols libres des protéines conduisant à la perturbation de la structure et la fonction de ces dernières (Tsai *et al*, 2007). Les dommages à l'ADN provoqués par les nanomatériaux peuvent être directs ou indirects par l'intermédiaire des ROS; les fullerènes se lient à l'ADN et provoquent la déformation des brins ce qui agit sur la stabilité et la fonction de l'ADN (Takenaka *et al*, 1999 ; Zhao *et al*, 2005).

Le processus de transport des électrons et de phosphorylation de l'ADP en ATP ainsi que la transformation de l'énergie peut être interrompu si l'intégrité de la membrane est compromise. Il a été signalé que les dérivés de fullerènes inhibaient la respiration chez la bactérie *E.coli* (Mashino *et al*, 1999 ; 2003). Les nanoparticules de dioxyde de cérium oxydent les constituants de la membrane responsables du transport des électrons de la chaine respiratoire et causent des atteintes cytotoxiques (Thill *et al*, 2006).

Quelques NMs peuvent causer des atteintes toxiques en libérant des constituants dangereux comme les métaux lourds et les ions. L'absorption des nanocristaux provoque une accumulation dans les cellules de métaux potentiellement toxiques. Il a été démontré que la libération des ions d'argent était responsable de la toxicité des nanoparticules d'argent, les ions d'argent interagissent avec les groupements thiols des protéines provoquant ainsi une inactivation des enzymes (Matsumura *et al*, 2003)

Il a été aussi démontré que les nanoparticules d'or (12 et 50 nm) et de sulfure de cadmium (8 et 50 nm) pouvaient causer des perturbations de la respiration mitochondriale dans le cerveau et le muscle du poisson zébre lors d'une contamination par voie trophique (Geffroy *et al*, 2011 ; Ladhar *et al*, 2014).

Tableau 2. Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux (www.inrs.fr)					
F	Facteurs liés aux nanoparticules qui déterminent leur toxicité				
Composition chimique	La nature des nanoparticules (notamment métallique), ainsi que la présence d composés chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques e les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbes sur leur surface, son susceptibles d'influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d'espèces réactive de l'oxygène				
Taille	Une diminution de la taille des particules ou des fibres favorise leur pénétration dans les cellules et leur migration dans l'organisme.				
Surface	La surface spécifique d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Or, la réactivité chimique d'une particule dépend de sa surface. Ainsi, une diminution de la taille des particules et des fibres induit une augmentation de leur surface spécifique et donc une augmentation de leur réactivité chimique. De plus, la surface des nanoparticules joue un rôle fondamental dans les contacts et les interactions avec les différents tissus et cellules. Elle favorise également la pénétration de certaines substances dans l'organisme : celles-ci sont adsorbées et peuvent atteindre divers sites.				
Nombre	L'augmentation du nombre favorise la pénétration des nanoparticules dans l'organisme.				
Forme	La toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nanoparticules. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique. Cet effet est notable pour les particules avec une longueur supérieure à 8 μ m et un diamètre inférieur à 0,25 μ m, indépendamment de leur composition chimique.				
Structure	La cristallinité, pour les composes minéraux (comme la silice ou le titane), peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des nanoparticules.				
Solubilité	La dissolution constitue une étape critique dans la détermination du devenir des nanoparticules dans l'organisme.				
Degrés d'agrégation et d'agglomération	Dans les faits, les nanoparticules individuelles existent rarement. Aussitôt formées au cours des divers procèdes, elles ont une tendance naturelle à s'unir de façon irréversible pour donner naissance à des structures secondaires nommées agrégats. Sous certaines conditions, les agrégats peuvent à leur tour se lier pour former des structures tertiaires réversibles nommées agglomérats dont la taille peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nanoparticules dans l'organisme, leur pénétration dans ou à travers les cellules et leurs effets biologiques.				

B. NANOPARTICULES : POTENTIEL CONTAMINANT DES SYSTÉMES AQUATIQUES

Une grande partie de ce que nous savons sur le comportement des nanoparticules dans les systèmes biologiques est issue des enquêtes biomédicales, de l'injection directe, l'ingestion ou l'inhalation atmosphérique; et de leur pathologie ultérieure (Howard, 2004; Société royale et Royal Academy of Engineering, 2004). Par conséquent, la libération des nanoparticules dans l'environnement et particulièrement dans les systèmes aquatiques soulève plusieurs questionnements.

1. Les nanoparticules et les eaux de surface/les sédiments

Les produits industriels et les déchets ont tendance à se retrouver dans les cours d'eau (par exemple, dans les fossés de drainage, les rivières, les lacs, les estuaires et les eaux côtières) (Daughton, 2004; Moore, 2002; Moore et al, 2004). Au moment où les industries de la nanotechnologie commencent à augmenter l'échelle de production, la contamination des milieux aquatiques devient inévitable (Daughton, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Moore et al, 2004; Royal Society et Royal Academy of Engineering, 2004). En effet, des nanomatériaux peuvent potentiellement être libérés dans les eaux de surface suite au lessivage de sols contaminés, par le dépôt de particules transportées par voie atmosphérique ou suite à un déversement accidentel. Dans les eaux, la structure physique des nanomatériaux peut être modifiée. Ils peuvent ainsi subir des phénomènes de dissolution, d'agglomération ou d'adsorption qui vont modifier leur surface et donc leurs propriétés. Dans les eaux, la structure physique des nanomatériaux peut être modifiée. Ils peuvent ainsi subir des phénomènes de dissolution, d'agglomération ou d'adsorption qui vont modifier leur surface et donc leurs propriétés (Fig.10).



Figure 10. Phénomènes pouvant altérer les nanoparticules dans l'environnement

(I) : ion chargé + ou -

Une fois dans les eaux de surface, certaines substances chimiques potentiellement toxiques (métaux lourds, HAP, divers pesticides) peuvent s'**adsorber** à leur surface et ainsi voir leur mobilité dans l'environnement modifiée.

Une étude sur les sédiments de la baie du Xiamen en Chine a montré que ces sédiments contenaient jusqu'à 2,74 g Ti/kg, en grande partie sous forme d'agglomérats de 300 nm composés de NPs d'une cinquantaine de nanomètres. L'autre fraction est composée d'agglomérats d'une taille de 300 à 700 nm et est plutôt attribuable au titane naturel (Luo *et al*, 2011). De plus, la distribution du titane dans les sédiments est corrélée positivement à celle d'éléments tels que le plomb ou le zinc, ce qui va dans le sens de l'adsorption de polluants à la surface des NPs. Dans ce cas, les nanomatériaux pourraient jouer le rôle de vecteur.

2. Biodisponibilité et caractéristiques des nanoparticules en milieu aquatique

Dans les eaux naturelles, les nanomatériaux ont également tendance à s'**agglomérer** selon les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Slaveykova and Startchev, 2009 ; Bian *et al*, 2011; Chinnapongse *et al*, 2011; Manciulea *et al*, 2009 ; Van Hoecke *et al*, 2011). L'agglomération est possible lorsque les forces de répulsion entre les particules de même charge diminuent. Ce phénomène peut être évalué par la mesure du potentiel zêta. Le potentiel zêta (ζ) représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en suspension, il est exprimé en mV. Plus le potentiel zêta est élevé en valeur absolue, moins les particules ont tendance à s'agglomérer. Au contraire, plus le potentiel zêta est proche de zéro, plus les particules ont tendance à s'agglomérer. Plus la force ionique de l'eau est élevée, plus les nanomatériaux ont tendance à s'agglomérer. Par exemple, plus on ajoute de NaCl au milieu plus les NPs de ZnO ont un potentiel zêta proche de zéro et donc s'agglomèrent puis sédimentent (Bian *et al*, 2011). De même, l'ajout d'acides humiques réduit le potentiel zêta des NPs.

Les nanomatériaux dans les eaux naturelles ont donc tendance à sédimenter et à s'accumuler dans les sédiments (Bian *et al*, 2011). Un autre phénomène pouvant altérer les nanomatériaux est la **dissolution**. Certains nanomatériaux sont plus sujets à ce processus comme les NPs d'argent ou d'oxyde de zinc. Ainsi, 1000 mg/L de NPs de ZnO de 4 nm entrainent l'apparition de 57 mg/L d'ions Zn²⁺ (à pH 7,5). Plus la NP est petite, plus le phénomène de dissolution est important (Bian *et al*, 2011). Les ions relargués peuvent être à l'origine d'effets toxiques supplémentaires. Enfin, les nanomatériaux peuvent aussi être impliqués dans des réactions d'oxydo-réduction ou d'hydrolyse.

Les colloïdes (substances humiques), les virus et les bactéries et leur association avec les organismes et les particules des sédiments déposés ou en suspension influencent la toxicologie des NPs (Daughton, 2004; Moore *et al*, 2004; Orlanducci *et al*, 2004; Readman *et al*, 1984; Smedes, 1994). Les particules en suspension du sédiment sont connus pour jouer un rôle important dans la séquestration et le transport des contaminants chimiques sur d'importantes distances, aussi les caractéristiques hydrodynamiques et morphologiques des organismes de zones d'eau et des zones côtières déterminent en grande partie la distribution des nanoparticules liées (Smedes, 1994). Dans un contexte estuarien et marin, nous devons également tenir compte et spécifier le rôle de la microcouche se trouvant en surface de la mer, avec ses lipides, glucides et composés protéiques, qui vont influencer le comportement de nanoparticules (Wurl and Obbard, 2004).

L'absorption des nanoparticules par les organismes aquatiques est une préoccupation importante. Des voies d'absorption potentielles peuvent être l'ingestion directe ou le passage par les barrières épithéliales telles que les branchies, les organes olfactifs ou les parois des membranes. Au niveau cellulaire, les bactéries peuvent éviter l'absorption et l'entrée des nanomatériaux, en raison de l'absence de mécanisme de transport des matériaux et des nanoparticules à travers les cellules.

44

Cependant, avec les eucaryotes (protistes et métazoaires), la situation est très différente, car ils ont développé un mécanisme d'internalisation cellulaire des matériaux nanométriques (100 nm ou moins) et microscopiques (100 nm jusqu'à 100 μ m) particules, à savoir l'endocytose et la phagocytose, respectivement. (Na *et al*, 2003; Panyam and Labhasetwar, 2003; Panyam *et al*, 2003; Pelkmans and Helenius, 2002; Reiman *et al*, 2004). Ces mécanismes font partie intégrante des fonctions physiologiques telles que la digestion intracellulaire et l'immunité cellulaire.

Chez les invertébrés, le système immunitaire cellulaire, l'épithélium de l'intestin et l'hépatopancréas (glande digestive) sont susceptibles d'être ciblés (Moore, 1990). L'hépatopancréas est impliqué dans l'absorption, la digestion des aliments et le stockage des réserves nutritives et est souvent spécialisé dans la digestion intracellulaire des lysosomes alimentaire via l'internalisation par endocytose (Bayne and Moore, 1998; Moore, 1990, 2002 ; Moore *et al*, 2004; Owen, 1970).

Chez les poissons, le foie est une cible probable après le transport à travers l'épithélium intestinal dans le système sanguin et l'endocytose dans les hépatocytes (Smedsrud *et al*, 1984). Oberdörster (2004a) émis l'hypothèse que les fullerènes C60 pénètrent dans le cerveau des achigans à grande bouche (perche noire) via le nerf olfactif.

3. Impacts des nanoparticules sur les organismes aquatiques

La contamination des milieux aquatiques signifie aussi la contamination des organismes y résidant; plusieurs recherches ont été investies dans le but de connaitre les impacts de ces produits sur les différentes espèces aquatiques (Tableau .3) détaille quelques recherches impliquant la contamination aux nanoparticules et leurs effets sur les organismes vivants) :

3.1. Impacts des nanoparticules sur les bactéries aquatiques

Il a été démontré que les nanoparticules pouvaient avoir un effet délétère sur la survie des bactéries (Chatterjee *et al*, 2010; Dasari and Hwang, 2010; Fang *et al*, 2010; Strigul *et al*, 2009; Zeyons *et al*, 2009). Les nanoparticules de bore et d'aluminium provoquaient une diminution de la survie des bactéries *Vibrio fischeri* avec des concentrations de l'ordre de 56 et 66 mg/L (Strigul *et al*, 2009), des dommages morphologiques ont été observés chez la bactérie *Nitrosomonas europaea* après exposition à des nanoparticles d'oxyde de zinc (Fang *et al*, 2010). D'autres effets toxiques ont été observés après exposition d'*Escherichia coli* aux NPs de CeO₂ se traduisant par une mortalité élevée alors que les nanoparticules ont été seulement adsorbées à la surface, à l'inverse la bactérie *Synechocystis sp* n'a pas été très perturbée, probablement en raison des substances exopolymériques secrétées qui pourraient la protéger du milieu extérieur et donc des contacts avec les NPs (Zeyons *et al*, 2009).

3.2. Impacts des nanoparticules sur les algues

Les algues sont très sensibles aux expositions de nanomatériaux. Ces derniers peuvent entraîner une augmentation de la mortalité (Aruoja *et al*, 2009; Brayner *et al*, 2010; Miao *et al*, 2010), des retards de croissance (Gong *et al*, 2011; Gubbins *et al*, 2011; Hartmann *et al*, 2010; Peng *et al*, 2011; Wei *et al*, 2010b), une baisse de la photosynthèse (Bhattacharya *et al*, 2010; Brayner *et al*, 2011; Gong *et al*, 2011; Lin *et al*, 2009; Shi *et al*, 2011; Wei *et al*, 2010b) et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Wei *et al*, 2010b; Bhattacharya *et al*, 2010). La toxicité des nanoparticules peut varier en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Certains auteurs ont mis en évidence l'influence des agents de synthèse (Brayner *et al*, 2010), le diamètre nominal (Hund-Rinke and Simon, 2006), la forme (Peng *et al*, 2011) ou encore l'enrobage (Xu *et al*, 2010).

En effet, selon les nanomatériaux les effets toxiques peuvent être attribués à la dissolution des nanomatériaux dans le milieu (Aruoja et al, 2009; Gong et al, 2011; Miao et al, 2009; Xu et al, 2010). À l'inverse, certaines études montrent que la forme nanoparticulaire est plus toxique que la forme ionique; chez Pseudokirchnerilla subcapitata, la concentration efficace mediane (CE50) des NPs de TiO₂ est de 5,83 mg/L contre 35,9 mg/L pour la forme micrométrique (Aruoja *et al*, 2009). Les effets toxiques sont parfois expliqués par l'adsorption des nanomatériaux à la surface des algues (Aruoja et al, 2009; Bhattacharya et al, 2010; Gong et al, 2011; Lin et al, 2009b; Wei et al, 2010a) voire même leur internalisation (Brayner et al, 2010; Miao et al, 2010; Shi et al, 2011). Dans le cas de l'algue unicellulaire *Scenedesmus*, les NPs de polystyrène s'adsorbent sur toute la surface de l'algue générant des troubles de la photosynthèse (Bhattacharya et al, 2010). En comparant l'effet de NPs de ZnO sur des algues Euglena gracilis et Anabaena flosaquae, des chercheurs ont mis en evidence une toxicité plus importante envers E. gracilis. A la difference d'Anabaena, cette algue ne sécrète pas d'exopolysaccharides qui limitent l'adsorption des nanomatériaux à sa surface et donc leur internalisation (Brayner et al, 2010). Ainsi, certaines algues sont capables de sécréter des substances pour se protéger efficacement des effets des nanomatériaux (Miao et al, 2009).

3.3. Impacts des nanoparticules sur les invertébrés

De nombreuses études ont été menées sur la puce d'eau *Daphnia magna*, et se sont intéressées à la comparaison des effets entre nanomatériaux, ions et matériaux micrométriques (Blinova *et al*, 2010; Dabrunz *et al*, 2011; Poynton *et al*, 2011; Wiench *et al*, 2009; Zhao and Wang, 2010) ou bien à l'influence des caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux (Wiench *et al*, 2009; Kim *et al*, 2010; Li *et al*, 2010; Strigul *et al*, 2009; Garcia *et al*, 2011) et de leur mode de préparation (Wiench *et al*, 2009; Lee *et al*, 2010).

Les nanomatériaux induisent l'augmentation de la mortalité, altèrent la reproduction, modifient le comportement ou encore induisent des malformations chez la daphnie (Dabrunz et al, 2011; Wiench et al, 2009; Garcia et al, 2011; Hall et al, 2009; Kim et al, 2010; Zhu et al, 2010). Comme pour les bactéries et les algues, les effets physiques (tels que l'obstruction du tube digestif) expliquent en partie la toxicité des nanomatériaux (Blinova et al, 2010; Dabrunz et al, 2011; Kim et al, 2010; Zhu et al, 2010). En effet, les daphnies ingurgitent de grandes quantités de nanomatériaux qui viennent bloquer l'assimilation des nutriments (Zhao and Wang, 2010; Zhu et al, 2010). De plus, les daphnies qui ingèrent des NPs de TiO₂, par exemple, ne l'éliminent pas facilement et les NPs se trouvent donc concentrées dans cet organisme (Zhu et al, 2010). Cette bioaccumulation peut conduire à la bioamplification, c'est-à-dire à l'augmentation de la teneur en toxique d'un maillon de la chaine alimentaire à l'autre. Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer les effets toxiques des nanomatériaux on trouve le stress oxydant (Kim et al, 2010; Li et al, 2011). Chez les daphnies exposées à des NPs de TiO₂ l'activité des enzymes antioxydantes comme la catalase, la glutathionperoxydase (GPX) et la glutathion-S-transférase (GST) augmente avec la concentration de NPs (Kim et al, 2010). D'autre part, des effets génotoxiques ont été également mis en évidence sur ce modèle biologique lors de l'exposition aux NPs de CeO₂ sous forme de fractionnement de leur ADN en parallèle de l'augmentation de la mortalité (Lee *et al*, 2009).

Plusieurs études relatent les effets toxiques des nanomatériaux sur la moule (*Mytilus edulis* et *galloprovincialis*) (Canesi *et al*, 2008; 2010a; 2010b; Tedesco *et al*, 2010). Des chercheurs ont démontré sur cet organisme que les nanomatériaux pénétraient par la glande digestive et à partir de là, provoquaient des dégâts dans tout l'organisme tels que l'induction de processus inflammatoires (Canesi *et al*, 2008) ou l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress (Canesi *et al*, 2010a) ou encore l'augmentation de l'activité des enzymes

antioxydantes et de la peroxydation lipidique (Canesi *et al*, 2010b; Tedesco *et al*, 2010). L'impact de NPs sur les escargots d'eau douce (Croteau *et al*, 2011; Musee *et al*, 2010), sur les cnidaires (Yeo and Kang, 2010) et sur les polychètes (Galloway *et al*, 2010) a également été étudié mettant en évidence des effets toxiques à travers une diminution de la nutrition et une augmentation du nombre de malformations, de stress oxydant, et des dommages à l'ADN corrélés à une augmentation de la mortalité.

Chez les deux invertébrés marins *Scrobicularia plana* et *Hediste diversicolor*, plusieurs nanoparticules métalliques ont été testé tels que l'oxyde de cuivre (CuO), l'argent (Ag), l'oxyde de zinc (ZnO) et l'or (Au), des effets ont été observé sur la bioaccumulation, le genotoxicité et le comportement des deux organismes (nutrition et creusement des terriers). (Buffet *et al*, 2011 ; Buffet *et al*, 2012 a,b ; Buffet *et al*, 2013 a,b ; Buffet *et al*, 2014 a,b ; Cong *et al*, 2011 and Garcia-Alonzo *et al*, 2011)

Une équipe de chercheurs a mis en évidence l'effet vecteur de pollution des NPs de TiO₂ sur l'ormeau. Les NPs de TiO₂ (2 mg/L) génèrent peu d'effets toxiques sur les ormeaux. En revanche, le tributyltin (TBT), un biocide bien connu, provoquent des effets toxiques chez cet organisme. Les CE50 déterminées lors d'une exposition au TBT se trouvent divisées par 20 lorsque des NPs de TiO₂ se trouvent également dans le milieu. En parallèle, l'accumulation de cette molécule est également accrue en présence de NPs de TiO₂. De plus, ces NPs de TiO₂ sont accumulées dans l'embryon (Zhu *et al*, 2010). Tous ces éléments illustrent le rôle de vecteur de pollution que peuvent jouer les nanomatériaux lorsque des agents chimiques s'adsorbent à leur surface.

3. 4. Impacts des nanoparticules sur les poissons

Au sommet de la chaîne trophique du milieu aquatique on trouve les poissons, qui subisent les mêmes effets que les autres organismes après exposition aux nanomatériaux : mortalité et perturbation du développement avec l'apparition de malformations (Asharani *et al*, 2011; Bai *et al*, 2010; George *et al*, 2011;

Paterson *et al*, 2011; Powers *et al*, 2010; Wise *et al*, 2010; Wu *et al*, 2010; Xiong *et al*, 2011). Les phénomènes de dissolution, agglomération et sédimentation des nanomatériaux sont toujours évoqués comme modulateurs des effets toxiques (Bai *et al*, 2010; Laban *et al*, 2010; Xiong *et al*, 2011; Chae *et al*, 2009; Choi *et al*, 2010b; Xia *et al*, 2011). Comme pour les autres organismes, les effets observés dépendent de la nature chimique des NPs. Les NPs d'argent entraînent des malformations très marquées sur l'embryon de poisson-zèbre alors que les effets des NPs d'or ou de platine sont peu visibles (Asharani *et al*, 2011; Wang *et al*, 2010). L'implication du stress oxydant a largement été mentionnée comme mécanisme responsable de la toxicité des NPs (George *et al*, 2011; Xiong *et al*, 2011; Chae *et al*, 2009; Choi *et al*, 2010b; Fraser *et al*, 2011; Hao *et al*, 2009; Jovanovic *et al*, 2011). Cet effet est particulièrement bien illustré dans une étude de l'impact des NPs de TiO₂ sur de jeunes carpes (Hao *et al*, 2009).

Les chercheurs ont ainsi montré des modulations de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification des métaux ou dans la régulation du stress oxydant (Chae *et al*, 2009). Une autre équipe a étudié la présence des protéines p53 et γ -H2AX qui sont indicatrices de l'expression de gènes impliqués respectivement dans la régulation de stress cellulaires (comme l'apoptose) et le repérage de cassures double-brins de l'ADN. Après une exposition à des NPs d'argent, ces deux protéines voient leur production augmenter en réponse au stress engendré par les NPs (Choi *et al*, 2010b).

L'impact des nanomatériaux sur l'expression des gènes chez le poisson a fait l'objet d'études plus poussées que sur les autres espèces aquatiques (Chae *et al*, 2009; Choi *et al*, 2010; Jovanovic *et al*, 2011; Park *et al*, 2010 ; Geffroy *et al*, 2011 ; Ladhar *et al*, 2013).

3.5. Impacts des nanoparticules sur d'autres organismes aquatiques

Les amphibiens qui partagent leur vie entre milieu aquatique et terrestre ont également fait l'objet de quelques études. Les NPs de diamant provoquent des effets toxiques selon la fonctionnalisation de leur surface (Marcon *et al*, 2010). A l'inverse, les NTC double-parois n'ont que peu d'effets sur la viabilité de deux amphibiens. En effet, les effets constatés sont liés à l'accumulation de nanotubes dans l'intestin des animaux qui limitent leur nutrition. En revanche, ils ne causent pas de dommages à l'ADN (Mouchet *et al*, 2007; 2008).

3.6. Impacts des nanoparticules sur la chaîne trophique aquatique

Les études tendent de plus en plus à se complexifier pour se rapprocher des conditions environnementales et à intégrer plus d'organismes pour recréer un écosystème. Dans ce cadre, une étude a été réalisée sur un mésocosme aquatique dans lequel des NPs d'or ont été disséminées dans de l'eau de mer. Après 12 jours, l'or est dosé dans les différents éléments du mésocosme. Il est majoritairement retrouvé dans le biofilm et les palourdes (Ferry *et al*, 2009). Ainsi, une contamination aux NPs dans un écosystème n'épargne aucun maillon et chaque maillon peut ensuite contribuer à contaminer un niveau supérieur de la chaîne trophique.

Tableau	Tableau 3. Quelques études toxicologiques et écotoxicologiques traitant les nanoparticules métalliques						
NPs	Pression et temps de contaminatio n	Enrobage et taille des NPs	Espèce	Conclusions et bioaccumulations	Références		
Ag	3,12 – 50 µg/mL <i>in</i> <i>vitro</i> ; 24h	7- 20 nm	Fibrosarcome humain et les cellules de peau / de carcinome humain	Stress oxydant et début d'apoptose	Arora <i>et al</i> , 2008		
Au	1nM, <i>in vitro</i> ; 72h	22.1 to 36 nm revêtue avec du sérum fœtal de veau	Fibroblastes pulmonaires humaines	Stress oxydant	Li <i>et al</i> , 2010		
CuO	10 -50 μg/mL, <i>in</i> <i>vitro</i> , 24h	53 nm	Cellules épithéliales pulmonaires humaines	Induction de stress oxydant potentiel effet génotoxique qui peut être médiée par le stress oxydatif	Ahamed <i>et al</i> , 2010		
ZnO, CeO ₂ et anatase TiO ₂	25 and 200 mg/L dans le milieu de culture; 4h	30 nm (ZnO); 60 nm (CeO ₂); 24 et 200 nm (anatase TiO ₂ NPs);	La bactérie: Nitrosomonas europaea	Induction de dommages morphologiques	Fang <i>et al</i> , 2010		
Ag	0.1 and 1mg/L dans le milieu de culture ; 24h	$14 \pm 6 \text{ nm}$ revêtue avec du Polyvinyle	Les bactéries autotrophes et hétérotrophes (<i>E.</i> <i>coli</i> PHL628-gfp)	Inhibition de la croissance de la bactérie <i>E.coli</i> , effet des AgNPs sur l'intégrité de la membrane cellulaire	Choi <i>et al</i> , 2008		
Ag	20, 200 and 2000 µg/L dans le milieu de culture ; 4- 24h	65 ± 30 nm revêtue de citrate	La bactérie : Pseudomonas putida	Les taux d'absorption des nanoparticules étaient de 2,12, 1,2 et 9,9 µg pour les 3 concentrations de AgNPs	Fabrega <i>et al</i> , 2009		
Ag	0.2- 33 nM dans le milieu de culture ; 24h	13.5 ± 2.6 nm revêtue de sodium borohydride;	Les bactéries : Escherichia coli et staphylococcus aureus	La croissance de <i>E. coli</i> a été inhibée aux concentrations faibles de AgNPs, alors que les effets inhibiteurs de croissance sur <i>S. aureus</i> étaient légers	Kim <i>et al</i> , 2007		
CeO ₂	240 mg/L dans le milieu de culture ; 3h	7 nm	Les bactéries : Synechocystis PCC6803 and Escherichia coli	Effets toxicologiques: <u>mécanisme direct</u> due au contact des NPs avec la membrane celluaire d' <i>E.coli</i> , <u>mécanisme indirect</u> influencé par l'acidité de l'agent stabilisant des NPs observé avec <i>Synechocystis</i> <i>PCC6803</i>	Zeyons <i>et al</i> , 2009		
CuO, ZnO et TiO ₂	CuO: 0.02, 0.05, 1.5et 6,4 mg/L ZnO: 0.05, 0.08, 0,16,	CuO: 30 nm ZnO: 50 - 70 nm TiO ₂ : 25 - 70 nm	L'algue: Pseudokirchneriel la subcapitata	Inhibition de la croissance Toxicité: ZnO > CuO > TiO ₂ (Concentration efficace mediane) CE50=5.83 mg	Aruoja <i>et al</i> , 2009		

ZnO at	0,25 and 0.48 mg/L TiO2: 5, 10, 25, 48 and 98 mg/L dans le milieu de culture ; 72h ZnO : 40	7n0 : 70 nm	Cructacás	Ti/L and 0.71 mg Cu/L). NOEC: 0.02 mgZn/L, 0.42mg Cu/L	Plinova et al
CuO	mg/L CuO : 4 mg/L dans le milieu de culture ; 24, 48h	CuO : 30 nm	Daphnia magna, Thamnocephalus platyurus et protozoan Tetrahymena thermophila	; 16 mg Zn/L , la toxicité du ZnO et CuO NPs est due aux ions solubilisés dans le milieu	2010
ZnO	10 ⁻³ M dans le milieu de culture ; 4 semaines	Particules sans revêtement et d'autres revêtues d'agents de protection : TOPO et Brij- 76	L'organisme protiste <i>Euglena</i> gracilis	Variation de l'activité photosynthétique, induction de la mort cellulaire et l'internalisation des particules	Brayner <i>et al</i> , 2010
Ag	16,7, 83,3, et 416,3 μM dans le milieu de culture ; 20 jours	1-35 nm, revêtue avec des ligands hydrophiles (polyacrylate de sodium)	Phytoplankton: Ochromonas danica	Absorption des nanoparticules dans les cellules, cette dernière est à l'origine de la toxicité observée (croissance des cellules)*	Miao <i>et al</i> , 2010
NiO	0,10, 15, 20,30, 40 and 50 mg/dans le milieu de culture, 24, 48, 72, 96 et 120h	20 nm	L'algue verte : <i>Chlorella vulgaris</i>	EC 50 à 72h est de 32,28 mg/L Inhibition de la croissance, plasmolyse, rupture de membrane cellulaire, et la diminution de l'activité photosynthétique*	Gong <i>et al</i> , 2011
Nanotu be de carbon e à parois multipl es (C)	0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 et 10 mg/L, dans le milieu de culture; 24h	20 –30 nm	L'algue verte: Dunaliella tertiolecta	Inhibition de la croissance, EC50 de croissance à 96-h est 0.82±0.08mg/L, production d'éspéces reactives àl'oxygéne (ROS)*	Wei <i>et al</i> , 2010b
Ag	2, 10, 40, 160 et 500 µg/L par voie hydrique, 20, 100 et 500 µg/L par voie alimentaire ;	20 nm, sans revêtement et revêtue avec la cystéine ; AgNPs Radioactive	Le crustacé : Daphnia magna	Augmentation de l'accumulation de AgNPs dans les organismes et peut atteindre 50 µg/g (dw) après une exposition de 8h à 40 µg/L	Zhao and wang, 2010

	246401				
	2, 4, 6 et 8 h				
CeO ₂ , SiO ₂ et TiO ₂	1 mg/L par voie hydrique; 24 et 96h	CeO ₂ : 15-30 nm, SiO ₂ : 7-10 nm et TiO ₂ : 7- 20 nm	Le crustacé : Daphnia magna et l'insecte Chironomus riparius	CeO ₂ induit des dommages à l'ADN	Lee <i>et al</i> , 2009a
TiO ₂ et ZnO	Tests de toxicité (1, 10 et 100 mg/L), tests de reproduction (1, 3, 10,30 et 100 mg/L) 48h et 21 days; voie hydrique.	Nanoparticules sans revêtement et revêtue; ZnO(< 100, <200 nm) Ti0 ₂ (25 nm et L:50,W:10 nm)	Le crustacé : Daphnia magna	Effets des ZnONPs sur la mobilité de <i>D. magna</i>	Wiench <i>et al</i> , 2009
CuO	0.5, 4, 50 et 175 mg/L ; 48h; par voie hydrique	31 ± 12.8 nm	Le crustacé : Daphnia magna	Changements ultrastructuraux dans l'intestin moyen, la solubization peut expliquer une partie de la toxicité	Heinlaan <i>et</i> <i>al</i> , 2011
Ag	5 – 400 mg/L ; par voie hydrique; 48h	<100 nm and <150 nm sans revêtement	Le crustacé : Daphnia magna	toxicité induite par les nanoparticules est similaire à celle de la forme ionique	Allen <i>et al</i> , 2010
C60, TiO ₂	0.5 – 500 mg/L par voie hydrique; 24h	20 – 200 nm, sans revêtement ou revêtue avec du Tetrahydrofuran	Le crustacé : <i>Daphnia pulex</i>	Production de biomarqueurs de toxicité (GST et CAT) indiquant les variations des in ROS. La fonctionalisation des NPs modifie la toxicité et stress oxydant	Klaper <i>et al</i> , 2009
Au	2 – 8 mg/L ; 15 jours, par voie hydrique	7.8, 15, et 46 nm ; revêtues d'albumine de sérum bovin et de citrate	Le bivalve d'eau douce : <i>Corbicula</i> <i>fluminea</i>	Effet de la taille, la biodéposition joue un rôle dans le devenir et le transport des NPs	Hull <i>et al</i> , 2011
Au	750 μg/L, par voie hydrique; 24h	13 nm revêtue avec du citrate	Le bivalve marin : <i>Mytilus edulis</i>	Induction de stress oxydant	Tedesco <i>et al</i> , 2008
Au	750 μg/L, par voie hydrique; 24h	15.6 ± 5 nm revêtue avec du citrate	Le bivalve marin : <i>Mytilus edulis</i>	AuNPs accumulés dans la glande digestive, diminuent le niveau de thiols de protéines avec le ciblage des thiols de protéines par les ROS. Les niveaux de bioaccumulation des AuNPs étaient 61,05 µg/g	Tedesco <i>et al</i> , 2010 a

				(glande digestive), 0,52 µg /g (branchies) et 0,02 µg /g (mentau).	
Au	750 μg/L, par voie hydrique; 24h	$5.3 \pm 1.0 \text{ nm}$ sans revêtement	Le bivalve marin : <i>Mytilus edulis</i>	Stress oxydant	Tedesco <i>et al</i> , 2010 b
$\begin{array}{c} C60\\ fullere\\ ne,\\ TiO_2,\\ SiO_2 \end{array}$	1, 5, 10 μg/ml. <i>in</i> <i>vitro;</i> 30 min jusqu'à 4 h	0.7, 22 et 12 nm pour C60 fullerene, TiO_2 et SiO_2	Les hémocytes du bivalve marin : <i>Mytilus</i> galloprovincialis	Effets sur les cellules immunitaires. Les NPs induisent une la libération des lysosomes et des effets inflamatoires	Canesi <i>et al</i> , 2010 a
NBC, C60 fullere ne, TiO ₂ , SiO ₂	0.05 – 5 mg/L voie hydrique, 24h	NBC: 30nm, C60: 0.7nm, TiO ₂ : 22 nm et SiO ₂ : 12nm	Le bivalve marin : <i>Mytilus</i> galloprovincialis	Déséquilibre de la membrane lysosomiale, effet des NBC C60>TiO ₂ NP> SiO ₂ NP. Modifications dans les taux des CAT et GST	Canesi <i>et al</i> , 2010 b
Ag	0,7 μg/L voie hydrique, 3h30	20- 25 nm	Le bivalve marin : <i>Mytilus edulis</i>	Bioaccumulation de Ag dans les organes en fonction de la forme deAg.	Zuykov <i>et al</i> , 2011
CuO	10 μg/L voie hydrique, 3- 15 jours	31 ± 10 nm	Le bivalve marin : <i>Mytilus</i> galloprovincialis	Stress oxydant, peroxydation lipidique et inhibition de l'AchE	Gomes <i>et al</i> , 2011, 2012
CuO	10 μg/L voie hydrique,7 et 16 jours	10 – 100 nm sans revetement	Le bivalves marin : Scorbicularia plana et le ver aquatique Hediste divesicolor	Induction de la réponse de défense, les niveaux de bioaccumulation étaient : chez <i>S.plana</i> 7,4 µg/g et chez <i>H.diversicolor</i> 1,6 µg/g	Buffet <i>et al</i> , 2011
ZnO	3 mg/Kg exposition du sédiment, 16 jours	21-34 nm revêtue avec du diethylene glycol(DEG)	Le bivalves marin : Scorbicularia plana et le ver aquatique Hediste divesicolor	Bioaccumulation du Zn chez les deux organismes, induction du GST dans les vers, induction de la CAT chez les bivalves, le comportement fouisseur et le taux d'alimentation ont été affaiblies chez les deux organismes ; les niveaux de bioaccumulation étaient chez <i>S.plana</i> : 5 µg/g et chez <i>H.diversicolor</i> 7 µg/g.	Buffet <i>et al</i> , 2012b
Ag	10 μg/L voie hydrique et alimentaire (microalgues), 14 jours	40 – 45 nm	Le bivalves marin : <i>Scorbicularia</i> <i>plana</i>	Induction des biomarqueurs du stress oxydant (CAT, GST et SOD) plus importante lors de l'exposition alimentaire. L'activité de fouissement a été affectée par l'exposition de la nourriture aux NPs	Buffet <i>et al</i> , 2013a

Ag	10µg/L , par	40 - 45nm	Le bivalves marin	d'Ag. Les niveaux de bioaccumulation étaient $0,75 \ \mu g/g \ pour$ l'exposition hydrique et $0,25 \ \mu g/g \ pour la$ contamination par voie alimentaire. Bioaccumulation de l'Ag,	Buffet <i>et al</i> ,
	voie hydrique, 21 jours	revêtue avec du maltose	: Scorbicularia plana et le ver aquatique Hediste divesicolor	Induction de la défense contre le stress oxydant, detoxification, appoptose, genotoxicity et la modification du système immunitaire ont été observés chez les deux organismes. Les niveaux de bioaccumulation étaient chez <i>S.plana</i> : 0,24 µg/g et chez <i>H.diversicolor</i> 0,45 µg/g.	2014a
CuO	10µg/L , par voir hydrique, 21 jours	29,5 nm sans revêtement	Le ver aquatique : <i>Hediste</i> <i>divesicolor</i>	Bioaccumulation de Cu, induction du mécanisme de détoxification, apoptose et genotoxicité chez les deux organismes, les niveaux de bioaccumulation étaient chez <i>S.plana</i> : 2,8 µg/g et chez <i>H.diversicolor</i> 4 µg/g.	Buffet <i>et al</i> , 2013b
Ag	250 ng/g exposition du sédiment, 10 jours	30 ± 5 nm revêtue avec du citrate	Le ver aquatique : <i>Hediste</i> <i>divesicolor</i>	Internalisation cellulaire de l'Ag soluble et nanoparticulaire. les niveaux de bioaccumulation étaient plus élevés dans la fraction des organelles et atteignait 85 ng/g (Ag nanoparticulaire) contre 40 ng/g (Ag ionique).	Garcia- Alonzo <i>et al</i> , 2011
Ag	0 – 50 μg Ag /g exposition du sédiment; 10 jours	20 – 200 nm revêtue avec du polyvinyl pyrrolidone	Le ver aquatique: <i>Hediste</i> <i>divesicolor</i>	Effet génotoxique, les niveaux de bioaccumulation à 50 μ g Ag /g étaient 8,4 μ g /g (Ag nanoparticulaire), 7 μ g /g (Ag microparticulaire) et 10 μ g /g (Ag ionique).	Cong <i>et al</i> , 2011
Fe (valenc e zéro)	0.1 – 10 mg/L voie hydrique, 2h	50 nm revêtue avec unstabilisant organique et inorganique biodégradable	Le bivalve marin : <i>Mytilus</i> galloprovincialis	Diminution de la fertilisation, altération de l'ADN et retard de développement	Kadar <i>et al</i> , 2011

CdTe	0,4 – 4 mg /mL voire hydrique, 12 - 72h	3,2 nm revêtue avec de l'acide thioglycolique	L'hydre d'eau douce : <i>Hydra</i> <i>vulgarix</i>	Effets des CdTe dépendants du temps et de la dose, dommages morphologiques plus sévères lors de l'exposition aux formes nanométriques, apparition de faibles variations génetiques.	Ambrosone <i>et al</i> , 2012
Al ₂ O ₃	8,1, 15,6 et 23,1 mg/L, voie trophique, 48h - 10 jours		Le nématode : <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i>	Impacts sur le comportement de locomotion, stress oxydant et diminution du système de défense.	Li <i>et al</i> , 2012
CdSe/ ZnS	3,6 mg/L voie hydrique et trophique.		Amphipode estuarien : Leptocheirus plumulosus	La mortalité a augmenté lors de l'exposition des algues par rapport à la voie d'exposition hydrique.	Jackson <i>et al</i> , 2012
Ag	10 – 50 μg /L voie hydrique, 24h -96 h (1- 10 jours pour l'expression des génes)	49,6 nm sans revêtement	Le poisson d'eau douce : <i>Oryzias</i> <i>latipes</i>	Altération cellulaires et de l'ADN, stress cardiogénique et oxydant	Chae <i>et al</i> , 2009
Ag	5, 10, 25, 50 et 100 mg/L voie hydrique	5- 20 nm revetue avec du BSA	Les embryons du poisson d'eau douce : <i>Danio</i> <i>rerio</i>	Ag NPs induisent plusieurs effets toxiques tels que la mortalité, ralentissement du flux sanguin œdème péricardique et arythmie cardiaque.	Asharani <i>et</i> <i>al</i> , 2008
Au, Ag et Pt	10, 25, 50, 75 et 100 mg/L	Au NPs (15 - 35nm) Ag NPs (5-35 nm) Pt NPs (3-10 nm) revêtue avec l'alcool polyvinylique	Les embryons du poisson d'eau douce : <i>Danio</i> <i>rerio</i>	Ag NPs présentent une augmentation de la mortalité dépendante de la concentration, les Ag et Pt NPs induisent aussi une baisse de la fréquence cardiaque. Les niveaux de rétention des nanoparticules métalliques à 50 µg/ml étaient de 0,6 ± 0,07 µg/g (AuNPs), 0,2 ± 0,02 µg/g (PtNPs) et 0,71 ± 0,1 µg/g (AgNPs)	Asharani <i>et</i> <i>al</i> , 2011
Cu	0.25 and 1.5 mg/L voie hydrique, 48h	80 nm	Le poisson d'eau douce : <i>Danio</i> <i>rerio</i>	Cu NPs présentent une toxicité pour le poisson zébre, les branchies étaient le principale organe cible, les niveaux de bioaccumulation du Cu dans les branchies après 48h d'exposition à la dose	Griffitt <i>et al</i> , 2007

				sub-léthale étaient $9,1 \pm 1,3$ ng/mg (CuNPS) et $9,7 \pm 2,1$ ng/mg (Cu soluble)	
CdS	0.04 and 0.1 μg /jour/g poids du corps, voie trophique	8 (CdS1NPs) - 50 (CdS2NPs) nm	Danio rerio (Adulte)	Altération de la composition du génome, modification de l'expression des gènes impliqués dans la réponse contre le stress et le dysfonctionnement mitochondriale. Après 36 jours d'exposition à 0,1 μ g /jour/g poids de poisson, les niveaux de bioaccumulation dans le foie étaient de 85 ng/g (CdS1NPs) et 35 ng/g (CdS2NPs). Après 60 jours d'exposition à 0,04 μ g /jour/g poids de poisson, les niveaux de bioaccumulation dans le cerveau étaient 19 ± 3 ng/g (CdS1NPs) et 10 ± 3 ng/g (CdS2NPs), dans le foie 348 ± 30 ng/g (CdS1NPs) et 364 ± 30 ng/g (CdS2NPs), dans le muscle 1,8 ± 1 ng/g (CdS1NPs) et 3,1 ± 1 ng/g (CdS2NPs)	Ladhar <i>et al</i> , 2014
Au	0.04 (AuNPs1) and 0.1 µg (AuNPs2) /jour/g de poisson, voie trophique pendant 36 ou bien 60 jours	12 et 50 nm revetue de Citrate	Danio rerio (Adulte)	Modification de la composition du génome, modulation de l'expression de gènes associés à la réparation des dommages à l'ADN, processus de détoxification, apoptose, métabolisme mitochondriale et le stress oxydant. Les niveaux de bioaccumulation chez le poisson après 36 jours d'exposition dans le cerveau étaient de $4,6 \pm 2,3$ μ g/g (AuNPs1) et $4,8 \pm 1,3$ μ g/g (AuNPs2), dans le foie $3,0 \pm 2,4$ μ g/g (AuNPs1) et $6,0 \pm 4,1$ μ g/g (AuNPs2).	Geffroy <i>et al</i> , 2011

Ag, Cu, TiO ₂	100 μg/L (Ag), 1000 μg/L (Cu, TiO ₂) voie hydrique, 48h	Ag: 26.6 nm, Cu: 26.7 nm, TiO ₂ : 20.5 nm	Danio rerio (Adulte)	NPs ont un effet biologique distinct non relié à la libération d'ions métalliques solubles. Les niveaux de bioaccumulation des NPs dans les branchies étaient 9 \pm 1,8 pg/mg (Cu NPs) et 54 \pm 42 pg/mg (AgNPs) ; dans le corps entier 1,3 \pm 0,4 pg/mg (Cu NPs) et 0,48 \pm 0,2 (AgNPs).	Griffitt <i>et al</i> , 2009
Au	7.08 x 10° particules /mL, exposition hydrique en mésocosme, 12 days	65 nm x 15 nm	Spartina alterniflora, Mercenaria mercenaria,Ilyan assa obsolete, Cyprinndon variegatus, Palaemonetes pugio	AuNPs passent depuis la colonne d'eau vers la chaine trophique , les bivalves et les biofilms accumulent la majorité des NPs. La fraction des AuNPs dans le sédiment est de 24,5%.	Ferry <i>et al</i> , 2009
CdTe	0 – 8 mg/L , voie hydrique , 7h	Revetue avec du thioglycolate	La moule d'eau douce: <i>Elliptio</i> commplanata	Cd NPs ont un effets sur le niveau des metallothioneines et peuvent générer un stress oxydant. Les niveaux d'accumulation à l'exposition de 8 mg/L étaient $13 \pm 1.8 \ \mu$ g/g (glande digestive), 16 ± 1.4 μ g/g (branchies) et 5.5 \pm 0.5 μ g/g (gonades).	Peyrot <i>et al</i> , 2009
Ni	10 – 1000 mg/L dans le milieu de culture , 5 jours	28, 63 et 112 nm	Les embryons du poisson d'eau douce <i>Danio</i> <i>rerio</i>	La configuration des NPs peut affecter la toxicité plus que la taille, les formes nanoparticulaires sont moins toxique que la forme ionique. les niveaux d'accumulation des nanoparticules de 60 nm étaient 7,97 \pm 3,76 ng/embryon pour la forme sphérique et 1.69 \pm 1,29 ng/embryon pour la forme dendritique	Ipsas <i>et al</i> , 2009

C. NANOPARTICULES D'OR ET DE SULFURE DE CADMIUM

1. Les nanoparticules d'or

L'or a depuis toujours a fasciné les hommes. Par son aspect jaune et brillant, sa rareté et sa maniabilité, il a toujours fait l'objet de convoitise. L'Histoire est marquée par sa présence de l'Antiquité jusqu'à nos jours. L'or a joué un rôle important dans les civilisations anciennes, symbole de puissance, il était très utilisé en joaillerie. Aujourd'hui la production de l'or est supérieure à 2000 tonnes par an dont 75% sont consacrés à la joaillerie (www.usgs.gov).

La synthèse de solutions colloïdales de métaux nobles est connue depuis l'antiquité romaine. On les utilisait par exemple pour colorer les verres et les vitraux comme ceux de Chartres. L'une des pièces les plus connues est la coupe de Lycurgus datant du IVe siècle après JC. C'est en 1857, que Michael Faraday synthétise la première solution de nanoparticules d'or pur. Il explique alors de manière empirique comment les nanoparticules métalliques modifient la couleur des vitraux (Faraday, 1857). En 1908, G. Mie et P. Lilienfeld élabore une théorie qui explique la couleur des vitraux en fonction des tailles des nanoparticules (Mie, 1908; Lilienfeld and Mie, 1991). L'or est le deuxième métal connu par l'homme après le cuivre. Il est classifié dans la catégorie des métaux nobles avec l'argent et le platine en raison de leur résistance à la corrosion ainsi qu'à l'oxydation.

Depuis le début des années 90, on assiste à une véritable ruée vers les nanoparticules d'or (AuNPs). En effet de nombreuses publications concernant les études sur les nanoparticules d'or sont en expansion et incluent diverses applications comme la recherche contre le cancer (Service, 2005; Hainfeld *et al*, 2004), dans les pots catalytiques (Campbell, 2004), dans la connectique via des nanotubes (nanominiaturisation) (Hopkins *et al*, 2005; Ferry, 2008).



Figure 11. Utilisations des nanoparticules d'or (produits contenants des nanoparticules d'or) : a. Boisson énergisante; b. Crème pour les cheveux (lissage aux nanoparticules d'or) ; c. Crème pour les yeux ; d. Dentifrice ; e. Parfum ; f. Test de grossesse ; h. Kit de test ELISA ; i. médicaments et traitements des tumeurs.

Aussi dans les peintures avec des effets visuels très tendance. On trouve même sur le marché des crèmes énergisantes aux nanoparticules d'or qui auraient des effets «anti-âge» (INERIS; www.chantecaille.com).

Les nanoparticules d'or interviennent principalement dans les secteurs de la chimie catalytique ainsi que dans le secteur des nanomatériaux. Ces deux secteurs regroupent à eux seuls 44% du marché. On comprend alors l'engouement de la communauté scientifique pour la recherche sur les nanoparticules d'or. La demande industrielle est forte et génère beaucoup de projets et d'investissements dans ce domaine.

Les nanoparticules de métaux nobles comme l'or présentent des propriétés de réactivité et optiques remarquables. En effet, à cette échelle l'interaction de la lumière avec les nanomatériaux d'or implique l'apparition d'oscillations collectives (résonances) des électrons de la bande de conduction des atomes en surface qui sont à l'origine d'effets thermiques et optiques. Cette propriété dépend de la taille et de la forme du nanomatériau. Les nanoparticules d'or sont exploitées de manière importante dans notre quotidien, on les trouve dans de nombreux produits (Fig. 11) comme les tests de grossesse commercialisés par la compagnie américaine Church & Dwight (Trojan, Nair, Oxy-Clean, etc.); on greffe sur les particules d'or une séquence d'ADN qui reconnaît la présence d'hormones de grossesse, ce qui permet une évaluation a priori rapide et fiable. D'autres produits peuvent contenir des nanoparticules d'or : on peut citer la boisson énergisante à base de AuNPs (Mesogold, 20 ppm, 3,2 nm), les crèmes de soins pour les cheveux (Nanokeratin system), pour le visage et les yeux (Chantecaille), le dentifrice (Nanorama) et quelques parfums. Mais le secteur le plus prometteur pour l'utilisation des AuNPs reste le secteur biomédical car elles sont utilisées comme immunocapteurs électrochimiques dans les tests biologiques tels que le test ELISA et le dosage radio-immunologique pour la détection de la ferritine chez l'être humain (Wang et al, 2009).

Elles sont aussi utilisées dans la détection, le diagnostic et le traitement des tumeurs par la méthode de délivrance de médicament, concrètement, les nanoparticules d'or sont utilisées comme des porteurs pour véhiculer les traitements puis pour cibler les cellules cancéreuses. Cela permet une précision jamais atteinte. Cette fonctionnalité de l'or est possible grâce à la grande tolérance du corps humain vis-à-vis de ce métal qui ne s'oxyde pas et qui n'est pas altéré par l'action des bactéries. Il peut donc survivre longtemps tout en restant efficace dans notre corps. (Yezhelyev *et al*, 2006; Choi *et al*, 2010a).

Généralement les AuNPs sont stabilisées avec des composés organiques tels que le polyéthylène glycol (Paciotti *et al*, 2004) leur permettant de franchir les membranes cellulaires et d'échapper aux mécanismes d'élimination par phagocytose du système réticulo-endothélial. Elles peuvent être aussi fonctionnalisées avec des composés ioniques afin d'induire une répulsion électrostatique qui empêche l'agglomération et conserve les propriétés nanométriques.

Il est ainsi probable que toutes les applications citées auparavant peuvent contribuer à la possible libération des AuNPs dans l'environnement depuis des sources domestiques et industrielles y compris dans le milieu aquatique (Moore, 2006; Ju-Nam and Lead 2008; Farré *et al*, 2009).

Il a été démontré après une modélisation d'un réseau trophique dans des mésocosmes qu'une dose de AuNPs (7.08 x 10^8 particules/mL,) peut être transférée depuis la colonne d'eau vers le sédiment, les biofilms, les plantes, les palourdes, les escargots, les crevettes et les poissons (Ferry *et al*, 2009) et le transfert des AuNPs depuis les algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*) vers les bivalves d'eau douce (*Corbicula fluminea*) et leur accumulation au niveau des branchies et de l'épithélium digestif (Renault *et al*, 2008).

2. Effets des nanoparticules d'or sur les organismes biologiques

Il existe de nombreuses études concernant les effets des nanoparticules d'or sur les organismes biologiques ; par exemple chez la souris, il a été démontré que des administrations par voie intraveineuse d'AuNPs de 3 à 100 nm pendant 30 minutes provoquaient la modification de l'expression de respectivement 170 et 224 gènes dans le foie sur les 45000 gènes testés. Ces gènes sont impliqués dans les mécanismes d'apoptose, d'inflammation et de mécanisme métabolique. (Cho *et al*, 2009).

De nombreuses recherches ont concerné les effets des nanoparticules d'or sur les organismes aquatiques et plus précisément les poissons. En effet le poisson zèbre a été fréquemment utilisé comme modèle d'étude de la toxicité des nanoparticules (AuNPs) principalement en raison de sa grande homologie avec l'être humain au niveau de son génome.

La plupart des études portant sur l'impact des nanoparticules d'or sur le poisson zèbre utilisent la voie hydrique comme voie de contamination et ne représentent pas les concentrations environnementales réalistes. En fait, les valeurs de contamination testée atteignent des niveaux élevés allant jusqu'à 250 mg AuNPs par litre, et la majorité des AuNPs utilisées sont fonctionnalisées avec des composés organiques (Asharani *et al*, 2008; Asharani *et al*, 2011; Bar-Ilan *et al*, 2009; Kim *et al*, 2013; Harper *et al*, 2011; Truong *et al*, 2012 a,b et 2013). Ces contaminations ont montré divers effets sur les embryons de poissons zèbre comme des altérations du système nerveux central et la persistance des effets au stade adulte (Truong *et al*, 2012 a). D'autres effets touchaient la morphologie, la mortalité et le comportement de l'embryon du poisson zèbre (Harper *et al*, 2011). L'exposition des embryons de poissons zèbre aux Au NPs fonctionnalisées au N,N,N-trimethylammoniumethanethiol (1.5 nm), diminue la croissance de pigmentation de l'œil et affecte le comportement du poisson (Kim *et al*, 2013).

L'exposition alimentaire de poisson zèbre à des nanoparticules d'or (40 et 100 ng AuNPs/ poisson/ jour) a démontré un effet toxique à des concentrations beaucoup plus faibles, cet effet toxique s'est traduit par l'altération du génome, la modification de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, de détoxification, d'apoptose, du métabolisme mitochondrial et le stress oxydant. Un dysfonctionnement mitochondrial est apparu dans le cerveau et les muscles pour les deux doses testées. (Geffroy *et al*, 2011).

Les nanoparticules d'or peuvent altérer le matériel génomique en se liant à l'ADN ce qui peut causer des changements de conformation (Goodman *et al*, 2006). Ces altérations génomiques peuvent être dues aussi à la formation des espèces réactives oxygénées (ROS); ce qui peut conduire à des ruptures des brin d'ADN et des adduits sur les bases ou le désoxyribose (Cabiscol *et al*, 2000).



Figure 12. a. Solutions de points quantiques de sulfure de cadmium sous UV. b. Solutions de points quantiques de sulfure de cadmium sous lumière ambiante.

3. Les nanoparticules de cadmium (points quantiques)

Le cadmium (Cd) est un métal trace relativement rare qui n'existe pas à l'état natif. C'est un élément mineur constituant divers minerais de métaux non ferreux, s'associant souvent au Zn, au plomb ou au mercure. La concentration moyenne de Cd dans la lithosphère a été estimée à 0,098 mg/kg (Heinrichs, 1980). Le Cd peut être dispersé dans l'atmosphère par entraînement de particules provenant du sol et par les éruptions volcaniques. Les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier peuvent constituer les principales sources de rejets atmosphériques.

Le cadmium a de multiples utilisations, notamment dans les écrans de télévision, les barres de contrôles des réacteurs nucléaires, les colorants (émail, glaçure). Il entre aussi dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures) et sert à la fabrication de certaines batteries d'accumulateurs (piles rechargeables). Mais ses principales concernent les revêtements anticorrosion (appliqués en couche mince sur l'acier par cadmiage, le cadmium protègeant contre la corrosion, en particulier saline) ou encore la fabrication de pigments de couleurs (jaune et rouge).

Les points quantiques (quantum dots : QD) constituent les principaux nanomatériaux métalliques à base de cadmium. Ce sont des semi-conducteurs confinés dans les trois dimensions spatiales, leur caractéristiques sont étroitement liées à la taille et à la forme du cristal. Actuellement, les QDs les plus disponibles dans le commerce sont ceux composés de cadmium comme le cadmium-tellure (CdTe) et le cadmium-sélénium (CdSe) (Lim *et al*, 2003).

Les noyaux des QDs semi-conducteurs réactifs sont entourés par une enveloppe, tel que la silice ou d'une couche de ZnS qui les protègent de l'oxydation et améliore leur rendement photo-lumineux (Sass, 2007 ; Dabbousi *et al*, 1997). Les noyaux sont produits à partir d'une réaction de formation de germes de métal à haute température.



Figure 13. Utilisations des nanocristaux de cadmium; a. micro-transistor, b. cellules solaires, c. écran LED avec des nanocristaux ; d. imagerie médicale (rayons X).

Les QDs à base de cadmium sont utilisés dans les transistors, les cellules solaires, l'optique, la spectrométrie et l'imagerie des rayons X et gamma, et les diodes. Ils sont également utilisés en imagerie médicale en raison de leur caractère fluorescent. Ils deviennent un outil standard de laboratoire pour étudier le comportement moléculaire de cellules vivantes ou marquer certaines cellules (Fig. 13). Leur fluorescence, leur stabilité et la facilité avec laquelle on peut les modifier chimiquement ont incité les chercheurs à explorer leur usage comme agents d'imagerie médicale et pour désigner des tumeurs (Lovrić *et al*, 2005).

4. Effets des nanoparticules de cadmium sur les organismes biologiques

L'impact potentiel toxique des NMs peut être attribué à plusieurs facteurs comme la forme, la composition chimique et la petite taille des particules (Casals *et al*, 2008; Hardman *et al*, 2006). Ajouté à ces facteurs, les nanocristaux de cadmium peuvent présenter d'avantage d'impacts en raison de la toxicité du cadmium. Il a été démontré que les QDs à base de CdTe peuvent traverser les membranes des cellules des mammifères (Maysinger *et al*, 2007).

Les points quantiques de cadmium induisent des atteintes cytotoxiques et provoquent un stress oxydant lors d'études *in vitro* (Cho *et al*, 2007; Choi *et al*, 2007; Clift *et al*, 2010; Koeneman *et al*, 2009; Lee *et al*, 2009; Male *et al*, 2008). L'injection de points quantiques à base de Cd/Se/Te provoque chez la souris une hépatotoxicité et un stress oxydant (Lin *et al*, 2011). Chez les organismes aquatiques, les nanocristaux de cadmium peuvent provoquer des effets toxiques ; par exemple l'exposition des moules d'eau douce *Elliption complanata* aux QDs de Cd présentait des effets immunotoxiques et conduisait à un stress oxydant et des altérations de l'ADN après 24h à des concentrations comprises entre 1,6 et 8 mg/L (Gagné *et al*, 2008a).

Chez la truite arc-en-ciel au niveau des hépatocytes, les QDs de CdTe s'accumulent dans les tissus et induisent les métallothionéines, biomarqueur des mécanismes de détoxification (Gagné *et al*, 2008b).

Chez les épinoches, il a été démontré que l'exposition aux QDs de CdS (5 à 500 μ g/L) provoquait des pathologies hépatiques et altérait la reproduction (Sanders *et al*, 2008). L'exposition du poisson zèbre par voie alimentaire aux nanoparticules de sulfure de cadmium (8 et 50 nm) provoque des atteintes génomiques et module l'expression de certains gènes et perturbe la respiration mitochondriale (Ladhar *et al*, 2013).

D. LE COMPARTIMENT SÉDIMENTAIRE : UNE SOURCE POTENTIELLE DE CONTAMINATION DES SYSTÈMES AQUATIQUES

1. Généralités sur le sédiment

Le sédiment est un ensemble de particules en suspension dans l'eau, l'atmosphère ou la glace et qui finit par se déposer par gravité, souvent en couches ou strates successives. Sa consolidation est à l'origine de la formation des couches sédimentaires rocheuses. Les sédiments constituent en tant qu'écotone rochemère/eau un habitat colonisé par des espèces spécifiques (fouisseuses) qui y jouent un rôle majeur d'épuration, aération, fermentation et puits de carbone. Quand il est fin et riche en matière organique il consomme de l'oxygène et devient anoxique. Il peut néanmoins être aéré par des vers ou animaux fouisseurs.

Le sédiment, autrefois utilisé comme engrais ou amendement (le limon fertile du Nil...) abrite parfois des espèces pathogènes (souvent anaérobies), et aujourd'hui des polluants plus ou moins toxiques et persistants, pas ou peu ou lentement biodégradables selon les cas, éventuellement radioactifs ou mutagènes ou génotoxiques (Chen and white, 2004). Il participe néanmoins aussi à la qualité de l'eau des nappes phréatiques en jouant un rôle de tampon ou de filtre, grâce auquel une partie des éléments polluants des rivières reste fixée dans les sédiments (dont une partie peut toutefois être emportée vers la mer ou d'autres parties du bassin-versant lors des grandes crues). Avec l'aggravation de l'érosion des sols labourés et cultivés ou désertifiés et salinisés, les sédiments encombrent les ports fluviaux et estuariens ou maritimes. Leur gestion est une source croissante de coûts pour les autorités portuaires et gestionnaires des canaux, ainsi que pour les collectivités riveraines de cours d'eau.
Le compartiment sédimentaire peut être découpé verticalement en trois zones :

- <u>Zone oxique</u> : cette zone contient de l'oxygène (O₂) qui peut être consommé par la respiration des organismes benthiques ou même pour l'oxydation des matières organiques et la nitrification bactérienne des ions ammonium.
- <u>Zone sub-oxique</u> : cette zone se trouve juste sous la zone oxique, elle ne contient pas d'O₂. Ce sont les nitrates, les oxydes et hydroxydes de fer, de manganèse qui sont utilisés comme oxydants par des bactéries anaérobies.
- <u>Zone anoxique</u>: cette zone est celle qui se trouve le plus en profondeur, elle ne contient ni O₂ ni nitrates ni oxydes métalliques réactifs. Ce sont les sulfates qui sont utilisés pour oxyder la matière organique. Leur réduction conduit à la formation de sulfures par des bactéries sulfatoréductrices.

Les composés qui intègrent le sédiment vont passer progressivement d'une zone à une autre, au cours de leur enfouissement. Cependant, dans certains sédiments, cette zonation verticale ne s'applique pas nécessairement et la position des composés oxydés et réduits peut être très perturbée, par exemple en raison de la bioturbation par la faune benthique, qui assure un mélange des couches sédimentaires.

L'ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques qui transforment un sédiment en roche sédimentaire est appelé **diagénèse** qui débute dès le dépôt des particules et se poursuit au cours de leur enfouissement. Les transformations diagénétiques varient d'un environnement sédimentaire à un autre et se traduisent par des transferts de matière à l'interface "eau-sédiment" ainsi qu'entre les phases solides et dissoutes constitutives des sédiments.

2. Rôles du compartiment sédimentaire dans la contamination des écosystèmes aquatiques

Les sédiments jouent un rôle clef dans les cycles biogéochimiques des polluants (métaux-traces) à l'échelle des systèmes aquatiques. Ils constituent des réservoirs de stockage pour les métaux d'origine naturelle et/ou anthropique. Leur entrée dans le compartiment sédimentaire se fait par diffusion directe depuis la colonne d'eau et/ou par précipitation, et surtout par la sédimentation des matières en suspension, qui sont des pièges pour les métaux via les réactions d'adsorption (Ciutat, 2003).

Dans les écosystèmes lacustres, par exemple, les métaux accumulés dans les couches superficielles du sédiment peuvent atteindre plus de 90 % de la teneur métallique totale estimée pour l'ensemble des compartiments abiotiques et biotiques (Luoma, 1989; Tessier and Campbell, 1987). Selon la contamination, les sédiments peuvent se comporter comme une source ou comme un puits pour les métaux-traces (Soster et al, 1992). La distribution des métaux dans les sédiments, les réactions de spéciation chimique et les capacités d'échanges sont le résultat d'un ensemble complexe de processus physiques, chimiques et biologiques, non encore complètement élucidés (Ciutat, 2003). Les sédiments peuvent accumuler des métaux en grande quantité, ils se comportent donc comme un "puits", un de stockage pour les éléments introduits naturellement réservoir ou artificiellement, mais ce stockage n'est pas toujours définitif. Les sédiments peuvent aussi constituer une source endogène de contamination pour les écosystèmes aquatiques : le terme de bombe chimique a été utilisé pour souligner le risque écotoxicologique généré par ces stocks métalliques (Lacerda and Salomons, 1998).

Plusieurs processus peuvent être à l'origine de transferts directs ou indirects des métaux stockés dans les sédiments vers le reste des compartiments de l'écosystème:

- les métaux peuvent diffuser depuis l'eau interstitielle des sédiments vers la colonne d'eau, en fonction de leur gradient de concentration ;
- des brassages mécaniques, d'origine naturelle (crues par exemple) et/ou anthropique (lâchers de barrage, dragages, ...), peuvent entraîner la remise en suspension des particules sédimentaires et des métaux associés (Krantzberg, 1985)
- les organismes benthiques peuvent accumuler les métaux et les transférer, en tant que proies contaminées, vers les réseaux trophiques benthiques et pélagiques;
- la bioturbation peut également conduire au relargage des métaux stockés dans les sédiments, sous forme de particules remises en suspension ou de transferts liés aux modifications des conditions physico-chimiques.

Les éléments métalliques parviennent à l'interface "eau-sédiment" principalement associés à des phases solides en suspension de natures différentes. Dans les matières en suspension et dans les sédiments, plusieurs types d'association existent entre les métaux et les particules (Forstner and Wittman, 1981 ; Campbell *et al*, 1988). Les métaux peuvent être :

- intégrés dans la structure cristalline de minéraux détritiques ou biogénéiques.
- associés à la fraction organique (pelotes fécales, débris d'organismes animaux ou végétaux, ...).
- précipités ou co-précipités avec différentes espèces minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse, sulfures, ...)
- adsorbés sur différentes phases (argiles, matière organique, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse, ...)

Les métaux peuvent se comporter différemment en fonction des conditions oxiques et anoxiques du sédiment et on constate deux classes de métaux. Les métaux de **classe A** (le fer et le manganèse) sont stables sous forme d'oxyde et d'hydroxydes insolubles en présence d'oxygène et se solubilisent dans les couches anoxiques, conduisant à la formation de cations divalents. À saturation et en conditions très réductrices, ils peuvent précipiter avec des sulfures (MnS, FeS) ou des carbonates (MnCO₃). Les métaux de **classe B** (le cadmium et le zinc) sont solubles en milieu oxique et précipitent sous forme de sulfures en milieu anoxique. Ils peuvent être associés aux différentes phases citées précédemment (Ciutat, 2003).

3. La bioturbation et son influence sur la répartition des métaux et la remobilisation des particules sédimentaires.

La bioturbation est définie comme le résultat de l'ensemble des activités de la macro- et micro-faune vivant à l'interface "eau-sédiment" ou dans les couches supérieures du sédiment (Fig. 14) (Rhoads, 1974 ; Matisoff et al, 1985 ; Matisoff, 1995). Elle est donc le produit des interactions entre les organismes et le substrat (Matisoff et Wang, 2000). La bioturbation induit un ensemble de perturbations physico-chimiques des sédiments, qui peuvent modifier la distribution des métaux au sein de la colonne sédimentaire, leur répartition entre les phases solide et dissoute et leur spéciation chimique au sein des eaux interstitielles (Peterson et al, 1996 ; Ciarelli et al, 1999 ; Vale and Sundby, 1998). Les transferts des métaux entre les sédiments et la colonne d'eau peuvent être modifiés, et ceci dans les deux sens : de la colonne d'eau vers le sédiment (Rasmussen et al, 2000 ; Wall et al, 1996 ; Ciutat et al, 2005a) et du sédiment vers la colonne d'eau (Petersen et al, 1998 ; Ciutat et al, 2007). Les études conduites avec les tubificidés ont confirmé leur mode de bioturbation de type bioadvectif. La vitesse de bioadvection est proche de 40 cm.an-1, avec un coefficient de biodiffusion de 2 cm².an⁻¹. Ces résulats ont été confortés par l'étude radioscopique des sédiments, qui a permis de déterminer la profondeur maximale soumise à la bioadvection : 13 cm (Ciutat, 2003).

La biodiffusion est le résultat de l'activité d'organismes qui vivent dans les premiers centimètres du sédiment et s'y déplacent, en homogénéisant substrat de façon mécanique et aléatoire. C'est le cas de beaucoup de bivalves benthiques, comme la palourde, ou des amphipodes. Ces bivalves sont appelés des "bulldozers" en raison de leur effet sur le sédiment. La conséquence de ce type de bioturbation sur une couche de traceurs déposés en surface est illustrée sur la figure.15 (Ciutat, 2003).

La bioadvection ou bioconvoyage est provoquée par des organismes qui ingèrent des particules sédimentaires en profondeur, dans la zone anoxique, et rejettent leurs pelotes fécales à la surface du sédiment. Le sédiment réduit se retrouve ainsi à l'interface "eau-sédiment", le plus souvent en milieu oxique, après avoir été transféré le long du tractus digestif des organismes pour ingérer une partie de la matière organique assimilable. Ce transport est donc orienté et induit un lien direct entre deux strates géochimiquement différentes [Fisher et al., 1980]. Les organismes sont qualifiés de convoyeurs, comme les capitellidés et les maldanidés en milieu marin, ou les tubificidés en eau douce. Ce type de bioturbation est illustré sur la figure. 15 (Ciutat, 2003).



Figure 14. Exemples de phénomènes de bioturbation et d'organismes bioturbateurs en écosystèmes.



Figure 15. Evolution avec le temps de la répartition d'une couche de traceurs particulaires déposée à la surface du sédiment, en présence de bioturbation de type diffusion (a) ou bioadvection (b).

L'ensemble des mécanismes de bioturbation résulte de la présence et de l'activité des organismes dans le sédiment et se manifeste de différentes façons (Ciutat, 2003) :

- creusement de galeries et de terriers, provisoires ou durables, à une ou plusieurs entrées et dont les parois sont de natures diverses : ils constituent les structures biogènes de la bioturbation ;
- formation de sillons ou de pistes créés par le déplacement des organismes à la surface ou à l'intérieur du sédiment ;
- ingestion de sédiment, la composante organique détritique constituant la base alimentaire pour de nombreuses espèces détritivores ;
- production de fécès à la surface ou à différents niveaux dans le sédiment ;
- circulation d'eau dans les galeries, afin d'assurer un apport d'oxygène aux organismes.

La bioturbation exerce de nombreux effets sur la structure et sur les propriétés des sédiments, ces effets directs et indirects pouvant modifier le devenir des métaux accumulés dans les sédiments et les flux entre les différents compartiments abiotiques et biotiques au sein des écosystèmes aquatiques. Ces effets sont complexes et résultent des actions et surtout des interactions entre les nombreux facteurs biogéochimiques mis en jeu. Selon le type de métal étudié, l'éthologie de la macrofaune benthique ou encore les modalités de la contamination des compartiments sédimentaires, la bioturbation influencera de façon différente les flux métalliques, la distribution des éléments et leur biodisponibilité à l'égard des espèces benthiques et pélagiques.

Si de nombreuses recherches ont été menées sur les rôles des processus physiques et chimiques à l'égard des flux des métaux-traces entre les sédiments et la colonne d'eau, un nombre limité d'études a porté sur les effets directs et indirects de la bioturbation sur le stockage des métaux dans les sédiments et sur les processus de leur relargage. De nombreuses études ont été réalisées en eau douce afin de quantifier la biodiffusion et la bioadvection de ces organismes bioturbateurs. Robbins *et al*, 1979 ; Mermillod-Blondin *et al*, 2002 ; Matisoff *et al*, 1999 et Matisoff and Wang, 1998 ont mesuré expérimentalement des coefficients de biodiffusion et de bioadvection créés par différents organismes, ainsi que leurs zones d'ingestion, à l'aide de césium¹³⁷ ou de traceurs particulaires fluorescents (luminophores) déposés à la surface des sédiments. Ils ont utilisé différents organismes: des amphipodes (*Pontoporeia hoyi*), des chironomes (Chironomus sp., Coelotanypus sp. et Prodiamesa), des larves d'éphémères (*Hexagenia sp.*), des aselles (*Asellus aquaticus*) et surtout des tubificidés (*Branchioura sowerbyi*, *Tubifex tubifex* et *Limnodrilus hoffmeisteri*).

Par ses effets mécaniques, la bioturbation entraîne un mouvement des éléments associés aux particules sédimentaires; ainsi, les concentrations des métaux-traces associés aux particules pourront être affectées, et ce à toutes les profondeurs de la couche bioturbée (Matisoff, 1995). Les organismes convoyeurs, enfouissent progressivement le sédiment de surface : si ce dernier a été enrichi en métaux, par exemple au contact de la colonne d'eau suite à une pollution, la contamination sera transférée en profondeur, jusqu'à la zone maximale d'ingestion des vers. A l'opposé, la bioadvection pourra être à l'origine d'un transfert de métaux préalablement enfouis dans les couches profondes du sédiment vers la surface et les organismes benthiques qui y vivent. Toutefois, dans les deux cas, un métal présent dans la zone d'ingestion des convoyeurs pourra être recyclé plusieurs fois avant son enfouissement ultime, en dessous de la zone d'ingestion, conduisant à plusieurs "passages" au contact de la colonne d'eau (Matisoff *et al*, 1999).

La construction et la bioirrigation des terriers peut entraîner des métaux à l'état dissous dans l'eau en profondeur dans le sédiment, avec ensuite une complexation avec les ligands présents à la surface des galeries ; à l'opposé, la bioirrigation peut conduire au relargage de métaux accumulés en profondeur, sous forme dissoute, par diffusion depuis l'eau interstitielle, ou sous forme particulaire, adsorbés sur les matières en suspension (Hare *et al*, 1989).

Plusieurs études basées sur l'analyse des effets de la bioturbation sur le relargage des métaux accumulés dans les sédiments et sur leur biodisponibilité pour des espèces benthiques et pélagiques, ont montré une augmentation significative des métaux transférés des sédiments vers les eaux surnageantes, surtout sous forme particulaire (Rasmussen *et al*, 2000). Ce relargage n'entraîne pas toujours une augmentation de l'accumulation des métaux par les organismes (crustacés, bivalves, ...), puisque les métaux particulaires sont peu ou pas biodisponibles (Wall *et al*, 1995).

La bioturbation qui résulte du mouvement des larves d'*Hexagenia rigida* provoque la libération du cadmium et du zinc depuis le compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau via la remise en suspension des particules sédimentaires : l'utilisation de *Corbicula fluminea* a montré la biodisponibilité réduite des formes métalliques relarguées dans la colonne d'eau (Ciutat and Boudou, 2003).

La contamination de la colonne d'eau au Cd n'a pas montré d'effets sur l'activité de bioturbation des vers oligochètes tubificidés malgré la valeur élevée de cadmium détectée dans les vers (Ciutat *et al*, 2005a). Il a été aussi démontré que la bioturbation induite par ces vers augmentait le transfert et la distribution du cadmium dans le sédiment depuis la colonne d'eau (Ciutat *et al*, 2005b).

Par contre, très peu d'études ont été consacrées aux effets de la bioturbation sur les transferts de métaux du sédiment vers la colonne d'eau. (Soster *et al*, 1992) en eau douce, et (Petersen *et al*, 1998) en milieu estuarien, ont montré que la bioturbation induite par différents organismes (*Nereis diversicolor, Arenicola marina, Corophium volutator* ou tubificidés) augmente les flux de métaux (Cd et Zn) de la colonne d'eau vers les sédiments.

Il existe néanmoins quelques études réalisées avec des polluants organiques. (Reible *et al*, 1996) a montré que la bioturbation par des tubificidés induisait une redistribution de polluants organiques hydrophobes (hexachlorobenzène, pentachlorobenzène et trifluralin, pyrène, dibenzofurane et phénanthrène) dans le sédiment ainsi que leur relargage vers la colonne d'eau. (Gunnarsson *et al*, 1999) ont observé que le polychète *Nereis diversicolor* augmentait le relargage de tetrachlorobiphényle à partir d'un sédiment marin, sans modifier la distribution intrasédimentaire de ce polluant.

(Wood and Shelley, 1999) arrivent à la conclusion que l'effet de la bioturbation est négligeable dans le contrôle de la biodisponibilité des métaux intra-sédimentaires alors que (Park and Jaffé, 1996) montrent que la bioturbation est un des processus majeurs contrôlant le flux d'électrons dans le sédiment et donc les conditions rédox.

CHAPITRE II BASES MÉTHODOLOGIQUES



Figure 16. Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique (d'après Van der Oost *et al*, 2003)

L'évaluation des conséquences toxicologiques d'un xénobiotique au sein d'un écosystème suppose la mise en place d'une approche intégrative de différents paramètres. En effet, la présence du xénobiotique dans le système écologique ne constitue pas à elle seule un élément suffisamment pertinent pour déduire un risque pour la biocénose. Des liens doivent être établis entre les mesures chimiques du contaminant dans l'écosystème, sa bioaccumulation dans les organismes et les effets biologiques induits. C'est ainsi que l'exposition, le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes aquatiques demandent une étude écotoxicologique multiparamétrique (Fig. 16).

C'est dans ce contexte que nos travaux de recherche se sont déroulés et au cours desquels nous avons utilisé une approche pluridisciplinaire. En effet, la problématique de notre travail de recherche nous a conduits à effectuer différentes expériences de contaminations au laboratoire et à exploiter des techniques d'analyses de géochimie, chimie, enzymologie et de biologie moléculaire afin d'identifier les effets induits par les contaminants (nanoparticules) aux niveaux de l'écosystème (sédiment, colonne d'eau), des populations (les oligochètes, poissons zébres), des tissus (bioaccumulation), des cellules (activité enzymatique) et des molécules biologiques (altération de l'ADN).

Le chapitre II - bases méthodologiques - du présent document détaille la démarche expérimentale et les techniques d'analyses suivis durant ce travail de recherche. Il comprend aussi la présentation des deux organismes modèles utilisés.







b. Unité expérimentale de « type 2 »

Figure 17. Photographies des deux types d'unités expérimentales utilisées



Figure 18. Bac expérimental utilisé (microcosme)

A. SYSTÈMES ET DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX

1. Structure du dispositif expérimental

Nos systèmes expérimentaux sont de type "microcosmes" (Fig.18), constitués d'un biotope mixte "colonne d'eau/sédiment" et d'une composante biologique mono ou plurispécifique, selon les objectifs de chaque expérimentation. Deux types d'unités expérimentales (UEs) ont été utilisés au cours des différentes expériences (Fig. 17, a et b):

- Des aquariums en verre collé (L = 12 cm; l = 12 cm; h = 30 cm); type 1
- Des cylindres en PVC ($\emptyset = 5,3 \text{ cm}$; h = 24 cm); type 2

Les unités de type 2 ont été utilisées dans l'expérience concernant la contamination du sédiment aux nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS) lors de l'introduction de vers oligochètes seuls : l'utilisation de ce genre d'unités permettait un prélèvement de l'ensemble du compartiment sédimentaire par un carottage direct. Le verre a été choisi pour la fabrication de toutes les UEs de type 1, compte-tenu de ses faibles capacités de fixation des métaux, de sa décontamination facile et de son imperméabilité à l'oxygène dissous. Notons que les UEs de type 1, à cause de la présence de joints en silicone, ont été recouvertes sur leurs parois internes par un film plastique (de norme alimentaire, Plastiluz, France) dont les capacités de fixation des métaux sont faibles, comparables à celles du verre.

2. La colonne d'eau

La colonne d'eau était constituée par de l'eau du réseau déchlorée. Après introduction du sédiment dans chaque UE, un volume d'eau déterminé a été délicatement ajouté, en utilisant un morceau de polystyrène placé à la surface du



Figure 19. Photographies des unités de type 1 lors des expérimentations



Figure 20. Photographies des unités de type 2 lors des expérimentations

sédiment, afin d'éviter la remise en suspension des particules. Le niveau de l'eau a été maintenu constant tout au long des expériences par des ajouts compensant les pertes dues à l'évaporation ou aux prélèvements indispensables au suivi des conditions physico-chimiques et des transferts métalliques dans ce compartiment.

3. Suivi des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau

La température, la conductivité électrique (estimation de la minéralisation globale de l'eau, *i.e* de la teneur en sels dissous) et la salinité ont été mesurés tous les trois jours dans la colonne d'eau des UEs (thermomètre EverSafe – Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch, France), ainsi que le pH (MO128 Dissolved Oxygen Meter et MP120 pH Meter – Mettler – Toledo Analytical, Schwerzenbach, Suisse).

Dix ml d'eau ont été prélevés dans la partie centrale des unités expérimentales, les échantillons d'eau ont ensuite été analysés dans un turbidimètre (Turb 430 IR / T; société WTW, Weilheim, Allemagne). Les résultats sont exprimés en unités de turbidité Formazine (FTU), qui sont équivalentes aux unités de turbidité néphélométrique (NTU).

4. Le sédiment

Les sédiments utilisés pour l'ensemble de nos expériences ont été collectés en milieu naturel, sur les rives de la Garonne, juste en amont de Bordeaux, au niveau du site Cadaujac (44° 45' 23" N, 0° 31' 44" O, France). Il s'agissait de sédiments très fins et homogènes, appelés « crème de vase ». Les principales caractéristiques du sédiment sont résumées dans le tableau. 4. Après la collecte sur le terrain, les sédiments ont été stockés à l'obscurité à 4°C. Avant introduction dans les UEs, ils ont été homogénéisés mécaniquement (brassage) et des échantillons ont été prélevés afin de déterminer les rapports "poids frais/poids sec" (pf/ps :1,4, le poids sec a été obtenu après séchage à 60°C pendant 72 h) et les concentrations métalliques initiales.



		Concentration en métaux (µg/g	moyenne \pm
		poids sec)	écart type
Taille des particules	%	- Cadmium (Cd)	0.32 ± 0.01
<15µm	46.4	- Or (Au)	0.05 ± 0.01
15-30 μm	27.7	Argent (Ag)	< 0.01
30-63 µm	20.0	Cobalt (Co)	19.2 ± 0.17
63-125 μm	4.4	Chrome (Cr)	51.8 ± 0.53
125-250 um	1.4	Cuivre (Cu)	39.6 ± 0.31
250-500 um	0.1	Manganèse (Mn)	1209 ± 8.4
>500 µm	0.0	Nickel (Ni)	35.6 ± 0.25
Carbone organique %	1.55	– Plomb (Pb)	58 ± 0.2
Deregité 9/	0.74	Vanadium (V)	50.2 ± 0.72
	0.74	– Zinc (Zn)	221 ± 6.6

Figure 21. Rives de la Garonne, site de Cadaujac.

Tableau 4. Principales caractéristiques et concentrations métalliques (ICP-OES) du sédiment de Garonne, collecté au niveau de la station de Cadaujac en amont de Bordeaux.

Dans la plupart des expériences, avant d'être homogénéisés, les sédiments ont été tamisés à 1 mm pour enlever les gros débris. Un poids fixe de sédiment a été introduit dans chaque UE, permettant une homogénéisation des hauteurs au sein des différents microcosmes. Le sédiment a été contaminé par l'addition des formes des solutions de cadmium et d'or pour obtenir les contaminations souhaitées pour chaque expérience et chaque condition, suivi d'une homogénéisation mécanique de 15 minutes avec un mélangeur (Peugeot, Pc20543) puis un stockage à 4° C pendant 72 h.

Pour la contamination au sulfure de cadmium nanoparticulaire, nous avons ajouté 10mL d'une suspension contenant 37,7 mg CdS NPs /L de par kg de sédiment frais (pf) afin d'obtenir un niveau de contamination de 0,37 mg CdS NPs/kg (fw) équivalent à 0,5 mg CdS NPs/kg (ps). Pour le CdS microparticulaire, nous avons ajouté 7,4 mL d'une suspension contenant 33,7 mg CdS MPs/L par kg de sédiment (pf) afin d'obtenir un niveau de contamination 0.25 mg CdS MPs/kg (fw) équivalent à 0,33 mg CdS NPs/kg (ps). Le Cd ionique a été utilisé comme témoin positif, nous avons ajouté 38 µL d'une solution contenant 10 g/L de chlorure de cadmium (CdCl₂) par kg de sédiment (pf) afin d'avoir un niveau de contamination de 0,38 µg Cd /g de sédiment (pf) équivalent à 0,51 mg CdS NPs/kg (ps). L'expérience de contamination du sédiment aux différentes formes de cadmium a été réalisée dans les UEs cylindrique en PVC de type 2 (Fig.20) et un poids de 420 g (poids frais) de sédiment homogénéisé (équivalent hauteur de 10 cm) a été introduit dans chaque UE. Pour la contamination du sédiment aux deux formes d'or, nous avons ajouté respectivement 111 et 555 ml de solution contenant 90 mg/L de nanoparticules d'or (AuNPs) par kg de sédiment frais, et 19 et 95 ml d'une solution de sels d'or (KAuCl₄) de concentration de 521 mg/L par kilogramme de sédiment frais afin d'obtenir respectivement les concentrations de C₁:14 et C2: 55 μ g Au /g de sédiment sec. Les expériences de contamination du sédiment aux différentes formes d'or ont été réalisées dans les UEs de type 1- aquarium en verre (Fig.19) et une masse de 800 g de sédiment (pf) a été introduite dans chaque UE (équivalent à une hauteur de 6 cm).



Contamination du sédiment aux nanoparticules de sulfure de cadmium



Figure 22. Dispositif expérimental des expériences de contamination du sédiment aux nanoparticules de sulfure de cadmium

Nous avons utilisé deux types d'organismes dans les UEs : un possédant une activité de bioturbation (tubificidé, oligochète) et un modèle de vertébré d'eau douce (le poisson zèbre) introduits séparément ou simultanément selon les conditions expérimentales. Les organismes ont été introduits avec un délai minimum de 24 à 72 h après la mise en place du biotope mixte. Ce délai permet une relative stabilisation des paramètres physico-chimiques au sein de la colonne d'eau et du sédiment. La présentation des deux organismes est détaillée dans les parties B et C.

5. Dispositifs expérimentaux

Les UEs de chaque expérience ont été placées dans des grands bacs (Fig.18), équipés de systèmes de thermorégulation (chauffage et refroidisseur). La température de l'eau des bacs a été fixée entre 20 et 22° C selon les expériences. Les UEs de type 1 et 2 ont été placées dans les bains-marie sans que les colonnes d'eau communiquent entre elles ni avec l'eau du bac. Des bulleurs ont été placés dans la couche supérieure de chaque UE, ce qui a permis d'assurer un apport constant en oxygène ainsi qu'une homogénéisation de la colonne d'eau. Le débit des bulleurs a été contrôlé quotidiennement durant l'exposition et maintenu en position faible afin d'éviter tout brassage à la surface du sédiment.

5.1. <u>Contamination du sédiment aux particules de sulfure de cadmium (CdS)</u> L'expérience a été conduite en novembre 2011 en utilisant les unités de type 2 (Fig.22) et a consisté à contaminer le sédiment de la Garonne avec les nano et microparticules de CdS à de faibles concentrations. Des conditions sans contaminants et contrôles positifs (cadmium ionique) ont été utilisés à fins comparatives. Seuls les vers tubifex ont été exposés lors de cette expérience qui a duré 20 jours. Des conditions sans vers ont été installées afin de pouvoir observer par différence l'activité de bioturbation des vers en utilisant la méthode de comptage de traceurs fluorescents. Nous avons utilisé 3 ou 4 UEs pour chaque condition expérimentale.

92



Figure 23. Dispositif expérimental des expériences de contamination du sédiment aux nanoparticules d'or

5.2. Contamination du sédiment aux nanoparticules d'or

Cette expérience a été divisée en trois parties qui ont été conduites séparément en utilisant les unités expérimentales de type 1 (Fig. 23) :

- La première expérience (1) (Mai 2012) consistait à contaminer le sédiment de la Garonne avec deux différentes concentrations de nanoparticules (Au NPs) durant 20 jours. Les tubifex ont été exposé seuls avec les poissons zèbre. Nous avons utilisé trois UEs pour chaque condition avec vers seuls, cinq UEs pour chaque condition qui contenait les deux organismes et trois UEs pour les unités contrôles sans animaux.
- La deuxième expérience (2) (Novembre 2012) consistait à contaminer le sédiment de la Garonne avec les deux concentrations d'or déjà testées précédemment avec une solution de sel d'or (KAuCl₂) afin d'avoir un contrôle positif de la forme ionique et pouvoir comparer avec la forme nanoparticulaire.
- La troisième expérience (3) (Décembre 2012) consistait à contaminer le sédiment de la Garonne avec les deux concentrations déjà utilisés dans les expériences précédentes des deux formes d'or (ionique et nanoparticulaire). Dans cette expérience, seuls les poissons zébre ont été exposés aux sédiments contaminés afin de comparer les effets de cette contamination avec les conditions ou les poissons ont été exposés en présence des organismes bioturbateurs.

Règne	Animalia
Embranchement	Annelida
Classe	Clitellata
Sous- classe	Oligochaeta
Ordre	Plesiopores plesiothéques
Famille	Tubificidae
Genre	Tubifex
Espèce	tubifex

Tableau 5. Systématique des tubicidés



Figure 24. Images de tubificidés dans le sédiment avec la partie postérieure de leur corps dans la colonne d'eau

B. LES TUBIFEX : ORGANISMES BIOTURBATEURS EN MILEU AQUATIQUE

1. Systématique

Les tubifex sont des **annélides** aquatiques appartenant à la sous classe des Oligochaeta qui signifie peu de soie. Ils font partie de l'ordre des Haplotaxida, comprenant la famille des Tubificidae auquel le genre Tubifex (Tableau. 5). Ce genre comprend plusieurs espèces dont *Tubifex tubifex* (Lamarck, 1816) qui sont généralement rouges (leur sang contient un pigment proche de l'hémoglobine), de quelques centimètres de longueur, vivent dans des galeries, à l'intérieur du sédiment.

2. Écologie et biologie

Les tubificidés peuvent constituer une grande partie de la faune benthique des écosystèmes aquatiques continentaux et représentent l'un des principaux agents de bioturbation de ces systèmes (Fisher *et al*, 1980). Leur densité peut atteindre jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'individus/m² (Avel, 1959). Ils sont ubiquitaires ; leur répartition est quasiment mondiale. Ils sont résistants aux fortes concentrations en matières organiques (Brinkhurst and Cook, 1974), à l'anoxie (métabolisme anaérobie transitoire possible), à la chaleur et à la déshydratation ; ils constituent un groupe dominant au sein des communautés d'invertébrés benthiques en milieux perturbés (pollutions chimiques). Leur durée de vie est de quelques années. Les tubificidés ont en général une longueur supérieure à 2 cm. Ils ne possèdent pas d'yeux. Leur classification est basée principalement sur les soies et sur la forme du conduit génital mâle (Brinkhurst, 1971).

Leur position dans le sédiment est très caractéristique : le prostomium (le premier segment du corps du vers) est orienté vers le bas et le pygidium (le bas du corps du vers) vers le haut, qui dépasse du sédiment (Fig.24). La reproduction est rarement asexuée. La maturité sexuelle est atteinte entre six mois et un an. Ils ingèrent les particules sédimentaires réduites au fond des galeries, et les rejettent en surface sous forme de pelotes fécales après extraction d'une partie de la matière organique assimilable. Ce qui contribue à un phénomène de recouvrement du sédiment oxydé de surface par du sédiment réduit originaire des parties profondes. Ce sédiment réduit contient du matériel à forte demande en oxygène (FeS). Ce type de bioturbation est de la bioadvection; les organismes responsables de ce phénomène de remaniement sédimentaire sont appelés convoyeurs (Rhoads, 1974). Les Oligochètes n'irriguent pas leurs terriers (McCall and Fisher, 1980). Les échanges respiratoires se font par diffusion cutanée, à l'extrémité terminale du corps qui dépasse du sédiment. La longueur du corps hors du tube et la fréquence des battements de cette région postérieure sont en relation directe avec la concentration en oxygène dissous dans l'eau : lorsque les concentrations en oxygène diminuent, les vers augmentent la surface du corps qui sert aux échanges respiratoires en laissant sortir une plus grande partie postérieure de leur corps, amplifiant et accélérant les ondulations antérogrades. La partie terminale de l'épithélium intestinal participe aussi aux échanges respiratoires. Leur résistance à de faibles concentrations en oxygène dissous est une adaptation liée à cette niche écologique (Brinkhurst et Cook, 1974).

3. Anatomie

Le premier segment de ces vers, le prostomium est dépourvu de soies. Les autres segments portent 4 faisceaux de soies : 2 latéraux-frontaux et 2 latéraux-ventraux. La spermathèque se trouve dans le Xème segment et les orifices mâles dans le XIème segment (parfois déplacés de 1 ou 2 segments). Le clitellum, qui renferme les organes reproducteurs, apparaît au niveau du XIème segment, en période de reproduction (une par an, en milieu naturel).

Les tubificidés sont des hermaphrodites protandriques: les spermatozoïdes arrivent à maturité avant les ovules. L'autofécondation est donc impossible. Les œufs sont déposés par groupes de 4 ou 5 dans des cocons. Leur développement est direct. Ils donnent naissance à de petits vers, complètement constitués. Ils portent aussi des soies génitales associées à la spermathèque et aux pores mâles. Pour le genre *Limnodrilus*, c'est la taille relative de la spermathèque comparée à la largeur de l'animal qui permet d'identifier les différentes espèces. Les différentes genres de tubificidés se reconnaissent grâce à leurs trois types de soies :

- des soies capillaires, dorsales *et* allongées, présentes dans le genre *Tubifex*, absentes dans le genre *Limnodrilus*.
- des crochets bifides, dorsaux et ventraux, dont la forme et la taille des dents sont utilisés pour les déterminations.
- des soies pectinées, dorsales et antérieures, en forme de crochets bifides avec des dents intermédiaires.

4. Intérêt en écotoxicologie

Les caractéristiques physiologiques, écologiques et comportementales des oligochètes d'eau douce les rendent très intéressants pour les études en écotoxicologie, spécialement ceux relatives aux rôles des sédiments en tant que compartiment d'accumulation des produits potentiellement toxiques (Chapman, 2000 et 2001) ou même en tant que source de contamination (Ciutat *et al*, 2005a ; 2005b ; 2007). En effet plusieurs avantages favorisent l'utilisation des oligochètes en écotoxicologie ; on peut en citer quelques-uns :

- une composante écologique importante dans les systèmes aquatiques avec des densités qui peuvent attendre 65000 individus/m².
- une multiplicité d'espèces et une large répartition géographiques.

- des modes de vie (enfouissement et construction de galeries dans le sédiment) et de nutrition (ingestion de sédiment) qui peuvent les exposer directement aux polluants en cas de contamination du milieu; ils peuvent être se contaminés à la fois par la colonne d'eau et par le sédiment (Warren *et al*, 1998; Sager and Pucsko, 1991; Bervoets *et al*, 1997).
- une taille suffisante pour permettre les études de bioaccumulation ; les espèces sont faciles à élever au laboratoire.
- une résistance à beaucoup de caractéristiques physico-chimiques du sédiment et de la colonne d'eau; ils peuvent même devenir dominants en cas de perturbations du milieu (pollution organique) (Rosso *et al*, 1993 ; Brinkhurst, 1970).

Plusieurs études ont été réalisées sur la bioaccumulation des métaux par les tubificidés, en laboratoire (Bouché et al, 2000 ; Dean, 1974 ; Ciutat et al, 2007 ; Méndez-Fernández et al, 2013) ou sur le terrain (Bervoets et al, 1997; Warren et al, 1998). D'autres auteurs se sont concentrés sur la toxicité des métaux à l'égard de ces organismes (Chapman et al, 1982; Khangarot, 1991; Whitley, 1967; Wiederholm et al, 1987), l'effet des nanoparticules métalliques (Verma et al, 2011 and Stanley et al, 2010) ainsi que sur les mécanismes de détoxification mis en œuvre pour expliquer les tolérances observées (Deeds and Klerks 1999 ; Klerks and Bartholomew, 1991; Wallace et al, 1998). Il existe un indice biologique basé sur les Oligochètes benthiques, déterminant la qualité des milieux aquatiques, au même titre que les indices utilisant les diatomées, les macro-invertébrés benthiques ou les poissons par exemple. Désigné "Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments" ou IOBS (NF T90-390, AFNOR 2001), il est décrit comme représentatif de la qualité biologique des sédiments fins ou sableux, permanents et stables, des cours d'eau ou des canaux; ses variations traduisent des tendances fortes sur l'incidence écologique des rejets polluants (charge organique, micropolluants organiques et métalliques). Il est basé sur des taxons à développement strictement aquatique, en général peu mobiles, recensés dans toutes les eaux continentales et ne présentant ni zonation ni distribution régionale dans les réseaux hydrographiques européens (Ciutat, 2003).

5. Échantillonnage

Les lots d'Oligochètes Tubificidae utilisés pour nos expériences ont été prélevés en milieu naturel par la Société SARL GREBIL, ARRY, France. Les vers ont des tailles et donc des âges différents, ceci reflétant l'hétérogénéité au sein de ces communautés en milieu naturel. Les tubificidés ont été acclimatés au laboratoire pendant 15 jours, dans des bacs contenant du sédiment de Garonne. Des apports de nourriture ont été effectués 3 fois par semaine (Baby fish food, Tetramin, Tetra Werke, Allemagne). Les vers ont été ensuite prélevés hors des bacs d'élevage par tamisage (maille de 500 µm) sous un courant d'eau à faible débit. Afin d'introduire une quantité constante d'organismes dans chaque UE, des lots de tubificidés de poids frais identique ont été confectionnés, puis introduits aléatoirement dans les UEs. La densité moyenne correspondant à cette biomasse et à la surface des sédiments dans les UEs est de 56 000 individus/m². Elle est représentative de nombreux sites étudiés en milieu naturel (McCall et Fisher, 1980). Les surfaces de UEs utilisées durant ce travail de recherche nous ont conduit à rajouter le nombre de vers suivant : pour les UEs de type 1 d'une surface de 0,014 m² nous avons rajouté en moyenne 806 vers par UE, pour les UEs de type 2 qui ont une surface de $0,00225 \text{ m}^2$, nous avons ajouté une moyenne de 142 vers par UE.

Pour chaque temps d'échantillonnage, les vers ont été prélevés en tamisant le sédiment de chaque UE sous un courant d'eau (maille de 500 μ m) et en éliminant les matières sédimentaires collées à la surface des organismes (figure II.B.3.). Ils ont été ensuite collectés et stockés à -80°C pour les analyses de génotoxicité et la détermination des concentrations des métaux.





Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Classe	Actinopterygii
Sous- classe	Neopterygii
Ordre	Cypriniformes
Famille	Cyprinidae
Genres	Danio
Espèce	rerio
Nom communs	En: Leopard danio, Striped danio, Zebrafish. Fr: Poisson zèbre

Tableau 6. Systématique du poisson zèbre





Figure 25. Photographies de poissons zèbre dans la colonne d'eau.

C. LE POISSON ZÉBRE: ORGANISMES BIOINDICATEUR DE CONTAMINATION EN MILEUX AQUATIQUES

1. Systématique

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson vertébré téléostéen de l'ordre des Cypriniformes ; Sterba, 1962. La nomenclature originelle de cette espèce, *Brachydanio rerio*, a été proposée par Buchanan-Hamilton en 1822. Il est couramment utilisé en aquariophilie et en laboratoire où il sert d'organisme modèle. Ce poisson d'eau douce fait partie de la famille des Cyprinidés (Tableau.6, Fig.25).

2. Écologie et biologie

Le poisson zèbre est très largement réparti dans le monde (Europe, Afrique, Asie et Amérique du Nord). Le genre *Danio* est originaire d'Inde, de Malaisie et de Sumatra. La première importation en Europe fut réalisée en 1905. Les habitats naturels du poisson sont les cours d'eau rapides et peu profonds, les rizières et les eaux stagnantes. Son adaptation thermique est importante puisqu'on le rencontre dans des eaux dont la température varie de 18 à 40 °C. Il en est de même vis-à-vis des caractéristiques des eaux dans lesquelles il évolue puisqu'il est capable de supporter de larges gammes de pH (6,5 à 8) et de dureté (12 à 21 °TH). L'espèce *Danio rerio* est grégaire. Son élevage ou son maintien par groupe de 10 à 20 individus au minimum est un facteur important à respecter au risque de perturber fortement le comportement des organismes. Il s'agit de plus d'une espèce décrite comme étant bentho-pélagique, c'est-à-dire qu'elle évolue préférentiellement dans la partie basse de la colonne d'eau.



Figure 26. Description du cycle biologique chez le poisson zébre.



Figure 27. Principales étapes du développement embryo-larvaire du poisson zèbre (de gauche à droite : 0, 24, 48, 72 et 120 hpf).

Le poisson zèbre est ovipare. La reproduction et la diffusion des œufs se fait en groupe. Les femelles semblent exigeantes en ce qui concerne les sites de ponte et les mâles défendent ce territoire. Cette espèce se caractérise par un cycle de vie court. Son développement embryo-larvaire est très rapide et a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à une description détaillée (Fig. 26 et 27).

3. Anatomie

Le poisson zèbre se caractérise par une taille comprise entre 3 et 5 cm au stade adulte (100 jours). Son corps est fusiforme et très flexible ce qui facilite sa progression rapide et ses changements de direction. Un léger dimorphisme sexuel différencie les mâles des femelles (les mâles étant plus petits et plus élancés alors que les femelles présentent un abdomen plus bombé et sont dotées d'une papille urogénitale présente à l'arrière des nageoires pelviennes). Leur corps est bleu foncé et possède quatre bandes longitudinales jaunâtres et brillantes, s'étendant des opercules à la nageoire caudale. Les opercules sont bleus avec des tâches dorées. La nageoire dorsale est bleue, l'anale rayée, les pectorales et ventrales sont transparentes. Selon l'environnement dans lequel sont placés les poissons, ces couleurs peuvent changer.

La bouche est dirigée vers le haut du fait de la proéminence de la mâchoire inférieure. Elle porte deux paires de barbillons (organes tactiles) insérés dans la commissure des lèvres et sur la mâchoire supérieure. D'après la morphologie buccale ainsi que la tâche claire que certains individus possèdent sur le sommet du crâne (suspectée d'être utilisée comme un leurre permettant d'attirer les insectes), son alimentation est à tendance insectivore (proies nageant en surface ou en pleine eau). Cependant, en captivité, toutes les nourritures sèches distribuées en surface sont acceptées, ainsi que celles ayant sédimenté au fond de l'aquarium.

4. Intérêt en écotoxicologie

Danio rerio est l'une des espèces de poisson dont l'utilisation a fait l'objet de recommandations d'instances internationales pour les tests de toxicité (CE, 2001a, b ; ISO, 1996 a,b,c; OECD, 2004a, b, c, d, e; US EPA, 2002, 2003). En effet, cette espèce est aisément maintenue en stabulation dans les conditions du laboratoire, elle est peu exigeante vis à vis des caractéristiques de l'eau (T°C, pH, dureté), sa taille réduite concoure à son adéquation pour des expérimentations de contamination. Son cycle de vie relativement court en fait également un modèle biologique de choix pour des études couvrant plusieurs générations dans le but d'obtenir des informations relatives aux conséquences populationnelles d'une exposition à un agent toxique (US EPA, 2002). Récemment, le Danio rerio a été recommendé comme un bon modèle animal pour l'analyse des impacts des polluants environnementaux au niveau de l'activité bioénergétique mitochondriale dans le cerveau et le muscle (Bourdineaud et al. 2013) et pour évaluer la toxicité des nanomatériaux (Fako and Furgeson, 2009). Enfin, il est important de mentionner que le génome de cette espèce a été séquencé dans sa totalité. Il est composé de 1506 millions de paires de bases (pb) et 26247 gènes. (http://www.ensembl.org).

Il existe plus de 20 000 articles scientifiques qui ont comme mots clés zebrafish ou *Danio rerio* (NCBI). En effet, beaucoup d'études se sont intéressées à ce modèle biologique pour étudier les impacts des contaminants aux niveaux morphologiques, physiologiques, générationnels, et moléculaires. Plusieurs auteurs ont utilisé le poisson zèbre afin de déterminer l'impact des métaux lourds en milieu aquatique tel que le cadmium (Gonzalez *et al*, 2006 ; Cambier *et al*, 2010; Burnison *et al*, 2006 ; Béchard *et al*, 2008 ; Chow *et al*, 2008 ; Ling *et al*, 2011 ; Banni *et al*, 2011 and Hsu *et al*, 2013). Le poisson zèbre a été utilisé dans de nombreuses recherches concernant les études des effets des nanomatériaux à différentes stades de son cycle de vie, tels que les nanomatériaux métalliques (nanoparticules d'or) (Asharani *et al*, 2008; Asharani *et al*, 2010; Bar-Ilan et la, 2009; Kim *et al*, 2013; Harper et al, 2011; Truong *et al*, 2012 a,b and 2013; Geffroy *et al*, 2011).

5. Echantillonnage

Les poissons zèbres que nous avons utilisés proviennent d'une source commerciale (Exomarc, Lormont, France). À leur arrivée ils ont été, dans un premier temps, acclimatés pendant une durée de 2 semaines avant le début de l'expérimentation et furent ensuite pesés afin de calculer la quantité de nourriture à leur administrer. La quantité de nourriture distribuée correspond à 5 % de la masse moyenne de ces poissons multipliée par le nombre total de poissons par unité expérimentale. Nous avons introduit dans chaque UE cinq poissons dans un volume de 3 L d'eau ; les répétitions des conditions ont été réalisées (5 répliques) afin d'avoir un nombre d'individus permettant toutes les analyses postérieures ainsi que les études statistiques. Pendant les 20 jours de contamination les poissons ont été nourris chaque 3 jours. À la fin de chaque expérience de contamination, les poissons ont été sacrifiés en quelques secondes par immersion dans de la glace fondante, et en accord avec les directives éthiques affichées et utilisées par le programme de recherche du NIH, et ensuite rapidement disséqués. Les quatre tissus (cerveau, branchie, tractus digestif et muscle) sont soit stockés directement à -80°C pour le dosage métallique, ou bien après leur collecte immergés dans du RNA later pour les extractions des ARNs et les analyses d'expression génétique postérieures. Certains poissons ont été collectés entiers pour les tests de génotoxicité.


Figure 28. Photographies de microscopie électronique représentant les nanoparticules de Sulfure de cadmium de 8 nm.



Figure 29. Photographies de microscopie électronique représentant les micro-particules de Sulfure de cadmium de (1-10 microns).

D. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES

1. Nano- et micro-particules de sulfure de cadmium (NPs et MPs de CdS).

Les nanoparticules de sulfure de cadmium (NPs CdS) ont été fabriquées par l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB, Bordeaux, France). Les NPs CdS ont été préparées par une approche colloïdale en solution aqueuse. Une sulfate de cadmium CdSO₄ (5.10⁻⁴ mol/L; 99,99%) et du polyphosphate de sodium ont été achetés chez Aldrich. La verrerie a été soigneusement lavée avec de l'eau régale ensuite rincer avec de l'eau déminéralisée. Une solution (250 ml) de polyphosphate de sodium (300 µM) a été préparée et présenté dans un flacon tricol. Le pH a été ajusté à 9,5 avec une solution de NaOH. La solution a été dégazée par barbotage avec de l'Argon pendant 3h à 80° C. En fin de synthèse, afin d'éliminer l'excès de H₂S, la solution a de nouveau été dégazée sous argon à température ambiante pendant environ 3 h. Cette procédure conduit à la formation d'une solution colloïdale contenant des nanocristaux de CdS NPs de 8 nm de diamètre. Des microparticules de sulfure de cadmium de dimension plus importante (CdS MPs) ont été obtenues en suivant le même protocole, mais en modifiant le pH. Le pH a été ajusté à 3-4 afin de favoriser l'agrégation. Les microparticules sont formées à partir des nanoparticules agrégées et ont abouti à une solution constituée de CdS MPs d'un diamètre de 1 à 10 microns. La taille, distribution en taille et structure cristalline des particules de CdS ont été étudiées à l'aide de la microscopie électronique à transmision (TEM)(JEOL 2200 FS -à 200 kV). Par ailleurs, afin d'être représentatif et statistiquement significatifs, de nombreuses images provenant de plusieurs régions de différents échantillons ont été enregistrées et les résultats les plus caractéristiques sont présentés dans les figures. 28 et 29.



Figure 30. Photographies de microscopie électronique représentant les nanoparticules d'or (14 nm).



Figure 31. Distribution de la taille des nanoparticules d'or.

Le potentiel zêta a été déterminé en utilisant la méthode de diffusion dynamique (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments) et atteint -22 mV dans une suspension de nanoparticules à pH 7,4.

2. Nanoparticules d'or (AuNPs)

Les nanoparticules d'or ont été préparées selon la méthode de Turkevich, qui est basée sur la réduction des ions d'or en solution aqueuse avec du citrate trisodique (Kimling *et al.* 2006). Une masse de sels d'or de KAuCl₄ (101,4 mg) a été dissoute dans l'eau ultrapure (100 ml) et ajoutée sous agitation vigoureuse à 400 ml d'eau ultrapure bouillante. Lorsque l'ébullition reprit, un volume de 50 ml de citrate de sodium à 1% fut ajouté sous agitation, et l'ébullition poursuivie pendant 20 minutes supplémentaires. La solution colloïdale finale d'une coloration rouge bordeaux contenait des AuNPs d'un diamètre de 14 nm (Fig.30). La caractérisation des AuNPs a été étudiée à l'aide de la microscopie électronique à haute transmission. Les AuNPs se présentaient sous forme sphérique avec un diamètre moyen de 14 nm ; afin d'être représentatif et statistiquement significatif, de nombreuses images provenant de plusieurs régions de différents échantillons ont été enregistrées en notant la taille des particules. La distribution de la taille des nanoparticules est présentée dans la figure 31. Le potentiel zêta a été déterminé en utilisant la méthode de diffusion dynamique (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments) et atteint -50 mV dans une suspension de pH 8.

$Au^{III} + 3 \text{ réd} \rightarrow Au^0 + 3 \text{ Ox}$ n $Au^0 \rightarrow Au_n$

Figure 32. Réaction de réduction des ions de l'or en solution aqueuse.



Figure 33. Principales étapes de la procédure analytique pour le dosage du cadmium et de l'or par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (en four graphite pyrolitique ou flamme) pour les échantillons biologiques, de sédiment et d'eau.

E. TECHNIQUES D'ANALYSES

1. Techniques de quantification des métaux

1.1. Préparations des échantillons

Les techniques de dosage des éléments métalliques (Cd et Au) appliquées lors des expérimentations présentées dans ce manuscrit nécessitaient l'utilisation d'échantillons sous forme liquide. Ainsi, une préparation été réalisée sur tous les échantillons. La préparation des échantillons s'est faite selon le type d'échantillon comme suit (Fig.33) :

• Échantillons d'eau :

Les prélèvements des échantillons d'eau ont été réalisés durant les 20 jours de contamination dans des tubes de polypropylène chaque trois jours et stockés à 4°C afin de permettre un suivi régulier du métal dans la colonne d'eau.

Avant chaque dosage les échantillons ont été acidifiés avec de l'acide nitrique (HNO₃ - 65% ultrapur, Merck, Allemagne) pour les expériences qui contenaient le cadmium comme contaminant et de l'eau régale (mélange d'acide nitrique et acide chlorhydrique : 1 volume HNO₃ et 3 volume d'HCl - 37 % Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Allemagne) pour les expériences qui contenaient l'or comme contaminant. Le dosage des deux métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) exigeait une concentration d'acide comprise entre 2 et 20%. Nous avons utilisé pour chaque échantillon un volume d'eau de 20 mL, divisé en deux : 10 mL non filtré pour la détermination de la concentration totale du métal et 10 ml d'eau filtrée à 0.2 μ m (membrane en acétate de cellulose SFCA) pour la détermination de la concentration de la fraction filtrable du métal. Pour un échantillon d'eau de 10 mL, nous avons ajouté 0,6 mL d'acide nitrique ou d'eau régale afin d'avoir une acidification des échantillons à 6%.



Figure 34. Procédure de minéralisation des échantillons biologiques et sédimentaires en vue de leur analyse par spectrophotométrie à absorption atomique.

• Échantillons sédimentaires :

Après déshydratation du sédiment (en utilisant un lyophilisateur-Thermo scientific-Heto- PowerDry LL3000 pendant 72 heures), un poids équivalent à 50 mg de sédiment sec a été récupéré dans des tubes de polypropylène. Le sédiment fut ensuite acidifié avec 3 mL d'HNO₃ (pour les expériences qui contenaient le cadmium comme contaminant) ou bien 3 mL d'eau régale (pour les expériences qui contenaient l'or comme contaminant) et les tubes placés dans une rampe de minéralisation chauffée à 100°C pendant trois heures (bloc chauffant CAL 3300, Environmental Express, USA) afin d'optimiser l'attaque acide. Après refroidissement, les gouttes de condensation restant sur les capsules sont récupérées par rinçage avec l'eau de dilution. La dilution des échantillons minéralisés a pour premier objectif de diminuer l'acidité des échantillons par l'ajout de 15 mL d'eau milliQ Millipore (Fig.34).

• Échantillons biologiques:

Vers oligochètes :

Les lots de vers échantillonnés ont été pesés (poids frais, pf), un poids équivalent à 50 mg (pf) a été récupéré dans des tubes de polypropylène acidifié et digéré avec 3 mL d'HNO₃ (pour les expériences qui contenaient le cadmium comme contaminant) ou bien 3 mL d'eau régale (pour les expériences qui contenaient l'or comme contaminant) et ensuite placés dans une rampe de minéralisation et chauffés à 100°C pendant trois heures (Fig.34). Après refroidissement, les gouttes de condensation restant sur les capsules sont récupérées par rinçage avec l'eau de dilution. La dilution des échantillons minéralisés a pour premier objectif de diminuer l'acidité des échantillons par l'ajout de 15 mL d'eau milliQ Millipore.

Poisson zèbre :

Les poissons ont été utilisés seulement pour les expérimentations de contamination du sédiment aux nanoparticules d'or. La minéralisation des échantillons de poissons zèbres a consisté à rajouter les volumes d'eau régale selon le poids de chaque échantillon. Pour les tissus ayant des poids compris entre 10 et 20 mg (branchies), la digestion des échantillons s'est faite dans 1 mL d'eau régale à 100° pendant 3 h. Pour les tissus ayant des poids supérieur à 20 mg (muscles, tractus digestifs) la digestion s'est faite dans 3 mL d'eau régale à 100° pendant 3 h. Les digestions acides de branchies, d'appareil digestif et de muscles ont subi ensuite une dilution (x 6) avec de l'eau ultra-pure (MilliQ, Bedford, MA, USA). Les cerveaux des poissons zèbres (ayant un poids inférieur à 10 mg) ont été digérés dans 0,2 mL d'eau régale à 100°C pendant 3h, et ensuite dilué (x 5) avec l'eau ultra-pure en utilisant des cryotubes (CRYOS PP- Greiner bio one) (Fig.34).

1.2. Dosage des métaux

La spectrophotométrie d'absorption atomique est basée sur le principe qu'une population d'atomes peut absorber des photons et que le nombre de photons absorbés peut être relié à la concentration de l'élément dans la solution à analyser. La spécificité de détection est liée à la longueur d'onde de la lumière, spécifique de l'atome analysé.

Nous avons utilisé pour le dosage du cadmium dans l'eau, les tissus des organismes et le sédiment, la technique de spectrophotométrie à absorption atomique avec correction Zeeman (AA 400, Varian, USA) couplé à un four en graphite pyrolytique (modèle GTA 96) avec un auto-échantillonneur (GTA 96, Varian, Australie) à la longueur d'onde de 228,8 nm. Le prélèvement et l'ajout de modificateurs de matrice est réalisé par l'appareil avant chaque dosage d'un échantillon (2 μ L de solution Pd(NO₃)₂ à 2 g/L et 2 μ L de solution de Mg(NO₃)₂ à 1g/L) de manière à minimiser les effets de matrice, conjointement à une correction du bruit de fond par effet Zeeman.

La validité de la méthode a été périodiquement vérifiée par le dosage d'échantillons certifiés (foie de roussette, DOLT-4 et hépatopancréas de homard, TORT-2, NRCC-CNRC, Canada), ainsi que celui trois blancs (acide pur) ayant subi les mêmes étapes de minéralisation et de dilution.

Le dosage de l'or a été réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique avec correction Zeeman en four de graphite pyrolytique à la longueur d'onde de 242,8 nm pour les échantillons d'eau et les tissus des organismes. Les échantillons de sédiment ont été dosés avec la technique de spectrophotométrie d'absorption atomique avec correction Zeeman en flamme (AA20, Varian, Australie) en raison des plus fortes concentrations utilisées durant la contamination du sédiment aux nanoparticules d'or (supérieures à 10 mg/kg). La validité de la méthode a été périodiquement vérifiée par le dosage d'échantillons à partir de solutions mères d'or de concentrations connues.

Les limites de détection du AA 400 Varian étaient **30 ng Cd/L** pour les échantillons d'eau et **10 ng Cd/g** pour un tissu de 50 mg (pf), **25 ng Au/L** pour les échantillons d'eau et **15 ng Au/g** pour un tissu de 30 mg (pf). Les limites de détection du Varian AA 220 étaient **2,5 mg Au/L** pour les échantillons d'eau.

2. Techniques de quantification protéique et enzymatique

2.1. L'activité de neurotransmission l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Elle est spécifique des esters de l'acide acétique et, si physiologiquement son substrat est l'acétylcholine, elle catalyse également l'hydrolyse de la butyrylcholine, de la butyrylthiocholine ou de l'acétylthiocholine. Dans ce dernier cas, les produits de la réaction d'hydrolyse sont l'acide acétique et la thiocholine. La méthode spectrophotométrique d'Ellman (1961) est basée sur le taux d'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'AChE qui libère de la thiocholine qui va réagir avec du DTNB (5-dithiobis-2-nitrobenzoate) (Fig.35) pour produire l'anion de couleur jaune TNB (5-thio-2-nitro-benzoate) absorbant à 412 nm. La réactivité de la thiocholine repose sur son groupement thiol lui permettant de réduire le pont disulfure reliant les deux molécules TNB, et de se lier à l'une d'elle. Ainsi, pour une molécule d'acétylthiocholine hydrolysée, un anion TNB reste libre, donc la stœchiométrie est unitaire. De ce fait, en mesurant la densité optique (DO), on peut par la loi de Beer-Lambert (DO = $\varepsilon \times 1 \times c$) retrouver la concentration en substrat hydrolysé, qui est la même que celle en produit (TNB). Le coefficient d'extinction molaire (ɛ) du DNTB à 412 nm est de 3,700 M⁻¹cm⁻¹. Il suffit donc de calculer la différence de DO entre deux temps cinétique pour obtenir la quantité de substrat hydrolysé sur un intervalle de temps (nmol de substrat hydrolysé/min), et de le diviser par la quantité de protéine (obtenue par le test de Bradford) dans le tissu pour obtenir la vitesse initiale spécifique de l'AChE pour le tissu (Vi en nmol de substrat hydrolysé/mg de protéines/min). L'activité spécifique de l'AChE a été quantifiée dans ce travail de recherche par la mesure de la vitesse initiale d'activité dans le cerveau et les muscles des trois poissons de chaque condition.



Figure 35. Réaction chimique d'Ellman.



Figure 36. Réaction chimique de révélation des Métallothionéines par le DTNB.

Le milieu réactionnel d'un volume final de 350 μ l contenait 50 μ l d'homogénat (tissu broyé dans 60 fois son poids en volume de tampon phosphate NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8), 50 μ l de DTNB 100 mM, 50 μ l d'acétylthiocholine 75 mM et 200 μ l de tampon phosphate 50 mM pH 8.

La réaction a été initiée par l'ajout du substrat dans chacun des puits de la microplaque contenant le milieu réactionnel, et l'absorbance a été mesurée toutes les treize secondes sur cinq minutes à l'aide du spectrophotomètre pour microplaque EPOCH, BioTek.

2.2. La concentration protéique

Ce dosage permet de normaliser les résultats obtenus à l'issue du dosage enzymatique en fonction d'une quantité totale de protéines présente dans les échantillons. La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Bradford, 1976. Cette méthode de mesure de concentration protéique est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant: le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun en milieu acide, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines (la forme anionique est en effet stabilisée par des interactions hydrophobiques et ioniques, ce colorant réagissant avec l'arginine et en moindre importance avec l'histidine, la lysine, la tyrosine, la trypsine et la phénylalanine). Par conséquent, il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

2.3. Les métallothionéines

La quantification des métallothionéines (Mths) a été faite selon la méthode de Linde *et al*, 2005, qui consiste à homogénéiser les tissus de vers dans un tampon de saccharose (0,5 M) et du Tris-HCl (20 Mm) à pH 8,6 et du β -mercaptoetahnol (0,01 %) sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation des fonctions thiols des mths. Ensuite, ils sont concentrés par centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes.

L'éthanol absolu (-20°C, 1,05 mL par mL de surnageant) et le chloroforme (80 µL/mL de surnageant) ont été rajouté avant une centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes. Les échantillons ont été ensuite remis en suspension en rajoutant 3 volumes d'éthanol et conservé à -20°C pendant 1h. La purification des mths a été réalisée par le lavage les échantillons avec du tampon ethanol:chloroform: homogenization (87:1:12) et une centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes. Le culot obtenu est ensuite séché sous atmosphère d'azote jusqu'à évaporation complète et remis en suspension dans 300 μ L de tampon (5 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) et ensuite 4,2 mL de (0,43 mM) de DTNB dans 0,2 M de tampon phosphate (pH 8) ont été ajouté à la fraction des mths. Le milieu réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes. L'évaluation de la réduction du sulfhydryl (Fig.36)a été effectuée en lisant les absorbances à la longueur d'onde de 412 nm avec un spectrophotomètre (UV-1601 - SHIMADZU). Une courbe standard avec le glutathion (GSH) est nécessaire en tant que référence pour la quantification des mths dans les échantillons. Le GSH contient une cystéine par molécule, donc, c'est une norme pour quantifier cystéines en protéines analyses.



Figure 37. Démarche expérimentale pour l'extraction d'ADN génomique issu d'un échantillon biologique (Miller *et al*, 1988).

3. Techniques de biologie moléculaire

3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les tissus de poisson zébre (branchie, muscle, cerveau et appareil digestif) ainsi que des segments de vers tubifex sont prélevés aseptiquement puis conservés à -80°C afin d'éviter toute dégradation par l'action des desoxyribonucléases (DNases) présentes dans les tissus. Après décongélation, l'ADN génomique a été extrait selon deux méthodes :

- La première utilise le kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabriquant: les tissus préalablement broyés (≈ 40 mg) sont lysés dans un tampon contenant de la protéinase K à 65°C. Le lysat obtenu est ensuite dispersé dans de l'éthanol à 95 % puis soumis à une étape de séparation sur colonne d'affinité. Après deux rinçages par des tampons chargés en sels, l'ADN total est élué de la colonne avec 200 µL de tampon TE (Tris-EDTA) puis stocké à -20 °C.
- La deuxième méthode est celle de Miller *et al*, 1988 (Fig.37) et consiste à digérer les tissus broyés sur la nuit avec 10 mL/g du tampon d'extraction suivant : 10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA, 0.5 % de SDS, 200 µg/mL de protéinase K (Promega) à 37°C. Après digestion, les échantillons sont précipités par du NaCl à 6 M (1mL) suivi d'une centrifugation à 2500 t/min. Le surnageant récupéré dans de nouveaux tubes est ensuite précipité par deux volumes d'éthanol absolu après ajout de la RNAse A (100 µg/mL), qui permet de dégrader les ARN qui ont été extraits et purifiés en même temps que l'ADN. L'ADN génomique contenu dans la phase aqueuse se présente alors sous forme d'une pelote, rincée 2 fois dans de l'éthanol

à 70% (cette étape permet de retirer les sels), et stockée à - 20 °C. Après avoir séché la pelote pour enlever toute trace d'éthanol, elle est dissoute dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). La quantification de l'ADN est réalisée par lecture de l'absorbance à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des acides nucléiques (1 unité à la longueur d'onde de 260 correspond à 50 µg d'ADN/mL) ou par observation sur gel d'agarose a 1% (électrophorèse : méthode qui sépare ADN, ARN ou protéines en fonction du poids moléculaire, basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique).

3.2. Extraction des ARNs totaux et synthèse des ADNc

Les tissus de poisson zébre (branchies, cerveau, muscles et appareil digestif) sont disséqués rapidement et stockés à -80° C directement dans un tampon contenant des inhibiteurs de RNAses (RNA later, Qiagen). Après décongélation, les ARN totaux sont extraits avec le kit Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies) selon les recommandations du fabricant.

Les tissus (au maximum 50 mg en poids humide) sont lysés mécaniquement dans un tube Eppendorf à l'aide d'un mortier dans un tampon contenant l'isothiocyanate de guanidine comme agent dissociant. Le lysat obtenu est ensuite filtré afin d'éliminer les débris tissulaires et membranaires. Une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1; v/v/v) est ensuite réalisée afin d'éliminer les protéines de la préparation. Après centrifugation ($20\ 000 \times g$, $10\ min, 4\ ^{\circ}C$), les acides nucléiques présents dans le surnageant sont adsorbés sur une colonne d'affinité et incubés en présence de DNAse ($1\ h\ a\ 37\ ^{\circ}C$). Après une étape de lavage de la colonne, les ARN totaux sont élués avec 50 µL de tampon d'élution puis stockés à - 80 °C. La qualité des ARNs est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Les ADNc sont obtenus à partir de 17,3 μ L d'ARN totaux à l'aide du kit AffinityScript multiple temperature RT (Agilent Technologies). Brièvement, les ARNs en solution sont incubés (5 min à 65 °C) après addition de 1 μ L d'oligo(dT) (0,5 μ g/ μ L), de 1 μ L d'un mélange d'amorces aléatoires (0,1 μ g/ μ L), 0,8 μ L de dNTPs (100 mM) et 2 μ L de tampon d'activité (x10). On ajoute ensuite 0,5 μ l de protéine inhibitrice de RNAse, 1 μ L transcriptase inverse, on incube au thermocycleur à 42° C pendant 1h. Les ADNc obtenus (brin complémentaire) sont alors directement conservés à -20 °C.

Fonction	Nom du	Numéro	Amorees $(5^{2}-3^{2})$
ronetion	gène	d'accession	
Soutien du	βactin1	NM 131031	AAGTGCGACGTGGACA ^a
cytosquelette		—	GTTTAGGTTGGTCGTTCGTTTGA ^b
Métabolisme	coxI	NC_002333	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a
mitochondrial		_	AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
Stress oxydant	sod 1	BC055516	TGAGACACGTGGGAGACC ^a
			TGCCGATCACTCCACAGG ^b
	sod 2	CB923500	ATGGCTTTAACATAGTCCGGT ^a
			TTCAGGGCTCAGGCTGG ^b
	hsp70	AB062116	CCAGGGAGTTTTTAGCAGAAA ^a
			CATCGACGCCAACGGG ^b
Réparation	gaad	BC059472	CTTCCCGCATTCAGCGAT ^a
d'ADN			GCTTGTTCGTGTGTCTTCTGTGG ^b
	rad51	BC062849	GCCTCGGCCTCTGGTAA ^a
			TGCTGCGTCTCGCTGA ^b
Neurotransmission	achE	NM_131846	GTTAAGCAGACGAGGC ^a
			CCCGCATGGTAATCC ^b

Tableau 7. Rôle, numéro d'accession et paires d'amorces spécifiques sélectionnées pour les gènes du *D*. poisson zèbre.

Abréviations: mt – métallothionéine ; coxI – sous-unité I cytochrome C; sodI- superoxidedismutase ; sod 2- superoxide-dismutase mitochondriale; hsp70- protéine de choc thermique de 70 kDa; gadd – growth-arrest DNA-damage; achE-Acetyl-Cholinesterase;. ^aamorce en amont, ^bamorce en aval.

Tableau 8. Amorces spécifiques et non spécifiques utilisés pour la RAPD-PCR			
OPB7	5'-GGTGACGCAG-3'		
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'		
OPA9	5'-GGGTAACGCC-3'		
28S (Tubifex tubifex)	AGAGCGTACACGTTGG ^a		
	CCAGCTATCCTGAGGG ^b		

3.3. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative (réaction de polymérisation en chaîne) a été utilisée au cours de nos travaux pour évaluer l'effet d'un stress (contamination) sur le niveau d'expression de certains gènes, c'est-à-dire sur la production d'ARNm d'un gène donné à un instant t. La méthode d'analyse permet la détection et la quantification des produits synthétisés à chaque cycle d'amplification. Cette détection est possible grâce à l'insertion de fluorophores (le SYBRgreen) à l'intérieur de chaque brin d'ADN nouvellement synthétisé.

L'intensité de la fluorescence émise, mesurée à 530 nm, est directement proportionnelle au nombre de copies du fragment synthétisées car le fluorophore n'émet une fluorescence que s'il est lié à de l'ADN. Le thermocycleur utilisé pour ces analyses était le MX 3000 P (Stratagene). Cet appareil est un thermocycleur équipé d'un spectrophotomètre qui mesure la fluorescence émise par chaque échantillon à l'issue de chaque étape d'élongation. Dans notre cas le type de quantification est dit relatif, car en plus des gènes d'intérêt, un contrôle endogène était systématiquement amplifié. Le gène de référence choisi fut le gène codant pour la β actin1. Pour chaque échantillon analysé, le nombre de copies d'ADNc du gène d'intérêt a été normalisé par rapport au nombre de copies d'ADNc du gène β actin1, avant d'être utilisé pour comparer l'expression des gènes d'intérêt chez les individus stressés par rapport aux individus témoins. Les amorces ont été définies à l'aide du logiciel Light Cycler Probe design (version 1.0, Roche) (Tableau.7). Les réactions de PCR quantitative ont été réalisées dans des microplaques de 96 puits. Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µL de solution Master mix SYBRgreen, Brilliant III (Agilent), contenant la polymérase Taq ainsi que son cofacteur (l'ion Mg^{2+}), des dNTPs et du tampon, 9,5 µL d'eau ultra-pure stérile, 2 μL du mélange du couple d'amorces (2 μM chacun) et 1 μL d'ADNc, obtenus après extraction et rétro-transcription des ARN.

Le programme thermique utilisé présentait une étape préalable d'activation de l'enzyme (10 min à 95°C) suivie de la répétition de 40 cycles d'amplification (95°C, 30s; 60°C, 30s et 72°C, 30s). En fin de réaction, la spécificité de la PCR fut vérifiée par analyse de la courbe de fusion de chaque échantillon. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par une température de fusion (T*m*) qui lui est propre et qui dépend notamment de sa composition en bases G et C. Le thermocycleur détermine ce T*m* par analyse de la décroissance de la fluorescence au cours d'un cycle de température allant progressivement de 60 à 95°C par pas de 0,5°C.

Ct: Cycle thershold ou cycle seuil correspond au moment d'apparition du signal seuil de la florescence du SYBRgreen. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

3.4. <u>PCR par amorçage aléatoire (RAPD) : Random Amplified Polymorphism</u> <u>DNA)</u>

La technique RAPD est actuellement utilisée pour la détection du polymorphisme intra-populationnel, mais la technique permet aussi de détecter les altérations génétiques après la contamination des animaux par des polluants (Fig.38); (Atienzar and Jha, 2006), même chez des espèces non clonales comme *Daphnia magna* (Atienzar *et al*, 1999, 2004 ; Plaire *et al*, 2013), l'algue *Palmaria palmata* (Atienzar *et al*, 2000a), le bernacle *Elminius modestus* (Atienzar *et al*, 2002), le mollusque bivalve *Mytilus edulis* (Hagger *et al*, 2005) et le poisson zèbre (Cambier *et al*, 2010; Lahdar *et al*, 2013 ; Geffroy *et al*, 2012; Orieux *et al*, 2011; Zhiyi et Haowen, 2004 ; Lerebours *et al*, 2013).

Les RAPD-PCR en temps réel ont été faites dans le Lightcycler Roche. Chaque réaction a été accomplie dans un volume réactionnel de 20 µL dans un capillaire comprenant 16 ng d'ADN génomique (dans 2µL), 2 µL de l'amorce à 6 μM, 16 μL du mélange de PCR constitué de 1 μL du tampon 1b activé (tampon contenant le SYBRgreen, la polymérase Taq et dNTPs), 3,2 µl de MgCl₂ à 25mM et 11,8 µL d'eau milliQ autoclavée. Le programme thermique utilisé pour cette RAPD-PCR en temps réel est composé d'une étape de chauffage de 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles d'amplification à 95°C pendant 5 s, 50°C pendant 5 s, et 30 s à 72°C. À la suite de ces 50 cycles d'amplification, les courbes de dissociation ont été obtenues en suivant la diminution du niveau de fluorescence du SYBRgreen pendant un chauffage progressif des produits de PCR de 60 à 95°C. L'analyse des courbes de fusion a été faite en utilisant le logiciel LightCycler 3.5 (Roche). Pour un capillaire donné issu de la RAPD-PCR, la température de fusion (Tm) de chaque produit de PCR est obtenue et énumérée dans une table logique couvrant 11 intervalles de températures différentes s'étendant de 69 à 89°C.



Figure 38. Schéma représentant le principe de la réaction de RAPD et son utilisation pour détecter les impacts génotoxiques avec le cas de la suppression du site d'hybridation n°3 simultanément à la création du site n°6 par un xénobiotique.

L'impact du xénobiotique se traduit ici par la perte d'un des produits de PCR conjointement à l'apparition d'un autre. L'ADN génomique est ici utilisé comme base pour la réaction de PCR réalisée à l'aide d'une seule amorce synthétisée de façon aléatoire. Les flèches représentent des copies de la même amorce s'hybridant sur l'ADN sur les deux brins, le sens des flèches indique le sens de synthèse de l'ADN lors des cycles de PCR. La comparaison des tables logiques entre la condition contaminée et la condition témoin permet de mettre en évidence des intervalles de température pour lesquels la fréquence des produits de PCR pour un Tm connu diffère. L'analyse des courbes de température de fusion a été exécutée plutôt qu'une analyse de bande par électrophorèse sur gel d'agarose car à de basses doses de toxique, les différences potentielles entre les bandes d'ADN des conditions contrôles et contaminées sont faibles et de basse intensité ce qui en rend l'interprétation difficile et ne permet pas la visualisation et donc la prise en compte des fragments amplifiés de masse inférieure à 10 mg.

Par conséquent, malgré le fait que la résolution entre les bandes dans un gel d'agarose est en grande partie supérieure à la résolution des courbes de fusion une méthode à l'origine conçue pour démontrer la présence ou l'absence de seulement un produit de PCR, c'est-à-dire non prévu pour résoudre les produits multiples - l'analyse des courbes de fusion fournit plus d'information à de basses doses car un pic de température de fusion est le résultat de plusieurs produits de PCR partageant des températures de fusion très proche les unes des autres. Ainsi, des différences potentiellement minuscules sont amplifiées au lieu d'être dispersées et diluées tout au long d'un gel d'agarose.

Pour chaque ADN génomique, l'analyse quantitative est fondée sur la différence du nombre de cycle d'amplification nécessaire pour entrer dans la phase exponentielle de PCR, en utilisant les amorces non spécifiques OPB7 ou OPB11, et les couple d'amorces spécifiques ciblant le gène *βactine* pour le poisson zèbre, et les amorces non spécifiques OPB7 ou OPA9, et l'amorce spécifique 28S respectivement pour les vers *T. tubifex* (Tableau.8). La différence, marquée Δ égale à Ct amorce non spécifique – Ct amorce spécifique reflète la différence de l'hybridation entre la sonde et les amorces RAPD, elle conduit au calcul de l'efficacité relative d'hybridation entre les deux amorces, qui peut être calculée en utilisant la formule suivante : $2^{\Delta+2}$ pour le *D. rerio*, $2^{\Delta+1}$ pour les vers oligochètes.

La valeur de cette efficacité relative d'hybridation a été calculée à partir de la moyenne de 10 ADN génomiques différents pour les deux conditions expérimentales. Le calcul du nombre de sites d'hybridation s'effectue de la méthode suivante :

Poisson zébre : la quantification des sites d'hybridations

 Δ =Ct (β actine)-Ct (OPB7) ou Ct(OPB11)

Quand Δ = 0, le nombre de sites d'hybridation (SH) est le même pour le gène βactine et l'amorce OPB7donc 4 SH (2 amorces sur 2 allèles), soit 2^{Δ+2}.

Quand Δ = 1, le nombre SH de l'amorce OPB7 est double de celui des amorces de β actine, donc 8 SH, soit $2^{\Delta+2}$.

Quand Δ = n, le nombre SH de l'amorce OPB7 vaut 2ⁿ fois plus que celui des amorces de β actine, soit 2^{Δ +2} SH ou 2ⁿ⁺².

Vers tubifex : la quantification des sites d'hybridations est relative

 Δ =Ct (28S)-Ct (OPB7) ou Ct(OPA9)

Quand $\Delta = 0$, le nombre SH est 2n SH /cellule.

Quand $\Delta = 1$, le nombre SH est 2 x 2n SH /cellule.

Quand $\Delta = 2$, le nombre SH est 4x 2n SH /cellule.

Quand $\Delta = m$, le nombre SH est $2^m \times 2n$ SH /cellule

Le nombre de SH relatif = nombre de SH / nombre de gène 28S

 $= 2^{m}x \ 2n \ /n = 2^{m}x \ 2 = 2^{m+1} = 2^{\Delta+1}$



Figure 39. Principe général de quantification du remaniement sédimentaire par la méthode de mesure de profils verticaux de traceurs sédimentaire. (1) : dépôt des traceurs qui sont mélangés dans la colonne sédimentaire par les organismes. (2) : Mesure du profil vertical de concentration de ces traceurs dans la colonne sédimentaire. (3) Ajustement de ce profil avec un modèle mathématique pour dériver un indice de l'intensité du remaniement sédimentaire au cours du laps de temps séparant le dépôt des traceurs à l'interface eau-sédiment et la mesure du profil. Modifié d'après Maire *et al.* 2008.

1. Étude de la bioturbation par mesure de profils verticaux des traceurs sédimentaires

L'utilisation de traceurs sédimentaires permet d'accéder à la composante verticale du remaniement sédimentaire ainsi qu'au devenir des particules initialement positionnées à la surface du sédiment. La quantification de l'intensité du remaniement sédimentaire repose alors sur la mesure de profils verticaux de concentration de traceurs. Ces profils sont ensuite ajustés à l'aide d'un modèle mathématique sensé décrire les mouvements des particules de traceur ayant entraîné la modification de leur distribution dans le sédiment, permettant ainsi de calculer un indice reflétant l'intensité du remaniement sédimentaire. Ces traceurs peuvent être naturellement présents dans le sédiment, ou bien artificiellement introduits. La mesure des profils verticaux de concentration des traceurs dans la colonne sédimentaire repose la plupart du temps sur la découpe de carottes sédimentaires en fines tranches d'une épaisseur donnée après prélèvement lorsqu'il s'agit de traceurs naturellement présents dans le sédiment, ou après incubation in-situ ou ex-situ (en conditions contrôlées en mésocosme) pendant un temps donné lorsqu'il s'agit de traceurs artificiellement introduits. Les profils ainsi mesurés sont par conséquent limités à une seule dimension (verticale) et à un seul temps expérimental, ce qui empêche toute vision dynamique et en deux dimension du remaniement sédimentaire (Fig.39). Les traceurs artificiellement introduits permettent une mesure du remaniement sédimentaire à une échelle de temps allant de quelques heures à environ 1 mois après leur dépôt à la surface du sédiment. Ces traceurs peuvent être des sables minéraux ; des particules de sédiment ou de la matière organique marquées radioactivement (Blair et al, 1996), des particules de sédiment enrichies en métaux nobles (Wheatcroft et al, 1994) ou des billes de verre (Shull and Yasuda, 2001). La littérature fait majoritairement état de particules de plastique ou de sédiment recouvertes de peinture fluorescente aux rayonnements ultra-violet (UV) respectivement dénommées microtaggants (Wheatcroft, 1991) et luminophores (Mahaut et Graf, 1987).



Figure 40. Procédure de découpage en tranches des carottes de sédiment (Ciutat, 2003).

L'activité de bioturbation des tubificidés dans le sédiment durant notre travail de recherche a été caractérisée et quantifiée en utilisant des traceurs particulaires fluorescents. Les traceurs retenus étaient les luminophores qui sont des particules de sédiment naturel recouvertes de peinture fluorescente appartenant à deux spectres de taille : \emptyset = 63-100 µm et \emptyset = 100-315 µm (Ciutat, 2003).

Ces traceurs ont été utilisés dans les UEs contenant les vers oligochètes, des galettes de 3mm d'épaisseur constituées de mélange de sédiment et de luminophores ont été congelées. Une galette a été déposée à la surface de chacune des UEs, 24 h après l'introduction des vers. Dans la condition vers avec poisson zèbres, les galettes ont été déposées après l'introduction des vers et juste avant les poissons le même jour.

4.1. Carottage et échantillonnage sédimentaire

Des carottes ont été effectuées dans le sédiment des UEs contenant les vers oligochètes à la fin de chaque contamination. Dans le cas des UEs de type 1, un cylindre de pvc de 5,3 cm de diamètre a été enfoncé dans le sédiment, puis retiré avec la carotte de sédiment à l'intérieur après l'aspiration de la colonne d'eau avec un tuyau (siphonage). La carotte a été placée sur un carottier fabriqué au laboratoire, afin de découper des tranches de sédiment d'épaisseurs prédéterminées (Fig.40). Les UEs de type 2 ont été placées entières sur le carottier pour y être découpées. L'épaisseur des tranches de sédiment a été contrôlée par une règle espacée de 1 cm. Nous avons utilisé les épaisseurs selon l'échelle suivante (0-0,5, 0,5-1, 1-1,5, 1,5-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-8, 8-10 cm). Les tranches de sédiment ont été découpées avec des couteaux de plastique jetables, qui ont été changés après chaque tranche pour éviter toute contamination d'une tranche de sédiment à l'autre. Les tranches destinées directement (UEs de type 1) au comptage des traceurs particulaires fluorescents (luminophores) ont été récupérées dans des tubes en polypropylène (50 mL, plastiques Falcon, VWR Fontenay-sous-Bois, France) et conservées au congélateur à - 20°C. Chaque tranche a ensuite été décongelée et a été ensuite lyophilisée (Thermo scientific-Heto- PowerDry LL3000). Le rapport poids frais/poids sec (pf/ps) de chacune des tranches a été mesuré en parallèle. Un poids équivalent à 3 g de sédiment sec a été déposé et étalé de manière homogène dans des boites de pétri afin de procéder à l'acquisition de séquences d'images (Nikon D100) sous lumière UV, en effet la boite de pétri doit être recouverte en surface afin de détecter toutes les particules fluorescente sous UV. Pour les UEs de type 1, les tranches de sédiment ont été d'abord centrifugées pendant 20 minutes à 5000 t/min. Le surnageant a été récupéré, filtré à 0.2 µm et stocké à 4°C avant préparation pour la détermination du Cd dans l'eau interstitielle. Le culot a été ensuite lyophilisé, pesé avant l'acquisition de séquences d'images pour la détermination des profils verticaux des luminophores.

4.2. Observation des échantillons sous UV, mesure des profils verticaux et Modélisation.

Les images obtenues ont été ensuite traitées avec un logiciel de comptage des luminophores (Obvious AviExplore C2.3) afin de déterminer la concentration des luminophores dans échantillons de sédiment. Les concentrations normées des luminophores en fonction de la profondeur du sédiment ont été reportées sur des graphes (profils verticaux). Les concentrations ont été représentées sous forme de pourcentage, le 100% correspondait à la somme des luminophores dans toutes les tranches de chaque carotte sédimentaire.

Afin d'estimer les paramètres de bioturbation, les profils de traceurs obtenus ont été modélisés, en utilisant le modèle de bioadvection-biodiffusion. Ce modèle classique de biodiffusion et d'advection (Gérino et al, 1998 ; Maire et al, 2008) a été appliqué aux concentrations en luminophores mesurées dans les différentes tranches de sédiment. Le principe est que les traceurs initialement déposés à l'interface eausédiments, sont déplacées à cause de l'action de la faune benthique. Les Coefficients de remaniement des sédiments sont ensuite calculés en utilisant des modèles mathématiques qui sont montés sur le profil de traceur vertical.

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D_b \frac{\delta^2 C}{\delta z^2} - V \frac{\delta C}{\delta z}$$

Avec *t*=temps (an); z=profondeur (cm); C=concentration en traceurs (%); D_b =coefficient de biodiffusion (cm².an⁻¹); V=coefficient de bioadvection (cm.an⁻¹).

L'équation du modèle est résolue avec les conditions initiales : C(z, t=0)=1 pour $z \in [0; 0,5]$; C(z, t=0)=0 pour z>0,5

et les conditions limites : $C(z \rightarrow +\infty, t)=0$ à z=0, $VC_{(z,t)}-D_b \frac{\delta C_{(z,t)}}{\delta z}=0$

La solution analytique est la suivante :

$$C(x,t) = \frac{1}{\sqrt{\pi D_b t}} exp\left(\frac{-(x-Vt)^2}{4D_b}\right) - \frac{V}{2D_b} exp\left(\frac{Vx}{D_b}\right) \left(\frac{x+Vt}{\sqrt{4D_b t}}\right) erfc$$

Ce modèle permet de calculer les concentrations théoriques en traceurs, et estime les valeurs des deux paramètres de bioturbation V et D_b . V est le coefficient de bioadvection, qui représente la vitesse du déplacement des traceurs dans le sens vertical et vers le bas. D_b est le coefficient de biodiffusion, qui représente la dispersion des traceurs (déplacement omnidirectionnel). Ces deux paramètres sont obtenus en cherchant le meilleur ajustement du modèle entre les profils des luminphores théoriques et le profil déterminé avec les valeurs mesurées, par la méthode des moindres carrés (Ciutat *et al*, 2005).

CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans le troisième chapitre de ce mémoire, les résultats obtenus au cours de l'ensemble des expériences réalisées seront présentés et discutés sous forme d'articles.

Le premier article (A) de ce chapitre est consacré à l'étude de l'impact d'un sédiment dopé aux formes nano ou microparticulaires de sulfure de cadmium sur les vers oligochètes tubifex et son effet sur leur activité de bioturbation. Nous avons analysé les effets génotoxiques de ces formes de nanomatériaux sur les vers tubifex. Nous nous sommes intéressés aussi à la caractérisation de l'activité de bioturbation des vers oligochètes et sa modification en raison de la contamination du sédiment aux nano-microparticules.

Le deuxième article (B) présente les résultats de l'exposition du poisson zèbre à un sédiment dopé aux nanoparticules d'or. Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressé au transfert des nanoparticules d'or du compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau et avons analysé leur biodisponibilité pour un organisme vivant dans le compartiment sus-jacent (colonne d'eau). Nous avons caractérisé les impacts des nanoparticules d'or sur le poisson à plusieurs niveaux moléculaires en quantifiant les altérations de l'ADN ainsi que les modifications de l'expression de certains gènes responsables du stress oxydant, du métabolisme mitochondrial, des mécanismes de détoxification, de la neurotransmission et de l'horloge biologique. Dans un but de comparaison avec les résultats d'expression du gène de neurotransmission, l'activité de l'acétylcholinestérase a été mesurée dans le cerveau et le muscle des poissons.

Le troisième article (C) aborde l'étude de l'impact et la biodisponibilité des nanoparticules d'or incluses dans un sédiment sur un biotope double comprenant des vers tubifex et des poissons zèbres. Nous avons analysé les impacts génotoxiques des nanoparticules d'or pour les deux organismes exposés simultanément, le transfert de l'or du compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau, ainsi que la modification de l'expression des gènes chez le poisson zébre en réponse à la contamination. Nous avons analysé l'activité de bioturbation des vers oligochètes en réponse à la contamination aux nanoparticules d'or et la présence de poisson zébre dans la colonne d'eau.

Le quatrième article (D) présente les résultats de l'exposition de deux organismes marins à une contamination polymétallique mimant les conditions de la baie de Skikda -Nord-Est Algérien. L'impact de cette contamination a été évalué sur l'espèce de bivalve *Ruditapes phillipinarum* et les polychètes *Hediste diversicolor*. Dans cette partie, nous nous sommes intéressé aux altérations de l'ADN provoquées par cette contamination chez les deux organismes, ainsi qu'à l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme mitochondriale chez la palourde.

A. IMPACT SUR LES VERS OLIGOCHÉTES D'UN SÉDIMENT DOPÉ AUX FORMES NANO OU MICROPARTICULAIRES DE SULFURE DE CADMIUM ; EFFET SUR LEUR ACTIVITÉ DE BIOTURBATION

Le Sulfure de cadmium nano-et microparticules déclenchent altérations de l'ADN et modifie l'activité de bioturbation des tubificidés exposés par les sédiments.

Afin d'étudier l'impact des nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS NPs) dans les systemes aquatiques (eau douce), des vers tubificidae ont été exposés à des sédiments contaminés avec de faible concentration de CdS NPs (0,52 mg/kg de CdS NPs de 8 nm de diametre) pendant 20 jours en utilisant des microcosmes. Les CdS NPs ont été libéré dans la colonne d'eau depuis le sédiment durant la periode d'exposition, la concentration moyenne de Cd dans la fraction filtrée de la colonne d'eau atteignait $0.026 \pm 0.006 \ \mu g/L$ en présence de vers. Des expriences similaires avec du CdS microparticulaire et du chlorure de Cd (CdCl₂) ont été similtanément effectuées à des fins comparatives. L'exposition aux CdS NPs a déclenché diverses effets chez les vers, y compris la modification de la composition du génome telle qu'évaluée au moyen de tests de génotoxicité RAPD-PCR. Les niveaux de bioaccumulation ont montré que les CdS NPs etaient mois disponibles pour les vers que le $CdCl_2$ et atteignait $0.08 \pm 0.01 \ \mu g \ Cd/g \ pour$ *l'exposition aux CdS NPs contre* $0.76 \pm 0.3 \ \mu g \ Cd/g \ pour \ l'exposition aux \ CdCl_2$. Les CdS NPs modifient le comportement des vers en diminuant significativement l'activité de bioturbation en utilisant les traceurs fluorescents. Cette étude a démontré les potentiels dommages des nanoparticules de CdS malgré leur faible biodisponibilité pour les vers Tubifex.

Cadmium sulfide nanoparticles trigger DNA alterations and modify the bioturbation activity of tubificidae worms exposed through the sediment.

Amina Dedeh¹, Aurelie Ciutat¹, Pascal Lecroat², Mona Treguer-Delapierre³ & Jean – Paul Bourdineaud¹

¹ University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

² University of Bordeaux, CNRS, UPR 9048, Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, 87, Avenue du Docteur Schweitzer, 33600 Pessac, France

³ University of Bordeaux, CNRS, UPR 9048, Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, 87, Avenue du Docteur Schweitzer, 33600 Pessac, France

Amina Dedeh: a.dedeh@epoc.u-bordeaux1.fr

Tel. : +33 556 223 930; fax: +33 556 549 383

Aurelie Ciutat : a.ciutat@epoc.u-bordeaux1.fr

Pascal Lecroart : p.lecroart@epoc.u-bordeaux1.fr

Mona Treguer-Delapierre: treguer@icmcb-bordeaux.cnrs.fr

Corresponding author:

Jean -Paul Bourdineaud:jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

Phone: (+33) 5 56 22 39 30; Fax: (+33) 5 56 83 51 04

Les résultats de cette étude vont être soumis pour publication dans le journal Environmental Science and Technology.
Abstract

To address the impact of cadmium sulfide nanoparticles (CdS NPs) in freshwater ecosystems, aquatic worms Tubifex tubifex were exposed through the sediment to a low dose (0.52 mg of 8 nm in size of CdS NPs/kg) for 20 days using microcosms. CdS NPs were released from the sediment to the water column, and during this period the mean concentrations of Cd in the filtered water fraction were $0.026 \pm 0.006 \ \mu g/L$ in presence of worms. Similar experiments with microparticular CdS and cadmium chloride (CdCl₂) were simultaneously performed for comparative purposes. CdS NPs exposure triggered various effects on Tubifex worms, including modification of genome composition as assessed using RAPD-PCR genotoxicity tests. Bioaccumulation levels showed that CdS NPs were less bioavailable than CdCl₂ to worms and reached $0.08 \pm 0.01 \ \mu g \ Cd/g$ for CdS NPs exposure versus $0.76 \pm 0.3 \ \mu g \ Cd/g$ for CdCl₂ exposure (fresh weight). CdS NPs altered worm's behavior by decreasing significantly the bioturbation activity as assessed using conservative fluorescent particulate tracers. This study demonstrated the high potential harm of the CdS nanoparticular form despite its lower bioavailability for *Tubifex* worms.

Keywords: cadmium; nanoparticles; tubificidae; genotoxicity; bioturbation activity.

Introduction

Currently, the most popular and commercially available quantum dots (QDs) are those comprised of cadmium-tellurium (CdTe) or cadmium-selenium (CdSe) cores (Lim et al, 2003). They are a special class of nanoparticles (NPs) notable because of their absorbance, fluorescence and semi-conductor properties (Hardman, 2006). Cd QDs are widely used in the field of medical imaging (Wiesner and Bottero, 2007; Gagné et al, 2010), electronic and solar energies (Gagné et al, 2010). Their increased production could lead to potential ecological risks resulting in their release into aquatic environments (Klaine et al, 2008). Toxicity studies demonstrated that nanoparticle based on Cd caused cell death at high concentrations (Koeneman et al, 2009). In freshwater mussels, exposure to Cd-based QDs was immunotoxic, produced oxidative stress and DNA damage (Gagné et al, 2008a). In rainbow trout, CdTe-based QDs increased Cd levels in tissues and induced a number of biomarkers such as metallothioneins (Gagné et al, 2008b). In marine polychete *Hediste diversicolor*, exposure to CdS NPs resulted in changes in biochemical responses including defence mechanisms and behavioural impairments (Buffet et al, 2014b). In Danio rerio, exposure to CdS nanoparticles by trophic way increased Cd burden in muscles and brain, genomic alteration, gene expression imbalance, and mitochondrial dysfunction occurred after 20 days (Ladhar et al, 2014). Engineered nanoparticles (NPs) have been increasingly used in various products. These products and wastes tend to end up in waterways (e.g., drainage ditches, rivers, lakes, estuaries and coastal waters) despite safeguards (Hinther et al, 2010). Consequently, it is inevitable that nanoscale products will enter the aquatic environment. The sediment exposure route has received little attention despite the fact that most nanoparticulate metals released to the aquatic environment will accumulate in the sediment compartment (Cong et al, 2011). The sediment constitutes a very important storage reservoir, with contaminants deriving mainly from the deposit of particles in suspension in the water column, which can have a very strong metal complexation capacity (Ciutat and Boudou, 2003; Cong et al, 2011; Garcia-Alonso et al, 2011).

Species	Metal nanoparticles and contamination pressures	Accumulated metal	Toxic effects	References
Freshwater oligochaete <i>Tubifex tubifex</i> and amphipod <i>Hyalella azteca</i>	Aluminum oxide micro- and nanoparticles: Al_2O_3 (10, 25, 50 and 100).10 ³ mg/kg, for 10 days	<i>H. azteca</i> accumulated 773 \pm 154 and 2847 \pm 1041 µg Al/g after exposure to 10.10 ³ and 100.10 ³ mg/kg of Al ₂ O ₃ NPs.	No effects of Al_2O_3 NPs on <i>T. tubifex</i> survival. Reduction in growth of <i>H. azteca</i> at 100.10 ³ mg/kg of Al_2O_3 NPs.	Stanley et al, 2010
Marine polychaete, Arenicola marina	Single walled nanotubes SWNT (30 and 300 mg/kg) and nano- titanium oxide TiO_2 (1000 and 3000 mg/kg) for 10 days.	No data *	No effect of SWNT. TiO ₂ NPs: cytoxicity and DNA alteration, burrowing and feeding behavior impaired LOEC : 1g/kg.	Galloway et al, 2010
Marine polychaete, <i>Hediste</i> diversicolor	Silver nanoparticles: Ag NPs (0.25 mg/kg), for 10 days.	0.093± 0.028 μg Ag/g (fw) in <i>H. diversicolor</i> .	Ag associated with inorganic granules, organelles, and heat denatured proteins.	García-Alonso et al, 2011
Marine polychaete, <i>H.</i> <i>diversicolor</i>	Nano and micronic silver: Ag (1, 5, 10, 25, and 50 mg Ag/kg) (dw) for 10 days.	7 ± 4 and $8.6 \pm 7 \mu g$ Ag/g (dw) for 25 and 50 mg/kg of Ag NPs exposures, respectively. No differences relative to controls at lower doses.	Greater genotoxicity with nano- and micronic Ag than ionic Ag.	Cong et al, 2011
Marine bivalve and polychaete: <i>Scrobicularia</i> <i>plana</i> and <i>H.</i> <i>diversicolor</i>	Zinc oxide nanoparticles : ZnO NPs (3 mg/kg), for 16 days.	6.5 and 6.7 μg/g (ww) in <i>S. plana</i> and <i>H.</i> <i>diversicolor</i> , respectively.	Increase of GST activity in <i>H. diversicolor</i> and increase of CAT activity in <i>S. plana</i> . Impacts on burrowing activity and feeding behavior in both animals.	Buffet et al, 2012
Amphipod Leptocheirus plumulosus	Zinc oxide (ZnO), copper oxide (CuO), and nickel oxide (NiO) nanoparticles (0, 500, 1000, 1500, and 2000 mg/kg) for10 days.	After exposure to 1000 mg/kg of ZnO, CuO and NiO NPs, metals in amphipod tissues recorded 500µg Zn/g, 380 µg Cu/g and 700 µg Ni/g (dw).	Mortality increased with ZnO and CuO NPs. LC ₅₀ of ZnO NPs was 763 µg/g and 868 µg/g for CuO NPs.	Hanna et al, 2013
Freshwater oligochaete <i>Tubifex tubifex</i>	Nano and microparticular cadmium sulfide (CdS), 0.37 mg/kg and 0.25 mg/kg, respectively, for 20 days.	0.08 and 0.07 μg Cd/g (ww) for nano and microparticular CdS exposures, respectively.	Described in the present article.	Our study

Table 1. A literature surv	vev of the effects on	live aquatic o	rganism of nano	particles dist	persed in a spil	ked sediment.
			0			

* The article gave no data about the accumulated metal concentration. (mean ± SD) ww: wet weight , dw: dry weight , GST: glutathione-S-transferase, CAT: catalase.

While sediments represent the primary repository, they may also act as endogenous contamination source for aquatic systems. One of the processes that can give rise to direct or indirect metal transfers from the sediments is bioturbation, the term given to the mixing activity produced by species living at the surface or buried in the sediments (Rhoads, 1974; Matisoff et al, 1985; Matisoff and Wang, 1998). Several studies investigated effects of metallic NPs (CuO, Ag, ZnO, CdS, CdSe, ZnS, Al₂O₃ and single walled nanotubes SWNT) on invertebrates and demonstrated the potential impact of these nanomaterials which activate the detoxication system, lead to genotoxic and oxidative responses, and cause harsh impact on organisms' behaviors including burrowing and locomotion (Buffet et al, 2011, 2012a, 2013a,b, 2014a,b; García-Alonso et al, 2011; Cong et al, 2011; Galloway et al, 2010; Li et al. 2012; Jackson et al. 2012; Hanna et al, 2013). A direct internalization of Ag NPs into the gut of the estuarine polychaete *H. divesicolor* was observed after 10 days of exposure in a sediment contaminated at 0.25 mg/kg (García-Alonso et al, 2011). Ag NPs caused genotoxicity effect in *H. divesicolor* exposed to 25 and 50 mg/kg of sediment for 10 days (Cong et al., 2011). A number of ecotoxicity tests have been performed on tubificid worms for metals (e.g., copper, cadmium, zinc, lead, mercury) (Chapman et al, 1982; Fargasova, 1998; Milani et al, 2003; Rathore and Khangarot, 2003) and organic pollutants (Meller et al, 1998; Mosleh et al, 2006, 2005; Raj et al, 2005), most of which involve exposure to contaminated water. It was demonstrated that these worms can bioaccumulate metals from water and/or sediments, with relative high rates in some cases (Bouché et al, 2000, Ciutat et al, 2005). Indeed, tubificidae worms are considered as one of the major agents of bioturbation in freshwater environments (Fisher et al, 1980), developing in addition high population densities in most soft bottom habitats submitted to heavy metal contaminations. They are also used as benthic indicators of freshwater pollution within early warning systems (Warren et al, 1998; Leynen et al, 1999; Chapman, 2001, Mermillod-Blondin et al, 2005). Physiological, ecological and behavioral characteristics of freshwater oligochaetes make them very interesting for studies in toxicology,

especially those relating to the role of the sediment compartment in accumulation of pollutants (Ciutat et al, 2005). In fact, *Tubifex* worms are known to produce a bioadvection activity consisting in the ingestion of sediment particles in the background galleries and their rejection as fecal pellets on the sediment surface after extraction of the assimilable organic matter (Rhoads, 1974).

Nevertheless, sedimentary exposure to nanoparticles remains poorly known (Croteau et al, 2011) and the few studies that were interested in NPs effects on aquatic invertebrates used high contamination pressures which did not represent realistic environmental concentrations (Table 1). Indeed, very high concentrations of metal NPs have been used to spike the sediment up to 100.10^3 mg/kg of Al₂O₃ NPs. Only one study used reasonable amounts of silver NPs spiked in the sediment at a dose of 0.25 mg Ag NPs /kg. The authors investigated the cellular internalization of Ag NPs in gut epithelia of the estuarine polychaete H. diversicolor but reported no data about toxic outcomes (García-Alonso et al, 2011). We therefore decided to select such a low exposure dose in the case of T. tubifex exposed to CdS NPs. Until now, only few studies used T. tubifex to investigate NPs toxicity (Stanley et al, 2010; Verma et al, 2011). Acute toxicity tests were performed on T. tubifex using metal oxide NPs dispersed in the water column for 96h. Median lethal dose values (LC₅₀) were 100, 32, 320 and 250 mg/L for PbO NPs, CuO NPs, FeO NPs and ZnO NPs, respectively (Verma et al, 2011). T. tubifex were exposed to a spiked sediment containing aluminum oxide NPs for 10 days, at levels up to 100.10^3 mg/kg of Al₂O₃ NPs but no effect on worm survival was observed (Stanley et al, 2010). Therefore, the purpose of our study was to investigate the toxic effects at low dose of CdS nanoparticles mixed into sediment on tubificidae worms addressing bioaccumulation levels, the metallothionein analysis and DNA damage as well as impact on bioturbation activity. For comparative purposes, and to provide a positive control, worms were also exposed simultaneously to sediment containing microparticulate CdS and CdCl₂.

Experuimental Section

Elaboration of nano and microparticles

The CdS nanoparticles (CdS NPs) were manufactured by the Institute of Condensed Matter Chemistry of Bordeaux (ICMCB, Bordeaux, France). The CdS NPs were prepared via a colloidal approach in aqueous solution. $CdSO_4$ (5.10⁻⁴ mol/L; 99.99%) and sodium polyphosphate (Na₃PO₄, 80 mesh) were purchased from Aldrich and used as received. Prior experiments, all glassware was washed thoroughly with *aqua regia* and rinsed with deionized water. A solution of sodium polyphosphate 300 µM was prepared and introduced in a three-necked flask. The pH was adjusted to 9.5 with NaOH. The solution was degassed by bubbling with gaseous argon for 3 h at 80°C. The solution was then bubbled with mixed H₂S/Ar (g) for 30 min at 80°C with stirring, at which point it was left under Ar (without heating) for about 3 h to eliminate any excess of H₂S. This procedure resulted in a yellow solution consisting of CdS NPs of 8 nm of diameter. Microionic cadmium (CdS MPs) form has been obtained by following the same protocol used for nanoparticle (8 nm) except the pH which was adjusted to 3 to promote aggregation. The microparticles were formed from aggregated nanoparticles and resulted in a yellow solution consisting of CdS MPs of 1 to 10 microns of diameter. Cadmium level in nanoparticle and micronic suspensions were 50 ± 12 and 33.7 ± 8 mg Cd/L, respectively. Structural and size characterization of the nanoparticles was investigated by using conventional and high-resolution transmission electron microscopy (TEM & HRTEM). Preliminary TEM and HRTEM observations were performed using a JEOL 2200 FS equipped with a field emission gun, operating at 200 kV. High resolution transmission electron microscopy micrographs were acquired with a Gatan Ultrascan CCD 2k x 2k. Moreover, in order to be representative and statistically meaningful, many images from several regions of various samples were recorded. The zeta potential of CdSNPs in suspension was determined using dynamic light scattering and phase analysis light scattering, respectively (Zetasizer equipment 3000HS, Malvern

Instruments, Worcestershire, UK) and reached -22 ± 3 mV in a suspension of pH 7.4.

Experimental design and sediment sampling

The experiment used a cylindrical polyvinyl chloride units (24 cm of height and 5.7 cm of diameter), containing a bottom layer of 10 cm width of sediment and filled with 250 mL of tap water. Average water parameters throughout the experiment were as follows: temperature of 20.1 ± 0.36 °C; conductivity of $1486 \pm$ 61μ s/cm and pH of 7.7 ± 0.1 (mean ± SD). The experimental units were permanently aerated by air bubbling in the superficial layer of the water column in order to produce an oxygen-saturated environment and exposed to a 12h:12h light:dark regime. The complete experimental design was based on 22 experimental units (EUs). The experimental conditions were as follows: 3 EUs contained control sediment, 4 EUs contained control sediment and worms, 3 EUs contained CdS NPs-spiked sediment, 4 EUs contained CdS NPs-spiked sediment and worms, 4 EUs contained CdS microparticles-spiked sediment and worms, 4 EUs contained ionic Cd-spiked sediment and worms. Time zero for the experiment was set just after adding worms in experimental units. The experiment lasted 20 days with seven sampling times for water analysis: 0, 3, 7, 10, 13, 17 and 20 days. The sediment used has been collected in the Garonne river 8 km upstream from Bordeaux at the site called Cadaujac (44° 45' 23" N, 0° 31' 44" W, France). It has been homogenized, sieved at 2.5 mm in diameter and stored at 4°C in the dark for 72 h. Five samples were collected in order to determine the "fresh weight/dry weight" ratio (fw/dw = 1.35 ± 0.07 ; mean \pm SD after 72h of desiccation at 60°C), and the background cadmium concentration using electrothermic atomic absorption spectrophotometry $(0.32 \pm 0.01 \text{ mg/kg of dry weight (dw)})$. The sediment was contaminated by adding suspensions or solutions followed by a 15 minute mechanical homogenization with a mixer (Peugeot, PC20543, Paris, France), then stored at 4°C during 72 hours. For nanoparticular CdS, 10 ml of suspension containing 37.4 mg/L of cadmium were added per kg of sediment to

yield a nominal concentration of 0.37 mg CdS/kg (fw) corresponding to 0.5 mg CdS/kg (dw). The nominal total Cd concentration in the sediment spiked with CdS NPs was 0.82 mg Cd/kg (dw), composed of 0.32 mg/kg of environmental Cd and 0.5 mg/kg of CdS NPs. For microparticular CdS (CdS MPs), 7.4 ml of suspension containing 33.7 mg/L of cadmium were added per kg of sediment to yield a nominal concentration of 0.25 mg CdS/kg of sediment (fw) corresponding to 0.33 mg CdS/kg (dw). The nominal total Cd concentration in the sediment spiked with CdS MPs was 0.65 mg Cd/kg (dw), composed of 0.32 mg/kg of environmental Cd and 0.33 mg/kg of CdS MPs. For CdCl₂, 38 µl of solution containing 10 g/L of $CdCl_2$ to yield a nominal concentration of 0.38 mg Cd/kg of sediment (fw) corresponding to 0.51 mg Cd/kg (dw). The nominal total Cd concentration in the sediment spiked with CdCl₂ was 0.83 mg Cd/kg (dw), composed of 0.32 mg/kg of environmental Cd and 0.51 mg/kg of CdCl₂. Four hundred twenty g of control or contaminated sediment (fw) were introduced into each experimental unit. Dechlorinated tap water (250 mL) was then carefully added in order to avoid disturbances at the sediment surface. The bioturbation activity of worms within the sediment compartment was analyzed using conservative fluorescent particulate tracers (Gérino et al, 1994). These tracers consisted of luminophores which are natural sand particles coated with fluorescent paint. In each experimental unit, a mixture of 0.7 g of luminophores and 21 g of Garonne sediment, in 3-mm thick frozen mud cake, was deposited at the sediment surface, 24 hours after the introduction of the worms.

Animals sampling

Tubificid worms (*T. tubifex*) were purchased from a commercial company (GREBIL, Arry, France) and were acclimatized for 7 days in laboratory at 20°C in large tank with the same Garonne river sediment. Batches of 700 mg (fw) of worms were randomly placed in experimental units, each batch corresponding to 142 worms making about 60 000 worms.m⁻², which was close to densities found in natural environment (McCall and Fisher, 1980). Additional batches were prepared

in order to determine the background Cd concentration in organisms (Cd: $0.019 \pm 0.001 \ \mu g.g^{-1} \text{ fw}$). No food was added during the 20 days of the experiment to avoid any non-monitored changes in Cd complexation by the food particles. Animals were placed in the experimental units at least 24 hours after the introduction of the sediment and water to allow a relative physico-chemical stabilization of the water column and sediment.

Turbidity measurements

Turbidity in the water column was measured at the seven sampling times in each experimental unit. Ten mL of water were collected from the central part of the experimental units. Water samples were then processed for measurement with a turbidimeter (Turb 430 IR/T; WTW Company, Weilheim, Germany). Results were expressed in Formazine Turbidity Units (FTU).

Sampling of water, sediment and animals

Cadmium determination was made on water samples at the seven sampling times. Twenty milliliters of water were collected from each experimental unit. Ten mL were directly acidified for cadmium determination on unfiltered samples. The other 10 mL were filtered at 0.2 μ m (Cellulose acetate membrane) and then acidified for Cd quantification in the filtered fraction. After the 20 days of exposure, the water column in each experimental unit was delicately removed with a syringe and the sediment was cut vertically into two parts. The first part of the core was sieved; worms were collected and stored at -80°C for accumulation, metallothionein and genotoxicity assessment. The second part of the sediment core was used for the measurements of the vertical distributions of cadmium (in the interstitial and particulate fractions) and luminophores in the sediment. It was cut into ten layers: 0 - 0.5, 0.5 - 1, 1 - 1.5, 1.5 - 2, 2 - 3, 3 - 4, 4 - 5, 5 - 6, 6 - 8, 8 - 10 cm of depth. Each layer was weighed (fw), centrifuged (centrifuge Sigma 3K12, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) for 20 minutes at 5,000 rpm (20°C). The supernatant was collected and filtered over a 0.2 μ m filter (membrane SFCA,

Nalgen Nunc International Corporation, New York, USA) acidified with nitric acid and stored at 4°C until determination of dissolved Cd in interstitial fraction.

The pellet was then lyophilized (Heto PowerDry LL3000, Thermo scientific, Waltham, MA, USA) and weighed again (dw) in order to determine the fw/dw ratio. Approximately 50 mg of lyophilized sediment of each layer were acidified in 3 mL of nitric acid before cadmium quantification for the vertical distribution of cadmium in sediment.

Vertical distribution of luminophores in sediment

luminophores counting, each lyophilized sediment For layer was mechanically mixed and weighed. Then, 1 or 2 g of sediment from each layer powder were weighed and spread in a Petri dish. A photography of each Petri dish was then taken under UV light using a Nikon D100 camera (Tokoyo, Japan). Photos were then processed with ObviousAviExplore V2.3 (Jean-Claude Duchêne, CNRS Arcachon) to count the number of luminophores in each Petri dish. The luminophores concentration expressed in luminophores per g of dry sediment was multiplied by the known weight of each layer powder to give the total luminophores count for each layer. Luminophores distribution in each layer has then been expressed as percentage relative to the total luminophores count. The luminophores-based methodology has been introduced to measure the sediment reworking. Its main advantage is that they allow a direct quantification of sediment reworking over short temporal scales after the input of a tracer pulse at the sediment surface (Gérino et al, 1998; Maire et al, 2008). Biturbation assessment was based on the measurement of the vertical distribution of luminophores within the sediment column. The underlying principle is that tracers initially deposited at the sediment-water interface, are displaced due to the action of benthic fauna. Sediment reworking coefficients have then been computed using mathematical models that are fitted to the vertical tracer profile (Boudreau 1986 a, b, Wheatcroft et al, 1990; François et al, 1997; 2001, Meysman et al, 2007). Particle tracers are supposed to behave in the same way as sediment particles (Maire et al, 2008). The bioadvection coefficients (V) in cm.yr^{-1} represents the velocity of vertical movement of tracers downward into the sediment, and indicates the spreading of the tracers around the maximal concentration (Gerino et al, 1994). The biodiffusion coefficient (D_b) in cm².yr⁻¹ represents the omnidirectional dispersion of tracers. D_b and V encompassed the diffusive and advective component of this reworking, respectively, and were typically deduced from the transient solution for an idealized pulse initial condition (Guinasso & Schink, 1975). This solution becomes:

$$C(x,t) = \frac{1}{\sqrt{\pi D_b t}} exp\left(\frac{-(x-Vt)^2}{4D_b}\right) - \frac{V}{2D_b} exp\left(\frac{Vx}{D_b}\right) \left(\frac{x+Vt}{\sqrt{4D_b t}}\right) erfc$$

In this case, C(x,t) represents the normalized tracer concentration relative to the initial input introduced at the sediment–water interface. erfc is the complementary error function.

Cadmium quantification

Cadmium quantifications in water, sediment and worms samples were carried out by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (M6 Solaar AA spectrometer, Thermoptec, Mulgrave, Australia). Tissues and sediment were digested in 3 mL of nitric acid (65% HNO₃-Merck, Darmstadt, Germany) at 100°C for 3 h. The resulting liquid underwent five-fold dilution with ultrapure water (MiliQ Bedford, MA, USA). Water samples were acidified with 200 µl of nitric acid. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by analyzing standard biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas and Dolt-4: dogfish liver from National Research Council of Canada, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (Tort-2 in $\mu g/g$: Cd = 26.7 ± 0.6; Dolt-4 in $\mu g/g$: Cd = 24.3 ± 0.8).

Metallothionein quantification

Metallothionein quantification was done according to a previously published protocol (Linde et al, 2006) which consists in homogenizing worms' tissues (45) mg of fresh weight) in 135 µL of 0.5 M sucrose, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6) and 0.01% β -mercaptoetahnol. The homogenates were then centrifuged at 30,000 g for 20 minutes (Eppendorf Centrifuge, 5417R, Hambourg, Germany). Cold absolute ethanol (1.05 mL per 1 mL of supernatant) and chloroform (80 µL per 1 mL of supernatant) were added to the resulting supernatant and samples were centrifuged at 6000 g for 10 min. Three volumes of cold ethanol were added to the resulting supernatants and stored at -20°C for 1h. Metallothionein purification was done by centrifuging samples at 6000 g for 10 min and washing the resulting pellets with ethanol: chloroform:homogenization buffer (87:1:12). The resulting samples were dried under nitrogen gas stream to complete evaporation, dissolved in 300 µL of 5 mM Tris-HCl (pH 8.6), 1 mM EDTA (pH 7). Then, 4.2 mL of a 0.43 mM 5,5'-dithiobis (nitrobenzoic acid) in 0.2 M phosphate buffer, pH 8, were added and the reactions were left to proceed for 30 min at room temperature. The evaluation of the reduced sulfhydryls was done by reading the absorbance at 412 nm in a spectrophotometer (UV- 1601- Shimadzu, Kyoto, Japan). A standard curve with glutathione (GSH) is required as a standard reference for a correct quantification of MT in the samples. GSH contains one cysteine per molecule; thus, it is a standard for quantifying cysteines in protein analyses.

Quantification of genotoxic damages by RAPD-PCR and analysis of the melting temperature curves of the PCR products

Genotoxic effects of cadmium forms were assessed using a random amplified polymorphic DNA based methodology. This method has been successfully used on zebrafish exposed to cadmium, and gold or cadmium sulfide NPs (Cambier et al, 2010; Orieux et al, 2011; Geffroy et al, 2012; Ladhar et al, 2014; Dedeh et al, 2014). Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen worm's tissues with a scalpel and using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Primers used for RAPD-PCRs were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') and OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'). Reference probes were targeting the 28S ribosomal RNA genes (GQ_3554465): forward 5'AGAGCGTACACGTTGG-3' and reverse 5'-CCAGCTATCCTGAGGG-3' obtained from Sigma-Proligo (St. Louis, MO, USA). Real time RAPD-PCRs were done with the Lightcycler apparatus (Roche, Basel, Switzerland) as described (Lerebours et al, 2013). For each worm, using OPB7, OPA9 and ribosomal 28S probes, the difference $\Delta = Ct$ (28S) - Ct (OPB7 or OPA9) reflects the difference of hybridization efficiencies between the RAPD and the 28S probes. It can be calculated from $2^{\Delta+1}$, which corresponds to the number of hybridization sites of OPB7 or OPA9 probe relative to the number of copies of 28S rRNA genes. Melting temperature curves analysis was done using the LightCycler Software 3.5 (Roche) as described by Lerebours et al, 2013.

Statistical analysis

Significant differences in number of hybridizing sites, Cd accumulation, luminophores concentrations at different depths in sediment, metallothionein levels and values of V and D_b when compared to control were determined with the U-test of Mann-Whitney or a T-test depending on the data normality using the statistical software Sigma Stat 3.5 (San Jose, CA, USA). Differences in frequency of occurrence of PCR products in a defined temperature interval after fusion were revealed by a frequency test using the software Sigma Stat 3.5.





Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) images of 8 nm sulfide cadmium nanoparticles (a, b). c. A general view of TEM micrographs of sulfide cadmium microparticles. d. An enlarged view of the 1 micron CdS microparticles.

Results

Micro and nanoparticles characterization and sediment contamination

Transmission electron microscopy (TEM) micrographs of the CdS NPs and CdS MPs are shown in Figure 1. The average size of CdS NPs was 8 ± 1 nm with a spherical shape. The microparticles have a rod-like shape with a size distribution in between 1 and 10 micrometers. The total cadmium concentration was measured in the different types of hand-made prepared sediments. Since the Garonne sediment contained at the time of sampling 0.25 ± 0.04 mg/kg (dw) of total cadmium, the sediments spiked with micro and nanoparticular forms of cadmium are comprising a blend of cadmium forms. Therefore, the sediment spiked with nanoparticular cadmium contained 0.84 ± 0.02 mg total Cd/kg dry weight (dw) (0.52 mg/kg of nanoparticular Cd and 0.32 mg/kg of ionic Cd). The sediment spiked with microparticular Cd and 0.32 mg/kg of ionic Cd). The sediment spiked with ionic cadmium contained 0.86 mg total Cd/kg dry weight (dw).

Cadmium release in the interstitial sediment pore water and in the water column

The turbidity in the water column was measured at the seven sampling times (Figure S1) and reached high levels in all EUs at the beginning of the exposure, which was due to the experiment setup. After 7 days, the turbidity was stabilized and reached very low values not exceeding 1.25 ± 0.21 FTU in EUs without worms. In EUs containing worms, animals' activity caused an increase of the mean turbidity, which reached 20, 18, 18 and 40 FTU in uncontaminated, CdS NPs-spiked, CdS MPs-spiked and CdCl₂-spiked sediments, respectively. The concentrations of Cd in unfiltered and filtered water have been quantified (Figure S2 and Table S1). The mean cadmium concentration in unfiltered water samples reached 0.044 \pm 0.012, 0.04 \pm 0.02 and 0.20 \pm 0.04 µg/L for CdS NPs, MPs and CdCl₂, respectively (mean \pm SD) in presence of worms.

Table 2. Cadmium	concentration detected	$(\mu g/g)$ fresh weight	, bioaccumulation	factor and
metallothionein lev	vel (μ mole/g) in worms ^a	after 20 days of co	ontamination (fw).	

conditions	control	CdS NPs	CdS MPs	CdCl ₂
Cd concentration	0.029 ± 0.006	$0.08 \pm 0.01 *^{a}$ (0.051) ^b	$0.07 \pm 0.008 *$ (0.041) ^c	$0.76 \pm 0.3 *^{12}$
Bioaccumulation	0.11	0.10	0.11	0.88
factor		$(0.13)^{\rm u}$	(0.16)°	
Equivalent thiol of metallothionein	3.47 ± 0.67	2.53 ± 0.08	2.35 ± 0.21	0.81 ± 0.27 *
0				

^a Metal concentration are means \pm SEM (n = 4). Bioaccumulation factors represent the ratio of accumulated Cd in worms/Cd concentration in the sediment. ^{b and c} Contributions to the accumulated cadmium of the nanoparticular and microparticular cadmium present in the spiked sediment, respectively. ^{d and e} Contribution to the bioaccumulation factor of the nanoparticular and microparticular cadmium present in the spiked sediment.

* Statistically significant value as compared to the control. ^{\square} Statistically significant value as compared to ionic Cd condition as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05

The mean Cd concentration in filtered water samples reached 0.026 ± 0.006 , 0.02 ± 0.01 and $0.10 \pm 0.03 \ \mu\text{g/L}$ for CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂, respectively (mean \pm SD) in presence of worms. From these values were calculated the fractions of Cd in filtered water over Cd in unfiltered water samples which were 59, 45 and 49% for CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂, respectively (Table S1). The fraction of released Cd in the filtered water column from the Cd in the sediment containing worms were very low and equal to 1/20,000, 1/15,000 and 1/8866 for CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂ exposures, respectively (Table S1).

The vertical Cd distribution in the dissolved pore-water (< 0.2 μ m) is shown in Figure S3 and has been calculated from the quantification of Cd concentrations in the interstitial pore water for different layers of sediment (Table S2). The release of Cd in the interstitial fraction from the sediment presented substantial levels in EUs spiked with CdS NPs due to worms' activity and reached values up to 3.0 ± 2.7 ng Cd/g of sediment (mean ± SD) at 2 cm of depth, representing 0.6 % of the Cd concentration present within the sediment. Whereas in EUs spiked with CdS MPs and ionic Cd, the release of Cd was lower and reached 0.22 ± 0.26 and 0.12 ± 0.12 ng Cd/g of sediment, respectively, representing 0.04 and 0.014 % of the Cd concentration in the sediment, respectively.

Cadmium bioaccumulation by tubificid worms

In control worms, cadmium reached $0.029 \pm 0.006 \ \mu g \ Cd/g$ (fw) caused by the contamination of the Garonne sediment. Cadmium concentration featured in worms' body 2.6-, 2.3- and 25-fold increases after exposure to CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂, respectively (Table 2). Despite the close level of cadmium in sediment spiked with CdS NPs and CdCl₂, a higher Cd concentration was observed in CdCl₂ condition reaching 9 times that in CdS NPs exposure.

Metallothionein level

Metallothionein (Mts) was expressed in equivalent thiol of metallothionein (Table 2). Exposure to micro and nanoparticular CdS resulted in a 30% decrease

of Mts level, yet statistically insignificant. In agreement with its higher bioavailability, ionic Cd triggered a significant 4-fold decrease of Mts level. Since the method used is giving the amount of free thiols contained in Mts, this result means that Mts free thiols are oxidized by reactive oxygen species generated by cadmium (Krezel and Maret, 2007).

Genotoxic impact of CdS NPs

After 20 days of exposure, the OPA9 probe showed differences in DNA composition between contaminated and control worms. Indeed, the number of probe hybridization sites displayed significant 24-, 5- and 10- fold decreases after exposure to CdS NPs, MPs and ionic Cd, respectively (Table 3). The OPB7 probe also could unravel significant 5- and 11-fold decreases in the number of hybridization sites due to CdS MPs and ionic Cd compared to control. The frequency of PCR products generation was also modified after exposure to different forms of Cd (Tables S3 and S4). PCR products of T*m* belonging to the temperature interval 82-83°C showed a significant increase in frequency of generation (from 0.2 for control up to 0.6 for CdS NPs, CdS NPs and ionic Cd contaminated worms as assessed by the OPA9 probe). The same held true for PCR products of T*m* belonging to the interval 84-85°C, (from 0.2 for control up to 0.8 for CdS NPs contaminated worms as assessed by the OPB7 probe).

Vertical distribution of cadmium and luminophores in the sediment

The vertical distribution of cadmium in sediment is presented in Figure S4. A significant decrease of Cd concentration at the surface of the sediment down to 2 cm of depth was observed in EUs spiked with CdS NPs in absence of worms compared to EUs containing the same spiked sediment sheltering worms. Indeed, in the 0-0.5 cm layers Cd concentration dropped down to $0.30 \pm 0.07 \ \mu g/g$ whereas it reached $0.87 \pm 0.07 \ \mu g/g$ in sediments spiked with CdS NPs without and with worms, repectively. This indicated that worms' activity maintained a homogeneous concentration of total Cd all along the depth transect.

Table 3. Number of relative hybridization sites per genome unit of RAPD probes, after RAPD-PCR performed on individual genomic DNA from control and contaminated worms.

r · · ·	0			
Primers	control	CdS NPs	CdS MPs	CdCl ₂
OPB7	$(6.6 \pm 1.3) . 10^{-3}$	$(6.0 \pm 2.7) . 10^{-3}$	$(1.3 \pm 0.3) . 10^{-3} *$	$(0.6 \pm 0.1) .10^{-3} *$
OPA9	$(82 \pm 21) . 10^{-5}$	$(3.3 \pm 0.9).10^{-5}$ *	$(17 \pm 5) .10^{-5 a} *$	$(7.7 \pm 1.7) .10^{-5} *$

Results are mean \pm SEM (n = 10). The relative number of hybridization sites of a RAPD probe is defined as the ratio of the total hybridization sites of the RAPD probe over 28S ribosomal gene copies number. * Statistically significant values as compared to control as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05

^a Statistically significant values as compared to NPs exposed worms, as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.

Vertical distribution of luminophores in the sediment after 20 days is illustrated in Figure 2. Each vertical profile corresponds to one EU, containing three or four replicates per experimental condition. In control EUs without tubificid worms, the maximal concentration of luminophores remained confined to the upper sediment layers. About 41% of the total luminophores content was located in the 0-0.5 cm sediment layer samples, and 30% of the total luminophores content was in the 0.5-1 cm sediment layer. In EUs with tubificid worms, the vertical distribution of luminophores in the sediment was different according to the type of sediment contamination. In control sediment the presence of worms caused the shift of luminophores to downward depths since the highest luminophores concentration was in the 4-5 cm sediment layer, reaching 43% of the total luminophores content. Spiking the sediment with CdS NPs impacted worms' activity since the highest luminophores concentration was found upward, in the 2-4 cm sediment layers, reaching 73% of the total luminophores content. The contamination of sediment with CdS MPs impacted worms' activity but the resulting pattern displayed an important variability, in such a way that the highest luminophores concentration was into the 1-5 cm layers, reaching 62% of the total luminophores content. An impact of the ionic Cd was also evident, since the vertical profile of luminophores in EUs spiked with ionic Cd was different from the control EUs and presented an even distribution of luminophores all along the depth transect.

Values of the bioturbation coefficients obtained by modelling the luminophores vertical profiles are shown in figure 2. After 20 days, the bioadvection coefficient, V, reached 0 cm. yr⁻¹ and the biodiffusive coefficient, D_b, was $4 \pm 0.6 \text{ cm}^2 \text{.yr}^{-1}$ (mean \pm SEM) in control exposure without worms. That very low particle dispersion in the sediment layers was probably due to cutting protocol of the sediment core which mixed the tracer in the first sediment layer. Tubificids worms, which are conveyor belt deposit feeders, generated a strong bioadvection of luminophores, and a potent biodiffusion activity. Indeed, in control EUs containing worms, the values of V and D_b were $78 \pm 4 \text{ cm.yr}^{-1}$ and $17 \pm 9 \text{ cm}^2 \text{.yr}^{-1}$,

respectively. In contaminated EUs with worms, the bioadvection coefficients V were respectively 55 ± 5 , 59 ± 11 and 22 ± 17 cm.yr⁻¹ for CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂ exposures, respectively, and the biodiffusive coefficients D_b were 3.0 ± 0.6 , 3.0 ± 0.7 and 181 ± 63 cm².yr⁻¹ for CdS NPs, CdS MPs and CdCl₂ exposures, respectively. These values indicated a clear impact of CdS NPs and CdCl₂ exposures since the bioadvection coefficient displayed a significant 30% and 72% decrease compared to control EUs, respectively. The biodiffusive coefficient did not change significantly between exposed and control EUs, and only a trend to higher values was recorded in the case of CdCl₂ exposure.

Discussion

In this study, genotoxic and bioturbation results highlighted the potential effect and the reactivity of engineered materials (nanoparticles) on tubificidae worms despite their low bioccumulation in worms. In fact CdS NPs and MPs exposures displayed lower bioaccumulation levels compared to ionic form showing that ionic Cd is more bioavailable to tubificid worms, those results being consistent with previous studies suggesting that metals could be incorporated by diffusion through the epidermis of the caudal part that remains freely exposed to the overlying water, and from sediment particle ingestion (Bouché et al, 2000; Ciutat et al, 2005; Redeker et al, 2004; Redeker and Blust, 2004; Lagauzère et al, 2009; Méndez-Fernández et al, 2013). In the present study, bioaccumulation factor of CdS NPs exposure in T. tubifex reached 0.1 which represent a low accumulation potential. This is in the range of what has been observed in other worm species. Indeed, in *Hyalella azteca* exposed to a sediment spiked with 10.10^3 and 100.10^3 mg Al₂O₃ NPs/kg, bioaccumulation factors recorded 0.07 and 0.03, respectively (Stanley et al, 2010). In marine polychate H. diversicolor exposed to a sediment spiked with 25 and 50 mg Ag NPs/kg, bioaccumulation factors recorded 0.20 and 0.16, respectively (Cong et al, 2011). However, in the same organism, bioaccumulation factor reached 2.2 after exposure to a sediment spiked with 3 mg ZnO NPs (Buffet et al, 2012).



Figure 2. Bioturbation activity of worms under exposure to CdS NPs. Vertical profiles of particulate fluorescent tracers in the sediment, bioadvective (V) and biodiffusive rates (D_b) estimated by fitting the luminophores profiles after 20 days for experimental treatments (CdS NPs: EUs containing CdS nanoparticles spiked sediment, CdS MPs: EUs containing CdS microparticles spiked sediment, CdCl₂: EUs containing CdCl₂ spiked sediment, n = 3 or 4, mean ± SEM).

In another study, silver was bioavailable in nanoparticular, microparticular and ionic forms and was accumulated in *H. diversicolor* at the same level when worms were exposed to Ag-spiked sediment. After 10 days of exposure to 50 μ g/g (dw), bioaccumulation levels in worms reached 8.5 ± 6.6 , 7.0 ± 5.8 and $10 \pm 5 \,\mu g/g$ (dw) for nanoparticular, microparticular and ionic Ag, respectively (Cong et al, 2011). The fractions of Cd released in the water column or in the sediment interstitial water from the CdS NPs-spiked sediment were so low, 5.10⁻⁵ and 6.10⁻³, respectively, that most probably, the main route for contamination was represented by the feeding activity instead of waterborne presentation. In the present work, using quantitative RAPD, we looked at the creation or elimination of probe hybridization sites on genomic DNA of contaminated worms compared to control, along with modifications of PCR products' Tm profiles, which are effective parameters in detecting small changes in DNA sequences (Cambier et al, 2010). Results of RAPD-PCR emphasized the genotoxicity of the cadmium sulfide nanoand microparticles. Indeed, it showed modifications of the number of OPB7 and OPA9 hybridization sites on worm's genomic DNA despite the low level of Cd assessed in worms compared with the ionic condition. In polychaete worms, sediments spiked with NPs have been described to trigger genotoxic effects in H. diversicolor exposed for 10 days to 25 and 50 mg/kg (dw) of Ag NPs (Cong et al, 2011), and in A. marina exposed for 10 days to 2000 and 3000 mg/kg of TiO₂ NPs (Galloway et al, 2010). Waterborne exposures to NPs also triggered genotoxicity in mussels *Elliption complanata* exposed for 24 h to 1.6, 4 and 8 mg/L of CdTe NPs (Gagné et al, 2008a), in mussels Mytilus galloprovincialis exposed for 25 days to 0.01 mg/L of CuO and Ag NPs (Gomes et al, 2013), and in freshwater snail Lymnaea luteola exposed for 24 and 96 h to 32 mg/L ZnO NPs (Daoud et al, 2012). Genomic DNA alterations can be caused directly by NPs binding or indirectly from oxidative stress caused by NPs (Donaldson et al, 2010; Singh et al, 2009). Production of reactive oxygen species following NPs contamination has been demonstrated for human breast adenocarcinoma cells (Lovrić et al, 2005), human neuroblastoma cells (Choi et al, 2007), and in the gills of mussels (Gagné

et al, 2008a) exposed to Cd NPs. In the present study, results from luminophores distribution and bioadvection-biodiffusion model showed marked differences between contaminated and control units in presence of worms. Tracer distribution in control units showed a burial of the surface luminophores down to 6 cm of depth giving evidence of a biological effect on the particulate fraction of the sediment. The bioturbation activity of *Tubifex* worms is dominated by bioadvection process. These results are consistent with those published by (McCall and Fisher, 1980) and (Ciutat et al, 2005), indicating that tubificids, a conveyor worm leads, by its mode of nutrition, to sediment remobilization. Luminophores, which are coarse enough in size not to be ingested by tubificids migrate vertically in the sediment as far as the ingestion zone, where they remain in the absence of pure physical accumulation (Juget, 1978; Rodriguez et al, 2001). In the present study, in sediment spiked with CdS NPs, tracer distribution showed a burial of the surface luminophores down to 4 cm of depth (instead of 6 cm in control EUs), and a decrease of the bioturbation coefficient giving evidence of a slowing down of conveying activity of worms caused by NPs exposure. It has been demonstrated that nanomaterials can affect invertebrate burrowing and locomotion behaviors, and this matter of fact was observed in the bivalve Scrobicularia plana exposed to CuO NPs (Buffet et al, 2011) or to gold NPs (Pan et al, 2012), in H. diversicolor exposed to ZnO NPS (Buffet et al, 2012b), in A. marina exposed to TiO₂ NPs (Galloway et al, 2010), and in Caenorhabditis elegans exposed to Al₂O₃ NPs (Li et al, 2012). The CdS NPs treatment in the present study showed low accumulation level but caused a decreased bioturbation activity compared to the ionic treatment. This indicates that there were different toxic mechanisms and that CdS NPs effects could be related to the nanoparticular form and not to the dissolution and release of Cd^{2+} . Through this experimental study, we can conclude that it is obvious that manufactured particles may be harmful to aquatic organisms. The study showed that CdS NPs exposure through the sediment led to various effects in tubificidae worms including DNA alterations and slow-down of worms' movements despite the low exposure dose and the weak bioaccumulation factor.

References

- Bouché ML, Habets F, Biagianti-Risbourg S, Vernet G. 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. Ecotox Environ Saf 46:246-251.
- Boudreau BP. 1986a. Mathematics of tracer mixing in sediments. I. Spatially-dependent, diffusive mixing. Am J Sci 286:161–198.
- Boudreau BP. 1986b. Mathematics of tracer mixing in sediments. II. Non-local mixing and biological conveyor-belt phenomena. Am J Sci 286:199–238.
- Buffet PE, Amiard-Triquet C, Dybowska A, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. Ecotox Environ Saf 84: 191-198.
- Buffet PE, Pan JF, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, 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 89:117-24.
- Buffet PE, Poirier L, Zalouk-Vergnoux A, Lopes C, Amiard JC, Gaudin P, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Perrein-Ettajani H, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2014b. 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.
- Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, 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 47:1220–8.
- Buffet PE, Tankoua OF, Pan JF, Berhanu D, Herrenknecht C, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Bérard JB, Risso C, Guibbolini M, Roméo M, Reip P, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere 84: 166-174.
- Buffet PE, 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. 2014a. 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 471:1151–1159.
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotox Environ Saf 73:312-319
- Chapman PM, Farrel MA, Brinkhurst RO. 1982. Relative tolerance of selected oligochaetes to industrial polluants and environmental factors. Aquatic Toxicol 2: 47-67.
- Chapman PM. 2001. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. Hum Exp Toxicol 20: 499- 505.
- Choi AO, Cho SJ, Desbarats J, Lovric J, Maysinger D. 2007. Quantum dot induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. J Nanobiotechnology 5:1.
- Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A. 2005. Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. Environ Toxicol Chem 24:1048-58.
- Ciutat A, Boudou A. 2003. Bioturbation Effects on Cadmium and Zinc Transfers from a Contaminated Sediment and on Metal Bioavailability to Benthic Bivalves. Environ Toxicol Chem 22:1574-1581.
- Ciutat A, Gerino M, Boudou A. 2007. Remobilization and bioavailability of cadmium from historically contaminated sediments: Influence of bioturbation by tubificids. Ecotoxicol Environ Saf 68:108-117.
- Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE .2011. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. Aquat Toxicol 105: 403-411.

- Croteau MN, Misra SK, Luoma SN, 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: 6600-7.
- Daoud A, Saud A, Sudhir K, Maqusood A, Maqsood AS. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. Aquat Toxicol 124: 83 90.
- Dedeh A, Ciutat A, Treguer-Delapierre M, Bourdineaud JP. 2014. Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment. Nanotoxicology (in press).
- De Jonge M, Eyckmans M, Blust R, Bervoets L. 2011. Are accumulated sulfide-bound metals metabolically available in the benthic oligochaete *Tubifex tubifex* ?. Environ Sci Tech 45: 3131-3137.
- Donaldson K, Poland CA, Schins RPF. 2010. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. Nanotoxicology 4:414-420.
- Fargasova A. 1998. Comparative acute toxicity of Cu²⁺, Cu⁺, Mn²⁺, Mo⁶⁺, Ni²⁺ and V⁵⁺ to *Chironomus plumosus* larvae and *Tubifex tubifex* worms. Biologia 53: 315–319.
- Fisher JB, Lick WJ, McCall PL, Robbins JA. 1980. Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. J Geophys Res 85: 3997-4006.
- François F, Poggiale JC, Durbec JP, Stora G .1997. A new approach for the modelling of sediment reworking induced by a macrobenthic community. Acta Biotheor 45: 295–319.
- François F, Poggiale JC, Durbec JP, Stora G .2001. A new model of bioturbation for a functional approach to sediment reworking resulting from macrobenthic communities. Organism– sediment interactions (eds JY Aller, SA Woodin and RC Aller). University of South Carolina Press, Columbia, pp 73–86.
- Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C. 2008a. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. Aquat Toxicol 86:333–340.
- Gagné F, Fortier M, Yu L, Osachoff HL, Skirrow RC, van Aggelen G, Gagnon C, Fournier M. 2010. Immunocompetence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots. J Environ Monit 12:1556-65.
- Gagné F, Maysinger D, André C, Blaise C. 2008b. Cytotoxicity of aged cadmium-telluride quantum dots to rainbow trout hepatocytes. Nanotoxicology 2:113–120.
- Galloway T, Lewis C, Dolciotti I, Johnston BD, Moger J, Regoli F. 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. Environ pollut 158: 1748-1755.
- García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E.2011. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. Environ Sci Tech 45: 4630-4636.
- Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6:144-60.
- Gérino M, Aller RC, Lee C, Cochran JK, Aller JY, Green MA, Hirschberg D .1998. Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-Thorium, luminophores and chlorophyll *a*. Estuar Coast Shelf Sci 46:531–547.
- Gérino M, Stora G, Durbec JP. 1994. Quantitative estimation of biodiffusive and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. Oceanol Acta 17:547-554.
- Gillis PL, Diener LC, Reynoldson TB, Dixon DG. 2002 .Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): correlation with reproduction and growth. Environ Toxicol Chem 21:1836-44.
- Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A, Bebianno MJ. 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Mar Environ Res 84:51-59.
- Hamer DH. 1986. Metallothionein. Ann Rev Biochem 55: 913-951.
- Hanna SK, Miller RJ, Zhou D, Keller AA, Lenihan HS. 2013. Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine amphipod. Aquat Toxicol 142- 143: 441-6.
- Hardman R. 2006. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environ Health Perspect 114: 165–172.

- Hinther A, Vawda S, Skirrow RC, Veldhoen N, Collins P, Cullen JT, Aggelen GV, Helbing CC. 2010. Nanometals induce stress and alter thyroid hormone action in amphibia at or below North American water quality guidelines. Environ Sci Technol 44: 8314–8321.
- Jackson BP, Bugge D, Ranville JF, Chen CY. 2011. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Envron Sci Technol 46(10):5550-6.
- Juget J. 1978. The particle size of the sediment texture and diet oligochaetes limnicoles. Hydrobiologia 65: 145-154.
- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ Toxicol Chem 27: 1825-1851.
- Koeneman BA, Zhang Y, Hristovski K, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG. 2009. Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots. Toxicol In Vitro 23: 955-62.
- Krezel A, Maret W. 2007. Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. Biochem J 402:551-558.
- Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Durand E, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2014. Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure. Nanotoxicology: 8: 676-85.
- Lagauzère S, Boyer P, Stora G, Bonzom JM.2009. Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of *Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) and *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Tubificidae). Chemosphere 76: 324-34.
- Lerebours A, Cambier S, Hislop L, Adam-Guillermin C, Bourdineaud JP. 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. Mutat Res 755:55-60.
- Leynen M, Van den Berckt T, Aerts JM, Castelein B, Berckmans D, Ollevier F. 1999. The use of Tubificidae in a biological early warning system. Environ Pollut 105: 151-154.
- Li Y, Yu S, Wu Q, Tang M, Pu Y, Wang D. 2012. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. J Hazard Mater 219: 221-230.
- Lim YT, Kim S, Nakayama A, Stott NE, Bawendi MG, Frangioni JV. 2003. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. Mol Imaging 2:50-64.
- Linde AR, Garcia-Vazquez E. 2006. A simple assay to quantify metallothionein helps to learn about bioindicators and environmental health. Biochem Mol Biol educ 34: 360-363.
- Lovrić J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. 2005. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. Chem Biol 12:1227–1234.
- Maire O, Lecroart P, Meysman FJR, Rosenberg R, Duchêne JC and Grémare A. 2008; Quantification of sediment reworking rates in bioturbation research: a review. Aquat Biology 2: 219–238.
- Matisoff G, Fisher JB, Matis S. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. Hydrobiologia 122: 19-33.
- Matisoff G, Wang X. 1998. Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. Limnol Oceanogr 43: 1487-1499.
- McCall PL and Fisher JB. 1980. Effects of tubificid oligochetes on physical and chemical proprieties of Lake Erie sediments. Aquatic oligichates biology (eds RO Brinkhurst and DG Cook). Plenum Press, New York pp 253-317.
- Meller M, Egeler P, Römbke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B. 1998. Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid sludgeworms (oligochaeta) in artificial media. Ecotoxicol Environ Safe 39:10–20.
- Méndez-Fernández L, Martínez-Madrid M, Rodriguez P. 2013. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. Ecotoxicology 22: 1445-60.

- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, Comte G, Grossi V, Fourel F, Lecuyer C, Simon L. 2013. Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. Sci Total Environ 450-451:230-41.
- Mermillod-Blondin F, Nogaro G, Datry T, Malard F, Gibert J. 2005. Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments?. Environ Polut 134:57–69.
- Meysman FJR, Malyuga VS, Boudreau BP, Middelburg JJ. 2007. The influence of porosity gradients on mixing coefficients in sediments. Geochim Cosmochim Acta 71: 961–973.
- Milani D, Reynoldson TB, Borgmann U, Kolasa J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. Environ Toxicol Chem. 22: 845–854.
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Biagianti-Risbourg S. 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. Chemosphere 64:121–128.
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Couderchet M, Biagianti-Risbourg S, Vernet G. 2005. Effects of the herbicide isoproturon on metallothioneins, growth, and antioxidative defenses in the aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). Ecotoxicology 14: 559–571.
- Officier CB, Lynch DR. 1982. Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. Earth Planet Sc Lett 61:55-62.
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP .2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotox Environ Saf 74:974-983.
- Pan JF, Buffet PE, Poirier L, Amiard-Triquet C, Gilliland D, Joubert Y, Pilet P, Guibbolini M, Risso de Faverney C, Roméo M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: the tellinid clam *Scrobicularia plana*. Environ Pollut 168:37-43.
- Raj A, Chandra R, Patel DK. 2005. Physico-chemical characterisation of pulp and paper mill effluent and toxicity assessment by a tubificid worm, *Tubifex tubifex*. Toxicol Int 12:109–118.
- Rathore RS, Khangarot BS, 2003. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* (Müller). Water Air Soil Pollut 142: 341–356.
- Redeker ES, Bervoets L, Blust, R. 2004. Dynamic model for the accumulation of cadmium and zinc from water and sediment by the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. Environ Sci Technol 38:6193–6200.
- Redeker ES, Blust R. 2004. Accumulation and toxicity of cadmium in the aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*: a kinetic modeling approach. Environ Sci Technol 38: 537–543.
- Rhoads DC. 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. Oceanogr Mar Biol Ann Rev 12: 263-300.
- Rodriguez P, Martinez-Madrid M, Arrate JA, Navarro E. 2001. Selective feeding by the oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). Hydrobiologia 463:133-140.
- Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TG, Wright CJ, Doak SH. 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30:3891-3914.
- Stanley JK, Coleman JG, Weiss CA Jr, Steevens JA. 2010. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. Environ Toxicol Chem 29: 422-9
- Warren LA, Tessier A, Hare L. 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. Limnol Oceanogr 43: 1442-1454.
- Wheatcroft RA, Jumars PA, Smith CR, Nowell ARM .1990. A mechanistic view of the particulate biodiffusion coefficient: step lengths, rest periods and transport directions. J Mar Res 48:177–207.
- Wiesner R and Bottero JY. (Eds.), 2007. Environmental nanotechnology applications and impacts of nanomaterials, 540 p.

Supplementary material :

Supplementary table S1. Cadmium concentration (μ g/L) in unfiltered and filtered water column (mean \pm SD) in the different experimental conditions over experimental time and percentage of the bioavailable fraction

Condition	Cd in unfiltered	Cd in filtered water	Fraction of bioavailable Cd
	water		over total Cd in water
			column (%)
Control witout worms	0.018 ± 0.007	0.016 ± 0.010	89
Control with worms	0.025 ± 0.014	0.016 ± 0.009	64
CdS NPs without worms	0.057 ± 0.047	0.019 ± 0.007	33
CdS NPs with worms	0.044 ± 0.012	0.026 ± 0.006	59
CdS MPs with worms	0.040 ± 0.020	0.018 ± 0.011	45
CdCl ₂ with worms	0.198 ± 0.040	0.097 ± 0.031	49

Supplementary table S2. Cadmium concentration (μ g/L) in sedimentary interstitial water after 20 days of exposure.

depth	control without	Control with	CdS NPs	CdS NPs	CdS MPs	CdCl ₂ with
(cm)	worms	worms	without worms	with worms	with worms	worms
0.5	0.63 ± 0.06	0.03 ± 0.01	0.30 ± 0.12	3.8 ± 1.7	0.5 ± 0.4	0.18 ± 0.08
1	0.30 ± 0.08	0.35 ± 0.35	0.39 ± 0.22	1.2 ± 0.8	0.46 ± 0.55	0.18 ± 0.09
1.5	0.01 ± 0.006	0.07 ± 0.02	0.15 ± 0.05	1.00 ± 0.03	0.45 ± 0.50	0.27 ± 0.08
2	0.22 ± 0.17	0.11 ± 0.09	0.42 ± 0.24	4.5 ± 3.5	0.36 ± 0.32	0.29 ± 0.09
3	0.01 ± 0.005	0.015 ± 0.006	0.38 ± 0.43	0.48 ± 0.47	0.11 ± 0.01	0.28 ± 0.09
4	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.31 ± 0.36	0.23 ± 0.09	0.07 ± 0.04	0.21 ± 0.11
5	0.015 ± 0.002	0.04 ± 0.02	0.055 ± 0.003	0.45 ± 0.35	0.10 ± 0.02	0.28 ± 0.11
6	0.022 ± 0.004	0.10 ± 0.07	0.0805 ± 0.0005	0.41 ± 0.11	0.20 ± 0.02	0.35 ± 0.17
8	0.016 ± 0.004	0.16 ± 0.09	0.39 ± 0.30	0.18 ± 0.13	0.37 ± 0.25	0.66 ± 0.30
10	0.015 ± 0.004	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.10	0.07 ± 0.01	0.39 ± 0.30	0.62 ± 0.20

Results are mean \pm SEM (n = 3 or 4)

OPA9						
temperature (°C)	control	CdS NPs	CdS MPs	CdCl ₂		
I1 [69-70[0	0.1	0	0		
I2 [70-71[0	0	0.1	0		
I4 [72-73[0	0	0.3	0		
I5 [73 - 74[0	0	0	0		
I6 [74-75[0	0	0	0		
I7 [75 - 76[0.1	0	0	0		
I8 [76-77[0	0	0	0		
I9 [77 - 78[0.2	0	0.1	0.1		
I10[78-79[0	0.1	0	0		
I11[79-80[0	0	0.1	0		
I12[80-81[0.1	0.1	0	0,1		
I13[81-82[0.2	0.2	0.1	0		
I14[82-83[0.2	0.6*	0.6*	0.6*		
I15[83-84[0.2	0	0.1	0.1		
I16[84-85[0.6	0.3	0.4	0.5		
I17[85-86[0.3	0.3	0.3	0.2		
I18[86-87[0	0	0	0		
I19[87-88[0.2	0	0.3	0.1		
I20[88-89[0.2	0.1	0	0.1		
I21[89-90[0,2	0	0	0		
I21[90-91[0	0	0.1	0.1		

Supplementary table S3. Frequency according to the temperature intervals (C°) to which their Tm belong of the PCR products obtained with OPA9 on 11 individual genomic DNAs from worms ^a

* represents the temperature ranges for which the frequency of occurrences of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls (n = 10) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.

			OPB7			
-	Temperature (°C)	control	CdS NPs	CdS MPs	CdCl ₂	
	I1 [72-73[0	0.1	0	0	
	I2 [73-74[0	0	0	0	
	I3 [74-75[0	0	0	0	
	I4 [75-76[0	0.2	0	0	
	I5 [76-77[0.8	0.7	0.8	0.6	
	I6 [77-78[0.1	0	0	0	
	I7 [78-79[0.2	0	0	0	
	I8 [79-80[0.1	0	0.1	0.1	
	I9 [80-81[0.1	0	0	0	
	I10 [81-82[0.7	0.7	0.8	0.7	
	I11 [82-83[0	0.2	0.1	0.2	
	I12 [83-84[0.3	0	0.5^{a}	0.3	
	I13 [84-85[0.2	0.8*	0.2	0.2	
	I14 [85-86[0.2	0.1	0	0.1	
	I15 [86-87[0.3	0.1	0	0	
	I16 [87-88[0.1	0.1	0	0	

Supplementary table S4. Frequency according to the temperature $intervals(C^{\circ})$ to which their Tm belong of the PCR products obtained with OPB7 on 11 individual genomic DNAs from worms ^a

* represents the temperature ranges for which the frequency of occurrents of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls.

^a represents the temperature ranges for which the frequency of occurrents of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from Cd Nano condition. (n = 10) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05



Supplementary figure S1. Evolution of the turbidity in the water column over experimental time. The experimental conditions were as follows: control without worms, control with worms; CdS NPs without worms: CdS NPs with worms; CdS MPs with worms and Ionic Cd (CdCl₂) with worms. (Mean \pm SE; n = 3, 4).



Supplementary figure S2. Cadmium concentration in unfiltered (a.) and filtered (b.) water column over experimental time. The experimental conditions were as follows: control without worms, control with worms; CdS NPs without worms: CdS NPs with worms; CdS MPs with worms and CdCl₂ with worms. (Mean \pm SE; n = 3, 4).* Statistically significant value as compared to the control as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.



Supplementary figure S3. Vertical cadmium distribution in the interstitial fraction of the sediment after 20 days. The experimental conditions were as follows: control without worms, control with worms; CdS NPs without worms: CdS NPs with worms; CdS MPs with worms and CdCl₂ with worms. (Mean \pm SD; n = 3, 4).



Supplementary figure S4. Vertical profiles of cadmium measured in the particulate fraction of the sediment after 20 days. The experimental conditions were as follows: control without worms, control with worms; CdS NPs without worms: CdS NPs with worms; CdS MPs with worms and CdCl₂ with worms. (Mean \pm SE; n = 3, 4).

B. IMPACT SUR DES POISSONS ZÉBRES D'UN SÉDIMENT DOPÉ AUX NANOPARTICULES D'OR

Effets d'un sédiment dopé aux nanoparticules d'or le poisson zèbre

L'augmentation de l'utilisation de nanomatériaux métalliques est susceptible d'entraîner la contamination des milieux aquatiques par ces particules, il est difficile de savoir si ces matériaux présentent un risque pour les organismes aquatiques. L'impact des sédiments contenant des nanoparticules d'or de 14 nm de diamètre (Au NPs) a été étudiée chez le poisson zèbre exposés pendant 20 jours à deux concentrations, 16 et 55 $\mu g/g$ (poids sec). Les nanoparticules d'or ont été libérées dans la colonne d'eau à partir du sédiment, et durant la période d'exposition, les concentrations moyennes d'Au NPs dans la fraction filtrée de la colonne d'eau étaient de 0.25 ± 0.05 et $0.8 \pm 0.1 \ \mu g/L$, respectivement. Une expérience similaire avec du sédiment contenant de l'or ionique a été effectuée simultanément afin d'obtenir un témoin positif. L'exposition aux AuNPs a déclenché différents effets chez le poisson, y compris des modifications de la composition du génome, révélée par la méthode RAPD-PCR. L'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, la détoxification et réparation de l'ADN a également été modulée, en réponse à la contamination aux AuNPs. L'or nanoparticulaire altère la neurotransmission, puisque l'activité acétylcholine-estérasique du cerveau a augmenté pour les deux doses testées AuNPs mais pas pour l'or ionique. L'accumulation d'or dans les tissus des poissons a démontré la faible biodisponibilité des AuNPs par rapport à l'or ionique, et souligne le potentiel effet toxique élevé de la forme nanoparticulaire.
Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment

Amina Dedeh¹, Aurélie Ciutat¹, Mona Treguer-Delapierre² & Jean -Paul Bourdineaud¹

¹ University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

² University of Bordeaux ,CNRS, UPR 9048, Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, 87, Avenue du Docteur Schweitzer, 33600 Pessac , France

Amina Dedeh: a.dedeh@epoc.u-bordeaux1.fr

Tel. : +33 556 223 930; fax: +33 556 549 383

Aurélie Ciutat : a.ciutat@epoc.u-bordeaux1.fr

Mona Treguer-Delapierre: treguer@icmcb-bordeaux.cnrs.fr

Corresponding author:

Jean -Paul Bourdineaud: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

Phone: (+33) 5 56 22 39 30; Fax: (+33) 5 56 83 51 04

Les résultats de cette étude ont été acceptés pour publication dans le journal Nanotoxicology (Janvier 2014)

informa

healthcare

http://informahealthcare.com/nan ISSN: 1743-5390 (print), 1743-5404 (electronic)

Nanotoxicology, Early Online: 1–10 © 2014 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/17435390.2014.889238

Nanotoxicology

ORIGINAL ARTICLE

Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment

Amina Dedeh¹, Aurélie Ciutat¹, Mona Treguer-Delapierre², and Jean-Paul Bourdineaud¹

¹CNRS, UMR EPOC 5805, University of Bordeaux, Arcachon, France and ²Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, University of Bordeaux, CNRS, UPR 9048, Pessac, France

Abstract

Increasing use of metallic nanomaterials is likely to result in release of these particles into aquatic environments; nevertheless it is unclear whether these materials present a hazard to aquatic organisms. The impact of contaminated sediment containing 14-nm gold nanoparticles (AuNPs) was investigated in the zebrafish *Danio rerio* exposed for 20 days to two concentrations, 16 and 55 μ g/g dry weight. AuNPs were released from the sediment to the water column, and during this period the mean concentrations of AuNP in the filtered water fraction were 0.25 ± 0.05 and $0.8 \pm 0.1 \,\mu$ g/L, respectively. A similar experiment with ionic gold contamination was simultaneously performed to obtain a positive control. AuNP exposure triggered various effects in fish tissues including modifications of genome composition, shown using a random amplified polymorphic DNA-PCR genotoxicity test. Expression of genes involved in oxidative stress, mitochondrial metabolism, detoxification and DNA repair were also modulated in response to AuNP contamination. Gold altered neurotransmission, since brain acetylcholine esterase activity increased for both tested doses of AuNP but not for ionic gold. Gold accumulation in fish tissues demonstrated the lower bioavailability of AuNP compared to ionic Au, and underlined the higher toxic potential of the nanoparticle form.

Introduction

Nanotechnology is a highly promising and exciting interdisciplinary molecular technology that spans many areas of science and technological application because of the surface properties and very small size of nanoparticles (Moore, 2006). Technology has created an impressive increase in the production of nanomaterial (NM) in many sectors of the society (Klaine et al., 2008). These industrial products and wastes tend to end up in waterways (e.g. drainage ditches, rivers, lakes, estuaries and coastal waters) (Daughton, 2004; Moore, 2006). Consequently, as nanotechnology industries start to come on line with larger scale production, it is inevitable that more and more nanoscale products will enter the aquatic environment (Daughton, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Moore & Noble, 2004; Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004). The global market for gold nanoparticles (AuNPs) in biomedical, pharmaceutical and cosmetic applications was worth \$204.6 million in 2006 (www.industryweek.com).

AuNPs are already in use for numerous applications, ranging from biosensors to catalysts, in electronics, new paints, cosmetics and cancer treatments, etc. Their unique properties, chemical stability, their capacity to exhibit a multiplicity of shapes, particle sizes and surface chemistry will ensure that they will be key nanoscale components in many technologies (Daniel & Astruc, 2003; Cobley et al., 2011; Gonzalez et al., 2011;

Keywords

Bioaccumulation, gene expression, genotoxicity, gold nanoparticles, neurotransmission, zebrafish

History

Received 8 November 2013 Revised 20 December 2013 Accepted 22 January 2014 Published online 20 February 2014

Henry et al., 2011). In fact, AuNPs exhibit unique optical and electrical properties which are of great interest for drug delivery, cellular imaging diagnostics and therapeutic agents (Giljohann et al., 2010; Murphy et al., 2008). Generally, AuNPs are stabilized with organic compounds allowing them to cross cell membranes readily and to escape phagocytic clearance by the reticulo-endothelial system. They are also functionalized with anionic compounds to produce an electrostatic repulsion which avoids conglomerate formation and keeps the desired properties. As with any pharmaceutical or other health technology, it is imperative to understand the full scope of AuNP biocompatibility and to ensure that hazard potential is minimized (Giljohann et al., 2010; Murphy et al., 2008; Kim et al., 2013).

Nanoparticles fate and behavior are dominated by aggregation to particles (>1 μ m) sufficiently large so that their transport is dominated by sedimentation (Gustafsson & Gschwemd, 1997; Buffle & Leppard, 1995). The aggregation is defined as the direct attraction between particles. Sedimentation process is important in the self-purification of water bodies and results in pollutant loss from surface waters and accumulation in the sediments and is analog to the likely behavior of manufactured NPs, with aggregation and subsequent sedimentation, an important process in their ultimate fate (Klaine et al., 2008). The estimated amount of nanoparticles released into the aquatic environment is around 65 tons per year (Blaser et al., 2008). A significant portion of NPs in waste waters is expected to partition to sewage sludge (Kiser et al., 2009).

Zebrafish (*Danio rerio*) has been recommended as an inexpensive, quick and easy model to assess the NM toxicity (Fako & Furgeson, 2009). This fish is a small cyprinid with many advantages for toxicological research (Bourdineaud et al., 2013), such as transparency of the embryo, a completely sequenced

RIGHTSLINK

Correspondence: Jean-Paul Bourdineaud, CNRS, UMR EPOC 5805, University of Bordeaux, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France. Tel: +33 556223930. Fax: +33 556835104. E-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

2 A. Dedeh et al.

genome, numerous eggs and no major rearing difficulties. Moreover, zebrafish possess a high degree of homology to the human genome. Effects of AuNPs and other nanoparticles on zebrafish were investigated demonstrating that *D. rerio* is a good animal model for assessing NM impacts from different exposure routes, at various life stages and concentration pressures (Table 1). Most studies investigating AuNP impacts on zebrafish used waterborne exposure and did not represent realistic environmental concentrations. In fact, contamination values tested reached levels up to 250 mg/L in the water column, and the majority of AuNPs used were functionalized with organic compounds (Asharani et al., 2008, 2010; Bar-Ilan et al., 2009; Kim et al., 2013; Harper et al., 2011; Truong et al., 2012a,b, 2013). Dietary exposure of zebrafish to AuNPs demonstrated a toxic impact at much lower concentrations (Geffroy et al., 2012).

The sediment constitutes a very important storage reservoir, it can have a very strong complexing capacity and contaminants come mainly from the deposit of particles in suspension in the water column (Ciutat & Boudou, 2003). Indeed, terrestrial ecosystems are expected to be an ultimate sink for a large portion of NPs (Gottschalk et al., 2009). It has been observed that marine and earthworms can accumulate NPs from contaminated sediments; support that sediment presents a source of NM contamination (Unrine et al., 2010; García-Alonso et al., 2011). In mesocosms modeling an estuarine food web, it was shown that a single AuNP dose could be transferred from the water column to the sediment (Ferry et al., 2009) (the fraction of AuNP in sediment reached 24.5%). However, the reverse situation has never been assessed, that in which metal NPs could be made bioavailable to the water column from the sediment. It is thus of great interest to determine if intact NPs can be taken up from the sediment by organisms.

Therefore, the purpose of this study was to assess bioavailability and toxic effects of AuNPs (14 nm) from spiked sediment (16 and 55 μ g/g dry weight) on zebrafish exposed for 20 days. Contaminations concentrations did not reflect the natural levels

Table 1. A literature survey of metal nanoparticles doses recently used in zebrafish.

	Exposure route and metal nanoparticles	S			
Life stage	characteristics	Contamination pressures	Reference		
Zebrafish embryos	Waterborne	5, 10, 25, 50 and 100 mg/L	Asharani et al. (2008)		
	Ag NPs (5–20 nm)				
	Capping with BSA				
Zebrafish embryos	Waterborne	10, 25, 50, 75 and 100 mg/L	Asharani et al. (2010)		
	Au NPs (15–35 nm)				
	Ag NPs (5-35 nm)				
	Pt NPs $(3-10 \text{ nm})$				
	Capping with PVA				
Zebrafish embryos	Waterborne	0.08, 0.4, 2, 10 and 50 mg/L	Kim et al. (2013)		
	Au NPs (1.5 nm)	0.000, 0.1., <u>2</u> , 10 and 00 mg/2			
	Surface functionalization with TMAT				
Zebrafish embryos	Waterborne	0.016, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 and 250 mg/L	Harper at al. (2011)		
Zeoransii emoryes	Au NPs $(0.8, 1.5 \text{ and } 15 \text{ nm})$	0.010, 0.00, 01, 2, 10, 00 and 200 mg/2	maper a an (2011)		
	Surface functionalization with TMAT MES				
	MEE and MEEE				
Zebrafish embryos	Waterborne	50 mg/L	Truong et al. (2012a)		
Zeorarish emoryos	Au NPs (1.5 nm)	50 mg/L	fruong et al. (2012a)		
	Surface functionalization with TMAT MES				
	and MEFE				
Zebrafish embryos	Waterborne	0.08 0.4 2 10 and $50 \mathrm{mg/I}$	Truong et al. (2012b)		
Zeorarish emoryos	Au NPs (1.2 nm)	0.00, 0.4, 2, 10 and 50 mg/L	11uolig et al. (20120)		
	Surface functionalization with MPA				
Zebrafish embryos	Waterborne	0.016.0.08.0.4.2.10.50 and 250 mg/I	Truong et al. (2013)		
Zeorarish emoryos	Au NPs (1.5 nm)	0.010, 0.06, 0.4, 2, 10, 50 and 250 mg/L	11uong et al. (2015)		
	Surface functionalization with TMAT MES				
	and MEEF				
Zebrafish embryos	Waterborne	50 5 0 5 and 0 05 mg/I	Bar-Ilan et al. (2009)		
Zeorarish emoryos	Au NPs $(3.10, 50 \text{ and } 100 \text{ nm})$	50, 5, 0.5 and 0.05 mg/E	Dar-Han et al. (2007)		
	Surface functionalization with TPPMS				
Adult zebrafish	Waterborne	0.25 and 1.5 mg/I	Griffitt et al. (2007)		
Adult Zeoransii	Cu NPs (80 nm)	0.25 and 1.5 mg/L	Gillitte et al. (2007)		
Adult zebrofish	Waterborne	30 and 120 mg/I	Choi at al. (2010)		
Adult Zeoransii	$A_{\rm gNPs}$ (5, 20 nm)	50 and 120 mg/L	Choi et al. (2010)		
Adult zebrafish	Waterborne	0.5 and 5 mg/l	Johnston et al. (2010)		
Adult Zeoransii	$TiO_{1}(34 \text{ nm})$ $ZnO_{1}(68 \text{ nm})$ and $CoO_{1}(34 \text{ nm})$	0.5 and 5 mg/L	Johnston et al. (2010)		
	$(10 \text{ nm}) \text{ NP}_2$				
A dult zabrafish	(10 IIII) NPS	0.04 and 0.1 us/day/s fish hady weight	Coffron et al. (2012)		
Adult Zebrahsh	$\Delta u NPs (12, 50 \text{ nm})$	0.04 and 0.1 µg/day/g fish body weight	Gennoy et al. (2012)		
	Copping with citrate				
A dult zahrafish	Distory	0.04 and 0.1 us/day/s hady weight	Lodbor at al. (2012)		
Adult zeoralish	CdS NPs (8, 50 pm)	0.04 and 0.1 µg/day/g body weight	Ladiar et al. (2013)		
Adult zebrofish	Cus NFS (6–50 IIII) Sedimentary	16 and 55 ug/g dried sediment weight:	This study		
Adult Zeoransii	Sedmentary	0.25 and 0.8 ug/L relayed in water	This study		
		column			
	AuNPs (14 pm)	column			
	Copping with citrate				
	Capping with citrate				

Abbreviations: PVA, polyvinyl alcohol; TMAT, *N*,*N*,*N*-trimethylammoniumethanethiol; MES, 2-mercaptoethanesulfonic acid; MEEE, 2,2-mercaptoethoxyethaxyethanol; TPPMS, monosulfonated triphenylphosphane; MPA, mercaptopropionic acid.

Nanotoxicology, Early Online: 1-10

DOI: 10.3109/17435390.2014.889238

Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment 3

and were selected in reference to a previous study which investigated the effects on earthworms of a sediment spiked with AuNPs and that used 5, 20 and 50 mgAuNPs/kg dry weight (Unrine et al., 2010). The originality of this work lies in the fact that for the first time an NP-spiked sediment was used as a contamination source for a vertebrate model living in the overlying water column. Only few authors have used aquatic sediment as an NP contamination source and always with invertebrate animal models such as annelids (García-Alonso et al., 2011). The bioaccumulation of gold transferred from sediment to water column, neurotransmission perturbation, gene expression assessment in various tissues and DNA damage in whole body of zebrafish were investigated using microcosms made up of a mixed biotope consisting of water column and contaminated sediment. For comparative purposes, and to provide a control for ionic form, zebrafish were also exposed simultaneously to a sediment containing the same levels of gold salt (KAuCl₄).

Materials and methods

Preparation of AuNPs

AuNPs were prepared according to the refined Turkevich method, which is based on the reduction of gold ions in aqueous solution with trisodium citrate (Kimling et al., 2006). Potassium gold(IIII)chloride (100.13 mg, KAuCl₄, 99.9%, Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in 100 mL ultrapure water and added under vigorous stirring to 400 mL boiling distilled water. When boiling resumed, 50 mL of 0.88% sodium citrate (441 mg) was added under vigorous stirring and this suspension was boiled for an additional 20 min. The final colloidal suspension contained gold NPs and reached a gold concentration of 90 ± 4 mg of gold/L which represented 2.99×10^6 particles/L. Nanoparticle structural and size characterizations were investigated using conventional and high-resolution transmission electron microscopy (TEM and HRTEM). Preliminary TEM and HRTEM observations were performed with a JEOL 2200 FS equipped with a field emission gun, operating at 200 kV. High resolution transmission electron microscopy micrographs were acquired with a Gatan Ultrascan CCD 2k x 2k. Samples were prepared by drop casting a 2.5-µL aliquot of the NP suspension onto a 300 mesh carbon-coated copper grid, which was allowed to evaporate under ambient conditions. In order to be representative and statistically meaningful, many images from several regions of various samples were recorded and the most characteristic results are presented in Figure 1(a-c). The size distribution was obtained by analysis of TEM images of 200 nanoparticles located at different regions of the grid. A log-normal distribution typical of this synthetic method is observed, with an average diameter of 14 nm and a standard deviation of 2 nm. Nanoparticles had a spherical shape. The zeta potential of AuNPs in suspension was determined using dynamic light scattering and phase analysis light scattering, respectively (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) and reached -50 mV in a suspension of pH 8.

Experimental design and sediment sampling

The experiment used glass aquaria of $12 \text{ cm} \times 12 \text{ cm} \times 24 \text{ cm}$ containing 5–6 cm of sediment and filled with 3 L (16 cm) of fresh water representing a water column height of 16 cm laid above a 6 cm thick layer of sediment. Average water parameters throughout the experiment were as follows: temperature of 21.06 ± 0.46 °C; conductivity of $465 \pm 94 \,\mu$ S/cm and pH of 8.14 ± 0.1 (mean \pm SD). The experimental units were permanently aerated by air bubbling in the superficial layer of the water column in order to produce an oxygen-saturated environment and exposed to a 12:12 h light:dark regime. Five replicates were set up for each condition (=5 independent aquaria per condition). A similar experiment with gold salt (KAuCl₄) was performed simultaneously to obtain a control for ionic form.

Time zero for the experiment was just after adding zebrafish to the experimental units. The experiment lasted 20 days with seven sampling times for water analysis: 0, 3, 7, 10, 13, 17 and 20 days. The complete experimental design was based on 25 experimental units set up simultaneously.

The sediment used had been collected in from the Garonne river upstream from Bordeaux at a site called Cadaujac (44°45'23"N, 0°31'44"W, France), and its main characteristics are reported in Table S1. It was homogenized, sieved at 2.5 mm diameter and stored at 4 °C in the dark for 72 h. Five samples were collected in order to determine the "fresh weight/dry weight" ratio (fw/dw = 1.58 ± 0.08 , mean \pm SD, after 72 h of desiccation at 60 °C) and the background gold concentration in sediment $(0.050 \pm 0.007 \,\mu g/g \, dw)$. The sediment was contaminated by adding one of the forms of gold solution followed by a 15 min mechanical homogenization to with a mixer (Peugeot, Pc20543, Paris, France) then stored at 4 °C for 72 h. We added, respectively, 111 and 555 mL of a suspension containing 90 mg/L AuNP per kg of sediment for C_1 and C_2 conditions. For the ionic gold conditions, we added, respectively, 19 and 95 mL of a solution containing 521 mg/L of KAuCl₄ per kg of sediment for C₁ and C₂ conditions. After sediment contamination, five sediment samples were collected randomly from each contamination condition at different places and depths and checked for Au distribution. The resulting quantifications gave the following values for the experimental conditions: a sediment contaminated with $15.6 \pm 1.72 \,\mu$ g/g dry weight of AuNPs [C₁], and a sediment contaminated with $55.2 \pm 3.74 \,\mu$ g/g dry weight of AuNPs [C₂]. For gold ionic spiking the following values were quantified: a sediment contaminated with $14.8 \pm 2.53 \,\mu\text{g/g}$ dry weight of KAuCl₄ [C₁] and a sediment contaminated with $54.5 \pm 4.33 \,\mu g/g$ dry weight of KAuCl₄ [C₂]. Eight hundred grams of control or contaminated sediment (fresh weight) was introduced into each experimental unit. Dechlorinated tap water (3L) was then carefully added after 48 h, avoiding disturbance at the sediment surface. The experimental units were allowed to settle and equilibrate for 8 days before fish were placed.

Zebrafish culture and sampling

Wild-type adult zebrafish (*D. rerio*) were purchased from a commercial company (Exomarc, Lormont, France), and acclimatized for 7 days at 20 °C in a large tank filled with dechlorinated water (body weight: 0.79 ± 0.03 g, wet wt; standard length: 3.33 ± 0.07 cm, n = 6). ive fish were randomly placed in experimental units and fed 25 mg/fish every 3 days (Dr. Bassleer Biofish Food). Six fish were sampled to determine the background Au concentration. After 20 days of exposure, fish were collected, killed within seconds by immersion in melting ice in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program, dissected and frozen at -80 °C for bioaccumulation, neurotoxicity assessment, genotoxicity and gene expression analyses.

Turbidity measurements

Turbidity in the water column was measured at the seven sampling times in each experimental unit. Ten milliliters of water was collected from the central part of the experimental units. Water samples were then processed for measurement with a turbidimeter (Turb 430 IR/T; WTW Company, Weilheim, Germany). Results were expressed in Formazine Turbidity Units

4 A. Dedeh et al.

Nanotoxicology, Early Online: 1-10



Figure 1. Panels a, b, and c show representative TEM micrographs of 14 nm gold NPs at three different magnifications. Panel d: Distribution of nanoparticle size.

(FTU), which are equivalent to Nephelometric Turbidity Units (NTU) (Ciutat et al., 2005). No significant differences in turbidity were observed for all treatments. Turbidity values were between 400 and 800 FTU during the 20 days of exposure (Figure S1).

Gold quantification

Gold quantifications in water and zebrafish tissues were carried out by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (M6 Solaar AA spectrometer, Thermoptec, Mulgrave, Australia) with a detection limit of 25 ng Au/L. Gills (tissue weight between 10 and 20 mg) were digested in 1 mL of *aqua regia* (0.25volume of 65% HNO₃ – Merck, Darmstadt, Germany – and 0.75 volume of 37% HCl – Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Germany) at 100 °C for 3h. Digestive tract and muscle samples (tissue patches weighing more than 20 mg) were digested in 3 mL of *aqua regia* at 100 °C for 3h. Liquid from digested gill, digestive tract and muscle underwent a 6-fold dilution with ultrapure water (MiliQ, Bedford, MA). Fish brains (weighing less than 10 mg) were digested in 0.2 mL of *aqua regia* at 100 °C for 3 h then diluted 5-fold with ultrapure water. Detection limits were 5 ng/g for brains weighing 5 mg, 8 ng/g for gill samples weighing 15 mg, and 15 ng/g for muscle samples weighing 30 mg.

Gold determination was performed on water samples from the seven sampling times. Twenty milliliters was collected from each experimental unit, 10 mL was directly acidified with *aqua regia* (600 μ L) for gold determination in unfiltered samples; the other 10 mL was filtered at 0.2 μ m (cellulose acetate membrane SFCA) and then acidified with *aqua regia* (600 μ L) for gold quantification in the filtered water fraction. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by analyzing standard solutions of gold (Prolabo, Nantes, France). Values were consistently within the certified ranges.

Acetylcholine esterase activity measurement

Brain and muscle acetylcholine esterase (AchE) activity, a neurotoxicity biomarker, was assessed according to the most common method, first described by Ellman et al. (1961), using microplate spectrometry. This assay makes use of the thiocholinemediated cleavage of the chromogenic disulfide 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid. Before enzymatic assays, total protein **RIGHTSLINK** DOI: 10.3109/17435390.2014.889238

content of brain and muscle was measured according to the method described by Bradford (1976).

Quantification of genotoxic damages by RAPD-PCR and analysis of the melting temperature curves of the PCR products

Genotoxic effects of AuNP and ionic gold were assessed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology. This method was successfully used on zebrafish exposed to cadmium, and gold or cadmium sulfide NPs (Cambier et al., 2010; Geffroy et al., 2012; Ladhar et al., 2013; Orieux et al., 2011). Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen fish tissues o with a scalpel and using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Primers used for RAPD-PCRs were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'). Reference β -actin probes were reverse 5'-AAGTGCGACGTGGACA-3' and forward 5'-GTTT AGGTTGGTCGTTCGTTTG-3' purchased from Sigma-Proligo (St. Louis, MO). Real time RAPD-PCRs were done with the Lightcycler apparatus (Roche, Basel, Switzerland) as described (Lerebours et al., 2013). Melting temperature curves analyses were done using the LightCycler Software 3.5 (Roche) as described (Lerebours et al., 2013).

Gene expression analysis in zebrafish

After 20 days, zebrafish were dissected and sampled tissues (brain, gills, digestive tracts and muscle) kept frozen in RNA-later (QIAGEN) at -80 °C until used. The expression of eight genes was analyzed; five samples were used for each condition. Samples were crushed and total RNA was extracted using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Santa Clara, CA), according to the manufacturer's instructions. In order to eliminate the maximum of lipids and proteins, we added a step of phenol-chloroformisoamylic alcohol (25:24:1) extraction. At the end of this process, 30 µL of total RNA was collected. First-strand cDNA was synthesized from 14 µL of total RNA using the Affinity ScriptMulti Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene). The cDNA mixture was kept at -20 °C until it was used in real-time PCR reactions, which were performed in a thermocycler (Stratagene) following the manufacturer's recommendations. All primer pairs were designed with the Lightcycler probe designer setup (Table S2). Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the β -actin gene expression. The choice of β-actin gene as a reference was relevant because its expression did not vary with contamination. In brain, for example the mean Ct remained constant for the different conditions (control: 21.7 ± 1.5; C₁AuNPs: 21.7 ± 2.4; C₂AuNPs: 23.2 ± 1.72; C₁Au: 23.2 ± 1.72 and C₂Au: 24.1 ± 2.6).

Statistical analysis

Significant differences in number of hybridizing sites and frequency PCR products when compared to control were determined with the *U*-test of Mann–Whitney or a *t*-test depending on data normality. Other significant differences in gold levels, acetylcholinesterase activity and relative gene expressions in fish tissues under different conditions were determined with the ANOVA on ranks using Tukey and Dunn's tests (p < 0.05). The statistical software used for all tests was Sigma stat 3.5 (San Jose, CA).

Results

During the experiment no mortality attributable to gold exposure was observed.

Gold release in the water column

Data for total and dissolved gold in the water column are shown in Figure S2(a) and (b). The mean gold concentration in unfiltered water samples reached 3.0 ± 0.8 and $11\pm2\,\mu\text{g/L}$ for C_1 and C_2 AuNP exposures, respectively, and 4 ± 1 and $33 \pm 6 \,\mu$ g/L for C₁ and C_2 ionic exposures, respectively (means \pm SE). In filtered water samples, in which gold is not associated with sedimentary particles, the filtered fraction of metal in the water column is bioavailable, therefore constituting the real contamination pressure. The mean gold concentration in filtered water samples reached 0.25 ± 0.05 and $0.8 \pm 0.1 \,\mu$ g/L for C₁ and C₂ AuNPs exposures, respectively, and 0.33 ± 0.01 and $0.6 \pm 0.04 \,\mu$ g/L for C_1 and C_2 ionic exposures, respectively (means \pm SE). Thus, gold concentrations were similar for both forms of gold contamination. The fractions of bioavailable AuNPs over total gold in the water column were 8.3% and 7.3% for $C_1 \mbox{ and } C_2$ exposures, respectively. The fractions of bioavailable AuNP over initial total gold in sediment were 6.0×10^{-5} and 5.4×10^{-5} for C₁ and C₂ exposures, respectively.

Gold (Au) accumulation in zebrafish tissues

In control fish, gold was above the detection limit only in the digestive tract. After AuNP exposure, Au remained unquantifiable in brain and muscle. In digestive tract, 11- and 70-fold increases in gold concentration compared to control were observed for C1 and C2 AuNPs exposures, respectively. In gill, bioaccumulation factors (calculated as the ratio of the concentration of gold in tissue over the concentration of filterable gold in the water column) reached 56 and 36 for C_1 and C_2 AuNP exposures, respectively. After exposure to ionic Au, Au remained unquantifiable in brain. In gill, bioaccumulation factors relative to control reached 43 and 210 for C1 and C2 ionic Au exposures, respectively. In muscle, bioaccumulation factors relative to the most bioavailable AuNP in the water column reached 200 and 266 for C_1 and C_2 ionic Au exposures, respectively. Thus, digestive tract accumulated the most of both forms of Au. For the same concentrations of filtered Au fraction in the water column, digestive tract accumulated twice as much ionic Au as AuNPs (Table 2).

AchE activity in brain and muscles

Although AuNP concentrations were below the detection threshold in brain, exposure to AuNP triggered a significant increase in AchE activity, reaching 24% and 25% above control for C_1 and C_2 AuNP exposures, respectively. In contrast, ionic Au exposures did not influence brain AchE activity. In muscle, despite the fact that Au concentration was below the detection threshold, exposure to the lower (but not higher) AuNP concentration resulted in a 48% increase in AchE activity. The higher ionic Au concentration triggered a 64% increase in muscle AchE activity (Table 3).

Genotoxicity analysis

After 20 days of exposure, the OPB7 probe showed differences in DNA composition between contaminated and control fish. Indeed, the number of probe hybridization sites displayed significant 3-, 2.5- and 2-fold increases after exposure to both AuNP concentrations and to C₁ ionic Au, respectively (Table 4). Using the OPB7 probe, the frequency of PCR product appearance from contaminated and control DNAs was different (Table S3). After exposure to both forms and concentrations of Au, PCR products of melting temperature (T_m) [85–86 °C] showed a significant decrease in frequency of appearance (from 0.8 for control down to 0.3 and 0.2 for contaminated fish), whereas a significant increase in frequency (from 0.1 for control up to 0.5 and 0.7 for **RIGHTSLINK**)

6 A. Dedeh et al.

Nanotoxicology, Early Online: 1-10

Table 2. Gold levels detected in zebrafish brain, gills, digestive tract and muscle (µg/g) fresh weight after 20 days of exposure^a.

	Brain	Gills	Digestive tracts	Muscle
Control	<dt< td=""><td><dt< td=""><td>0.020 ± 0.001</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<></td></dt<>	<dt< td=""><td>0.020 ± 0.001</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	0.020 ± 0.001	<dt< td=""></dt<>
Nano Au concentration in wat	ter (in sediment)			
0.25 µg/L (16 mg/kg)	<dt< td=""><td>$0.0140 \pm 0.0008*$</td><td>$0.22 \pm 0.03^*$</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	$0.0140 \pm 0.0008*$	$0.22 \pm 0.03^*$	<dt< td=""></dt<>
0.8 μg/L (55 mg/kg)	<dt< td=""><td>$0.029 \pm 0.001^{*}$</td><td>$1.4 \pm 0.3^*$</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	$0.029 \pm 0.001^{*}$	$1.4 \pm 0.3^*$	<dt< td=""></dt<>
Ionic Au concentration in wat	ter (in sediment)			
$0.33 \mu g/L (16 m g/kg)$	<dt< td=""><td>$0.0120 \pm 0.0008*$</td><td>$0.46 \pm 0.05^{*b}$</td><td>$0.060 \pm 0.006*$</td></dt<>	$0.0120 \pm 0.0008*$	$0.46 \pm 0.05^{*b}$	$0.060 \pm 0.006*$
0.6 μg/L (55 mg/kg)	<dt< td=""><td>$0.21 \pm 0.03^{*b}$</td><td>$3.16 \pm 0.52^{*b}$</td><td>$0.16 \pm 0.04*$</td></dt<>	$0.21 \pm 0.03^{*b}$	$3.16 \pm 0.52^{*b}$	$0.16 \pm 0.04*$

<dt, below the detection threshold.

*Statistically significant values compared to control assessed by the ANOVA on ranks – Tukey and Dunn's test (p < 0.05).

^aMetal concentration are means \pm SEM, n = 3.

^bStatistically significant values compared to AuNPs exposure assessed by Mann–Whitney test (p < 0.05).

Table 3. Acetylcholine esterase activity in brain and muscle extracts from zebrafish exposed to control and contaminated sediment^a.

	Brain	Muscle
Control	440 ± 17	720 ± 74
Nano Au concentration in wat	ter (in sediment)	
0.25 μg/L (16 mg/kg)	$546 \pm 8*$	$1068 \pm 37*$
0.8 µg/L (55 mg/kg)	$551 \pm 22*$	920 ± 70
Ionic Au concentation in wate	er (in sediment)	
0.33 μg/L (16 mg/kg)	421 ± 38	748 ± 109
0.6 µg/L (55 mg/kg)	467 ± 22	$1183 \pm 43*$

*Statistically significant values compared to the control compared assessed by the ANOVA on ranks – Tukey and Dunn's test (p < 0.05).

^aData are presented as mean \pm SEM (n = 3), and represent the specific initial velocity of acetylcholinesterase in nmol of hydrolyzed substrate per mg of protein per minute.

Table 4. Number of hybridization sites per genome unit of RAPD probes, after RAPD-PCR performed on individual genomic DNA from control and contaminated zebrafish.

	OPB7	OPB11
Control	0.52 ± 0.08	$(110 \pm 31.3) \times 10^{-5}$
Nano Au concentration in	water (in sediment)	
0.25 µg/L (16 mg/kg)	$1.5 \pm 0.2^{*}$	$(383 \pm 106) \times 10^{-5}$
$0.8 \mu g/L (55 m g/kg)$	$1.26 \pm 0.16^*$	$(373 \pm 85) \times 10^{-5}$
Ionic Au concentration in	water (in sediment)	
$0.33 \mu g/L (16 m g/kg)$	$1.09 \pm 0.19*$	$(232 \pm 60) \times 10^{-5}$
0.6 µg/L (55 mg/kg)	0.73 ± 0.12	$(103 \pm 18.7) \times 10^{-5}$

Results are mean \pm SEM (n = 10).

*Statistically significant values compared to control as assessed by the Mann–Whitney U-test p < 0.05.

contaminated fish) was observed for PCR products of $T_{\rm m}$ [86–87 °C].

Gene expression variations

Relative gene expression in brain, gill, muscle and digestive tract from exposed fish were compared to those from control fish (Table S4). From these values we determined differential gene expression, calculated as the ratio of relative expression in contaminated fish tissue over that of control (Table 5). Although Au accumulation within brain was below the detection threshold, a possible acclimative genetic response to both gold forms occurred at C_2 exposure. In fact, responsive genes were up-regulated several fold. Those genes were involved in oxidative stress (*sod1* and *sod2*), mitochondrial respiration (*cox1*), metal detoxification (*mt2*), DNA repair (*gaad*) and neurotransmission (*ache*) in brain exposed to both Au forms at C_2 . Significant differences in gene regulation were observed between the two gold forms, some genes being three times more expressed in response to NPs than to ionic forms (cox1, sod2, hsp70, ache). In gill, both concentrations of AuNP triggered the repression of sod2, cox1, rad51 and gaad genes. Contrary to NP exposures, the ionic form triggered the up-regulation of mt2, gaad, and ache genes at higher concentration suggesting a potential defense mechanism. In digestive tract, the two forms of gold resulted in different gene expression patterns. An up-regulation of DNA repair (gaad and rad51) and ache genes was observed for the lower NP exposure whereas gaad and ache genes returned to the basal level and rad51 was 3-times less expressed at higher NP exposure. For the ionic gold exposures, contrary to the NP form, it was the higher exposure that resulted in the up-regulation of mt2, gaad, rad51 and ache genes. In muscle, despite the fact that gold concentration was below the detection threshold, NP exposures triggered the down-regulation of several genes including cox1, sod1, sod2, hsp70, ache and gaad. Only the mt2 gene was upregulated 2-fold for both concentrations of NP. The lower ionic gold exposure, for which the gold accumulation level was quantifiable and equal to 60 pg/g, also caused the down-regulation of cox1, ache, gaad and rad51 but the 20-fold up-regulation of the sod2 gene.

Discussion

Metal and NP release from the sediment

Water turbidity displayed high values (400-800 FTU), which demonstrates the important resuspension of sediment particles due to fish swimming near the sediment water interface. Such a phenomenon had already been observed in the case of fathead minnows, who disturbed the sediment and increased benzo(a)pyrene concentration in the water compartment (McCarthy et al., 2003). This generated an increase of filtered gold in the water compartment; reaching values equal to 0.25 and 0.8 µg Au/L in filtered water for C1 and C2 nanoparticle gold concentrations in sediment. It indicates that for 50 ppm of nanoparticle gold in sediment, less than 1 µg/L of gold is released in the water column. Since the free and filterable water column NPs can be considered as bioavailable for fish, this concentration constitutes a very low contamination pressure compared with other published studies where concentrations reached, in some cases several orders of magnitude above 1 µg/L (Asharani et al., 2008, 2010; Bar-Ilan et al., 2009; Harper et al., 2011; Kim et al., 2013; Truong et al., 2012a,b, 2013).

The lowest observed adverse effect level (LOAEL) that had been described up to now in the literature was 10 mg/L for a *N*,*N*,*N*-trimethylammoniumethanethiol-covered AuNP (1.3 nm) after 114 h of exposure in zebrafish embryos and was related to embryo mortality, and 1 mg/L after 90 h of exposure when eve

RIGHTSLINK

DOI: 10.3109/17435390.2014.889238

Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment 7

Table 5. Differential gene expressions in various tissues from contaminated fish after 20 days of gold exposure.

Organs	Genes	0.25 µg/L nano Au	0.3 µg/L ionic Au	0.8 μg/L nano Au	0.6 µg/L ionic Au
Brain					
Oxidative stress	sod 1	=	2*	4*	3*
	sod 2	=	12*	12* ^b	4*
Mitochondrial metabolism	cox1	=	1/15*	7* ^b	$2^{*^{\mathbf{a}}}$
Detoxification	mt2	=	1/6*	8*	8^{*a}
	hsp70	=	=	11* ^b	3*
DNA repair	gaad	=	1/40*	9*	6^{*a}
*	rad51	=	1/38*	=	=
Neurotransmission	ache	=	4*	11* ^b	4*
Gills					
Oxidative stress	sod 1	=	=	=	=
	sod 2	1/4* ^b	3*	1/3*	=
Mitochondrial metabolism	cox1	1/4* ^b	1/11*	1/5*	1/4*
Detoxification	mt2	=	=	=	7*
	hsp70	=	=	=	=
DNA repair	gaad	3* ^b	1/12*	2* ^b	5* ^a
1	rad51	1/3*	=	1/3*	=
Neurotransmission	ache	1/3*	=	=	3*
Digestive tract					
Oxidative stress	sod 1	=	4*	=	=
	sod 2	=	=	1/3*	1/5*
Mitochondrial metabolism	cox1	=	1/12*	1/11*	1/7*
Detoxification	mt2	=	1/8*	=	$2^{*^{\mathbf{a}}}$
	hsp70	=	=	=	=
DNA repair	gaad	6*	=	=	20*
×.	rad51	6*	=	2* ^{ab}	5*
Neurotransmission	ache	5*	=	=	7*
Muscle					
Oxidative stress	sod 1	=	=	1/3*	nd
	sod 2	=	20*	1/9*	nd
Mitochondrial metabolism	cox1	1/5*	1/3*	1/10*	nd
Detoxification	mt2	2*	=	2*	nd
	hsp70	1/5*	=	$1/16^{*a}$	nd
DNA repair	gaad	=	<1/100*	1/6*	nd
	rad51	1/3* ^b	1/10*	=	nd
Neurotransmission	ache	1/4*	1/3*	1/20* ^a	nd

The differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in fish maintained in the indicated contaminated conditions over that of fish maintained in uncontaminated conditions (mean, n = 5). =, identical to control condition; NE, no expression recorded, the Ct value was above that of the control without DNA; nd, not done.

*Statistically significant differential expression compared with control assessed by the ANOVA on ranks – Tukey and Dunn's test (p < 0.05).

Statistically significant differential expression compared with 0.3 µg/L exposure. ^bStatistically significant differential expression compared with ionic exposure assessed by Mann–Whitney test (p < 0.05).

pigmentation gene expression was considered (Kim et al., 2013). In contrast, in this study a much lower LOAEL for citrate-covered AuNP was revealed, a concentration as low as 0.25 µg/L in the medium for 20 days of treatment. This was observed in adult zebrafish, which that are considered much less sensitive to toxicants than embryos.

AuNP-bioaccumulation

Gold accumulation in fish tissues was highest in the digestive tract, which can be explained by the transfer of gold from gills to liver or by the fact that zebrafish can be contaminated by the dietary route while pecking surface sediment to feed on deposited organic matter like biofilms. These results are in agreement with metal accumulation in zebrafish exposed to a polymetallic gradient (Lot River, France) for 7 days, the highest cadmium concentrations were observed in the digestive tract despite the waterborne exposure (Orieux et al., 2011). Metal values recorded in zebrafish were, respectively, 4.6 ± 1.8 and 1.9 ± 0.5 nmol of Cd/g of tissue in the digestive tract and the gills after 3 days of exposure to 15µg Cd/L. Bioaccumulation of gold NPs has been demonstrated in different animals such as filter feeding mussel Mytilus edulis where high gold levels were detected in the

digestive gland (61 μ g/g) and low levels in the gills (0.5 μ g/g) and mantle (0.02 µg/g) after exposure to 750 µg AuNPs/L for 24 h (Tedesco et al., 2008). When zebrafish were exposed to food containing 4.5 µg/g AuNP (12 nm) for 36 days, higher accumulations were recorded in brain and liver reaching, respectively, 4.6 and $3.0 \,\mu\text{g/g}$ (Geffroy et al., 2012). In zebrafish embryos exposed to 50 mg/L AuNP for 24 h, to 5 mg/L (AuNPs) for 120 h, and to 50 mg/L of 2-mercaptoethanesulfonic acid-covered AuNP (1.5 nm) for 48 h, gold retention reached $0.6 \,\mu\text{g/g}$ (Asharani et al., 2010), 1.6 ng/embryo (Bar-Ilan et al., 2009), and 320 ± 30 ng/embryo (Harper et al., 2011), respectively. From bioaccumulation results, two potential contamination pathways can be deduced; the direct pathway which represent the bioavailable gold in the water column and the dietary pathway which can be the adsorbed gold on sediment particles.

AchE activity modification

AchE activity measured in brain extracts after 20 days of exposure to sediment contaminated with AuNPs increased compared to control. At first glance, this might appear contradictory with numerous data showing that most pollutants inhibit AChE activity in zebrafish, e.g. lead and cadmium (de Lima et al., 2013) and RIGHTSLINK()

8 A. Dedeh et al.

mercury (Richetti et al., 2011). Nevertheless, some publications mention an activation phenomenon. For instance, in zebrafish exposed to different isotopic compositions of uranium, an increase in AchE activity was observed in brain extracts (Barillet et al., 2007). Romani et al. (2003) looked at possible changes in AchE activity in brain and white muscle of the Mediterranean bony fish *Sparus auratus* exposed for 20 days to sublethal copper concentrations (100 or 500 ng/L). Copper exposure led to increased specific activity and improved catalytic efficiency was also observed with Cu²⁺ ions. In particular, increased ionic strength enhanced the hydrolysis of acetylcholine by AChE in the pacific electric ray, *Torpedo californica* (Berman & Leonard, 1990).

Genotoxicity analysis

Recently, experiments on adult and embryonic life stages of zebrafish demonstrated that Cu and Ag NPs could cause acute toxicity to zebrafish (Griffitt et al., 2007; Asharani et al., 2008). In this work, using quantitative RAPD, we looked at the creation or elimination of probe hybridization sites on genomic DNA of contaminated fish compared to control, along with modifications of PCR products' $T_{\rm m}$ profiles, which are effective parameters in detecting small changes in DNA sequences (Cambier et al., 2010). Results of RAPD-PCR emphasized the genotoxicity of AuNPs and showed modifications in the number of OPB7 hybridization sites in fish genomic DNA and in frequency of PCR products. At high NP gold concentration, number of hybridization sites increased compared to control and ionic gold exposure. Studies have shown that AuNP can alter genomic material by binding to DNA and causing conformational changes (Goodman et al., 2006). Citrate-capped Au NP caused DNA damage in human HepG2 cells (Fraga et al., 2013) and in D. rerio (Geffroy et al., 2012). Other metallic NPs triggered genotoxicity in fish DNA such as silver NPs, which induced chromosomal aberrations and aneuploidy in medaka cells (Wise et al., 2010), and titanium NPs in rainbow trout cells (Vevers & Jha, 2008). Genomic alteration effects are due to single mutations of genomic DNA caused directly (NPs binding to DNA) or indirectly (oxidative stress) from NPs (Geffroy et al., 2012) because of ROS production, which can lead to DNA strand breaks, cross-linking and adducts of the bases or sugars (Cabiscol et al., 2000).

Genetic analysis

Various authors investigated gene expression alterations due to nanoparticles in *D. rerio*. In zebrafish embryos silver NPs caused significant alterations in the expression of genes involved in oxidative phosphorylation and protein synthesis after 24 h of exposure (Van Aerle et al., 2013), and AuNPs disrupted the expression patterns of key transcription factors regulating apoptosis, eye development and pigmentation (Kim et al., 2013). In adult zebrafish dietary exposure to AuNP and cadmium sulfide nanoparticles led to modulation in expression of genes involved in DNA repair, detoxification processes, apoptosis, mitochondrial metabolism and oxidative stress (Geffroy et al., 2012; Ladhar et al., 2013).

The gene expression patterns observed in this work show that AuNP exerts an influence on gene response bigger than ionic gold. This is illustrated in brain from fish exposed to $0.8 \,\mu$ g Au/L, where genes involved in oxidative stress scavenging (*sod2*), mitochondrial respiration (*cox1*), general stress response (*hsp70*) and neurotransmission (*ache*) displayed a 3-fold increased expression in response to NPs compared to ionic gold. Increased AChE activity correlates well with the increased

Nanotoxicology, Early Online: 1-10

expression of the *ache* gene in zebrafish brain despite the low concentration of gold detected in this tissue (below the detection threshold). In muscle and brain, the up-regulation of the *mt* gene might correspond to a detoxification response since it was demonstrated that metallothionein can bind various chemical forms of gold (Laib et al., 1985). In gill, ionic and nanoparticle gold induced similar effects on gene expression except for the *gaad* gene involved in DNA repair which was up-regulated when zebrafish were exposed to NPs, in accordance with genotoxicity results and, suggesting the onset of a DNA repair process activated after NP-induced DNA alterations.

Conclusion

This study is the first trial to evaluate effects of AuNPs -contaminated sediment on a vertebrate organism. Moreover concentration pressures were very low when considering the bioavailable gold released in the water column. The study showed that gold NP exposure led to various effects in zebrafish including gene expression level modifications, DNA alterations and AchE activity variation despite the low bioavailability of gold in fish tissues compared with the bulk form. These results highlight the potential harm of nanoparticles to aquatic organisms and also possibly to human health owing to the close homologies of the *D. rerio* genome with the human genome, and the important similarities of fish and mammalian cell metabolism.

Declaration of interest

Authors declare that we are not linked to private companies or organizations, and that we have got no financial or personal relationships with institutions or people that could influence the main results and conclusions of our work.

References

- Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveettil S. 2010. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. Nanotoxicology 5:43–54.
- Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveettil S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology 19:255102.
- Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. Small 16:1897–910.
- Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A. 2007. Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. Environ Tox Chem 26:497–505.
- Berman HA, Leonard K. 1990. Ligand exclusion on acetylcholinesterase. Biochemistry 29:10640–9.
- Blaser SA, Scheringer M, Macleod M, Hungerbuhler K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. Sci Total Environ 390: 396–409.
- Bourdineaud JP, Rossignol R, Brèthes D. 2013. Zebrafish: a model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial bioenergetics. Int J Biochem Cell Biol 45:16–22.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Chem 72:248–54.
- Buffle J, Leppard GG. 1995. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material. Environ Sci Technol 29:2169–75.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol 3:3–8.
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. 2010. Cadmiuminduced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicol Environ Safe 73:312–19.
- Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquat Toxicol 100:151–9.

RIGHTSLINK

DOI: 10.3109/17435390.2014.889238

- Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A. 2005. Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. Environ Toxicol Chem 24:1048–58.
- Ciutat A, Boudou A. 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. Environ Toxicol Chem 22:1574–81.
- Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. 2011. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. Chem Soc Rev 40:44–56.
- Daniel MC, Astruc D. 2003. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem Rev 104:293–346.
- Daughton CG. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. Environ Impact Asses Rev 24:711–32.
- de Lima D, Roque GM, de Almeida EA. 2013. *In vitro* and *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Mar Environ Res 91:45–51.
- Ellman GL, Courtney K, Andres VJR, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. Biochem Pharmacol 7:88–95.
- Fako VE, Furgeson DY. 2009. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. Adv Drug Deliv Rev 61: 478–86.
- Ferry JL, Graig P, Hexel C, Sisco P, Frey R, Pennington PL, et al. 2009. Transfer of gold nanoparticles from water column to the estuarine food web. Nat Nanotechnol 4:441–44.
- Fraga S, Faria H, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Pereira E, et al. 2013. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. J Appl Toxicol 33: 1111–19.
- García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, et al. 2011. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. Environ Sci Technol 45:4630–6.
- Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6:144–60.
- Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. Angew Chem Int Ed Engl 49:3280–94.
- Gonzalez E, Arbiol J, Puntes VF. 2011. Carving at the nanoscale: sequential galvanic exchange and kirkendall growth at room temperature. Science 334:1377–80.
- Goodman CM, Chari NS, Han, G, Hong R, Ghosh P, Rotello VM. 2006. DNA binding by functionalized gold nanoparticles: mechanism and structural requirements. Chem Biol Drug Des 67:297–304.
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environ Sci Technol 43: 9216–22.
- Griffitt RJ, Weil R, Hyndman KA, Denslow ND, Powers K, Taylor D, et al. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). Environ Sci Technol 41: 8178–86.
- Gustafsson O, Gschwemd G. 1997. Aquatic colloids: concepts, definitions and current challenges. Limnol Oceanogr 42:517–28.
- Harper SL, Carriere JL, Miller JM, Hutchison JE, Maddux BL, Tanguay RL. 2011. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. ACS Nano 5:4688–97.
- Henry AI, Bingham JM, Ringe É, Marks LD, Schatz GC, Van Duyne RP. 2011. Correlated structure and optical property studies of plasmonic nanoparticles. J Phys Chem C 115:9291–305.
- Howard CV. 2004. Small particles big problems. Int Lab News 34:28–9. Johnston BD, Scown TM, Moger J, Cumberland SA, Baalousha M, Linge
- K, et al. 2010. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. Environ Sci Technol 44:1144–51.
- Kim KT, Zaikova T, Hutchison JE, Tanguay RL. 2013. Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation. Toxicol Sci 133:275–88.
- Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. J Phys Chem B 110:15700–7.

Kiser MA, Westerhoff P, Benn T, Wang Y, Perrez-Rivera J, Hristovski K. 2009. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. Environ Sci Technol 43:6757–83.

Chapitre III : Résultats et discussions

- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, et al. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ Toxicol Chem 27:1825–51.
- Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Durand E, Brèthes D, et al. 2013. Impact of dietary cadmium sulfide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure. Natoxicology 8:676–85.
- Laib JE, Shaw 3rd CF, Petering DH, Eidsness MK, Elder RC, Garvey JS. 1985. Formation and characterization of aurothioneins: Au, Zn, Cd-thionein, Au, Cd-thionein, and (thiomalato-Au)chi-thionein. Biochemistry 24:1977–86.
- Lerebours A, Cambier S, Hislop L, Adam-Guillermin C, Bourdineaud JP. 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 755:55–60.
- McCarthy JF, Burrus LW, Tolbert VR. 2003. Bioaccumulation of benzo(a)pyrene from sediment by fathead minnows: effects of organic content, resuspension and metabolism. Arch Environ Contam Toxicol 45:364–70.
- Moore MN, Noble D. 2004. Editorial: computational modelling of cell and tissue processes and function. J Mol Histol 35:655–8.
- Moore MN. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ Int 32:967–76.
- Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, et al. 2008. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging Acc Chem Res 41:1721–30.
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP. 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol Environ Safety 74:974–83.
- Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD. 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. NeuroToxicology 32:116–22.
- Romani R, Antognelli C, Baldracchini F, De Santis A, Isani G, Giovannini E, Rosi G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chem Biol Interact 145:321–9.
- Royal Society and Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. London: The Royal Society; 2004. p. 113.
- Tedesco S, Doyle H, Redmond G, Sheehan D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. Mar Environ Res 66:131–3.
- Truong L, Saili KS, Miller JM, Hutchison JE, Tanguay RL. 2012a. Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles. Comp Biochem Phys C 155:269–74.
- Truong L, Tilton SC, Zaikova T, Richman E, Waters KM, Hutchison JE, et al. 2013. Surface functionalities of gold nanoparticles impact embryonic gene expression responses. Nanotoxicology 7:192–201.
- Truong L, Zaikova T, Richman EK, Hutchison JE, Tanguay RL. 2012b. Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle exposure. Nanotoxicology 6:691–9.
- Unrine JM, Hunyadi SE, Tsyusko OV, Rao W, Shoults-Wilson WA, Bertsch PM. 2010. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). Environ Sci Technol 44:8308–13.
- Van Aerle R, Lange A, Moorhouse A, Paszkiewicz K, Ball K, Johnston BD, et al. 2013. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. Environ Sci Technol 47:8005–14.
- Vevers WF, Jha AN. 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. Ecotoxicology 17: 410–20.
- Wise Sr JP, Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongan AF, Walter RB, et al. 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat toxicol 97:34–41.

Supplementary material:

Function	Cono	Accordian	$\operatorname{Primor}(5^{\prime}, 2^{\prime})$
Function	Gene	Accession	FIIIIeI(3-5)
	name	number	
Cytoskeleton	bactin1	NM_131031	AAGTGCGACGTGGACA ^a
support			GTTTAGGTTGGTCGTTCGTTTGA ^b
Mitochondrial	coxl	NC_002333	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a
metabolism			AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
Oxidative stress	sod 1	BC055516	TGAGACACGTGGGAGACC ^a
			TGCCGATCACTCCACAGG ^b
	sod 2	CB923500	ATGGCTTTAACATAGTCCGGT ^a
			TTCAGGGCTCAGGCTGG ^b
	hsp70	AB062116	CCAGGGAGTTTTTAGCAGAAA ^a
			CATCGACGCCAACGGG ^b
DNA repair	gaad	BC059472	CTTCCCGCATTCAGCGAT ^a
			GCTTGTTCGTGTGTCTTCTGTGG ^b
	rad51	BC062849	GCCTCGGCCTCTGGTAA ^a
			TGCTGCGTCTCGCTGA ^b
Neurotransmission	ache	NM_131846	GTTAAGCAGACGAGGC ^a
			CCCGCATGGTAATCC ^b

Supplementary table S1. Role, accession numbers and specific primer pairs for the selected *D*. *rerio* genes.

Abbreviations: mt – metallothionein; coxI – cytochrome C oxidase subunit I; sodI-superoxide dismutase; sod 2– mitochondrial superoxide dismutase; Hsp70- heat shock protein; gadd – growth-arrest-DNA-damage; AchE-Acetyl-Cholinesterase; Lapmt4a-lysosomial protein MDA. ^aUpstream primer, ^bForward primer.

Suppmentary table S2. Main cha	racteristics of the			
Graonne river sediment (Ciutat et al, 2003)				
Grain size fraction	%			
<15µm	46.4			
15-30 μm	27.7			
30-63 μm	20.0			
63-125 μm	4.4			
125-250 μm	1.4			
250-500 μm	0.1			
>500 µm	0.0			
Organic carbon %	1.55			
Porosity %	0.74			

		Nano Au concentration in water		Ionic Au concentration in water	
		(in sedi	ment)	(in sec	liment)
Temperature	contr	0.25 μg/L	0.8 μg/L	0.33 µg/L	0.6 µg/L
(°C)	ol	(16 mg/kg)	(55 mg/kg)	(16 mg/kg)	(55 mg/kg)
		OPI	B7		
I1 [69-81[0	0	0	0	0
I2 [81-82[1	0.1*	0.8	0.9	0.7
I3 [82-83[0	0	0	0	0
I4 [83-84[0	0.1	0	0	0
I5 [84-85[0.1	0.1	0.5*	0.6*	0
I6 [85-86[0.8	0.3*	0.3*	0.3*	0.2*
I7 [86-87[0.1	0.5*	0.5*	0.7*	0.7*
I8 [87-88[0	0.1	0.1	0	0
I9 [88-89[0.5	0.3	0.2	0.4	0.2
I10 [89-90[0	0	0	0	0
		OPE	811		
I1 [69-78[0	0	0	0	0
I2 [78-79[0	0.1	0	0.1	0
I3 [79-80[0	0.1	0	0.3	0.1
I4 [80-81[0	0	0	0	0.3
I5 [81-82[0.3	0.3	0.4	0.3	0.2
I6 [82-83[0.4	0*	0.3	0.3	0.2
I7 [83-84[0.2	0	0.1	0.4	0.1
I8 [84-85[0.1	0.3	0.4	0.1	0
I9 [85-86]	0.7	0.5	0.6	0.7	0.5
I10 [86-87]	0	0.1	0	0	0.1
I11 [87-88[0.1	0	0.1	0	0.2

Supplementary table S3. Frequency according to the temperature intervals (C°) to which their T*m* belong of PCR products obtained with RAPD probes on 10 individual genomic DNAs from zebrafish^a

* represents the temperature ranges for which the frequency of occurrence of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05. ^a(n = 10).

Organs	Genes	Control	0.25 µg/L Nano Au	0.3 µg/L ionic Au	0.8 μg/L Nano	0.6 µg/L ionic
Drain					Au	Au
Dialli Ovidativa atraga	and 1	0.22 ± 0.02	0.29 + 0.01	0.56* + 0.0	$0.90* \pm 0.22$	0.64* + 0.01
Oxidative stress	sou I	0.25 ± 0.05 0.1 ± 0.01	0.28 ± 0.01 0.11 ± 0.01	$0.30^{\circ} \pm 0.9$ 1.20* ± 0.2	$0.89^{\circ} \pm 0.23$ 1.21* ^b ± 0.25	$0.04^{\circ} \pm 0.01$ 0.40* ± 0.04
Mitochondrial	sou 2	0.1 ± 0.01 30.6 + 2.2	0.11 ± 0.01 30.0 + 3.3	$1.29^{\circ} \pm 0.2$ 1.95* ± 0.2	$1.31^{\circ} \pm 0.33^{\circ}$ 222 * ^b + 60.9	$0.49^{-1} \pm 0.04$ 79 5* ^a + 4 2
metabolism	<i>COX1</i>	30.0 ± 2.2	50.9 ± 5.5	1.95 ± 0.2	222 + ± 00.9	19.5 ± 4.2
Detoxification	mt?	0.31 ± 0.03	0.45 ± 0.06	0.05*+0.01	2.5*+0.55	$2.7^{*a} + 0.77$
Detomication	hsp70	$(0.4 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	(0.7 ± 0.07) , 10^{-2}	0.01 ± 0.0004	$0.05^{*b} \pm 0.01$	$0.01*\pm 0.0008$
DNA repair	gaad	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.002	$0.0003^* \pm 5.1.10^{-5}$	$0.12^* \pm 0.04$	$0.08^{*a} \pm 0.007$
1	rad51	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001	$0.0003* \pm 0.00009$	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.001
Neurotransmiss	ache	0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.01	$0.33^* \pm 0.05$	$0.9^{*b} \pm 0.28$	$0.36^* \pm 0.02$
ion						
Gills						
Oxidative stress	sod 1	0.49 ± 0.11	0.31 ± 0.02	0.51 ± 0.08	0.47 ± 0.04	0.31 ± 0.06
	sod 2	0.16 ± 0.04	$0.04^{*b} \pm 0.005$	$0.58* \pm 0.12$	$0.05^* \pm 0.005$	0.11 ± 0.02
Mitochondrial	coxl	37.7 ± 10.7	$9.8^{*0} \pm 0.98$	$3.64* \pm 0.61*$	$8.26^* \pm 0.87^*$	$9.92* \pm 2.82$
metabolism			0.04	0.07.004		0.404.0.47
Detoxification	mt_2	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.17 ± 0.05	$0.49^* \pm 0.17$
DNA	hsp/0	0.01 ± 0.004	0.003 ± 0.0006	0.003 ± 0.0005	0.004 ± 0.0007	0.007 ± 0.002
DNA repair	gaaa nad51	0.01 ± 0.001	$0.03^{**} \pm 0.005$ 0.004* ± 0.0007	$0.0008^{*} \pm 0.0001$	$0.02^{**} \pm 0.002$	$0.03^{+-} \pm 0.01$
Neurotransmiss	raasi	0.01 ± 0.001 0.01 ± 0.003	$0.004^{\circ} \pm 0.0007$ $0.004^{\circ} \pm 0.00009$	0.000 ± 0.003 0.000 ± 0.002	$0.004^{\circ} \pm 0.0000$	0.017 ± 0.003 $0.03* \pm 0.003$
ion	ucne	0.01 ± 0.003	$0.004^{\circ} \pm 0.00009$	0.009 ± 0.002	0.02 ± 0.002	$0.03^{\circ} \pm 0.003^{\circ}$
Digestive tract						
Oxidative stress	sod 1	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.06	$1.61*\pm0.15$	0.3 ± 0.05	0.34 ± 0.1
01114441100 541055	sod 2	0.43 ± 0.14	0.23 ± 0.03	0.43 ± 0.13	$0.09^* \pm 0.01$	$0.1^* \pm 0.03$
Mitochondrial	coxl	17.9 ± 3.4	13.5 ± 1.7	$1.47* \pm 0.45$	$1.33^* \pm 0.08$	$2.52* \pm 1.1$
metabolism						
Detoxification	mt2	0.56 ± 0.15	0.6 *± 0.15	0.07 ± 0.01	0.48 ± 0.12	$1.14^{*a} \pm 0.06$
	hsp70	0.01 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.007	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.006
DNA repair	gaad	0.01 ± 0.003	$0.06^* \pm 0.001$	0.007 ± 0.0008	0.03 ± 0.005	$0.2^{*} \pm 0.05$
	rad51	0.03 ± 0.005	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.01	$0.06^* \pm 0.003$	$0.15^* \pm 0.05$
Neurotransmiss	ache	0.027 ± 0.008	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.008	0.02 ± 0.01	$0.21*\pm 0.07$
10n						
Muscle						
Oxidative stress	sod 1	0.52 ± 0.04	0.56 ± 0.09	0.6 ± 0.1	0.16 ± 0.03	nd
	sod 2	1.5 ± 0.3	0.46 ± 0.15	29.9 ± 7.4	0.17 ± 0.01	nd
Mitochondrial	coxl	487 ± 92.6	111 ± 29.3	143 ± 58.5	51.2 ± 9.4	nd
metabolism						
Detoxification	mt2	0.22 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.46 ± 0.06	nd
	hsp70	0.05 ± 0.01	0.016 ± 0.001	0.031 ± 0.008	0.003 ± 0.0001	nd
DNA repair	gaad	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.0018 ± 0.0003	0.023 ± 0.008	nd
-	rad51	0.036 ± 0.001	0.011 ± 0.0003	0.003 ± 0.001	0.020 ± 0.001	nd
Neurotransmiss	ache	1.11 ± 0.11	0.28 ± 0.09	0.34 ± 0.13	0.06 ± 0.01	nd
ion						

Supplementary table S4. H	Relative expression of	of genes in	various tissues	from control a	nd contaminated fish.
---------------------------	------------------------	-------------	-----------------	----------------	-----------------------

Values are genes' expression relative to bactin1 gene (mean, n=5). * Statistically significant differential expression compared to control assessed by the ANOVA on ranks – Tukey and dunn's test (p<0.05). ^a Statistically significant differential expression compared to 0.3 µg/L exposure.^b Statistically significant differential expression compared with NPs form assessed by Mann and Whitney test (p < 0.05).



Supplementary figure 1. Evolution of the turbidity of the water column over the experimental time. Experimental conditions were as follows: control: sediment without contamination; C_1 AuNps: contaminated sediment with gold nanoparticles, 16 mg/kg, C_2 AuNps: contaminated sediment with gold nanoparticles, 55 mg/kg; C_1 Au: contaminated sediment with ionic gold, 16 mg/kg and C_2 Au: contaminated sediment with ionic gold, 55 mg/kg (mean \pm SE ; n = 5).



Supplementary figure 2. Gold concentration in unfiltered (a) and filtered (b) water samples for the five experimental conditions during the 20 days of contamination. Experimental conditions were as follows: control: sediment without contamination; C1 AuNps: contaminated sediment with gold nanoparticles, 16 mg/kg C2; AuNps contaminated sediment with gold nanoparticles, 55 mg/kg; C1 Au: contaminated sediment with ionic gold, 16 mg/kg and C2 Au: contaminated sediment with ionic gold, 55 mg/kg (mean \pm SE ; n = 5).

C. IMPACT DES NANOPARTICULES D'OR INCLUSES DANS UN SÉDIMENT SUR UN BIOTOPE DOUBLE COMPRENANT DES VERS TUBIFEX ET DES POISSONS ZÉBRES

Impacts des nanoparticules d'or sur les vers Tubificidae et le poisson zèbre exposés à travers le sédiment

L'impact du sédiment contaminé aux nanoparticules d'or (Au NPs) de 14 nm de diametre a été étudiée chez les vers aquatiques Tubifex tubifex et le poisson zèbre Danio rerio exposés pendant 20 jours à deux concentrations, C1 :14 et C2 :56 mg Au NPs/ g de poids sec. AuNPs ont été libérés dans la colonne d'eau à partir du sédiment au cours de cette période, la concentration moyenne d'AuNPs dans la fraction non filtrée de la colonne d'eau dans les unités contenant les vers étaient de 0.22 ± 0.07 et $0.2 \pm 0.05 \mu g / L$, et dans les unités avec les vers et les poissons $0,42 \pm 0,15 \ \mu g/L$ et de $3,7 \pm 1,66 \ \mu g/L$, pour les deux concentrations utilisées, respectivement. Une expérience similaire en utilisant de l'or ionique a été réalisée ultérierement pour obtenir un témoin. L'or nanoparticulaire a été plus accumulé que lèor ionique par le poisson zébre. Les deux formes d'or ont été accumulées uniformément par les vers en présence de vers. Les Au NPs ont déclenché des differents effets chez les vers et les poissons, comprenant les modifications de la composition du génome en utilisant la teschnique d'analyse de la génotoxicité par RAPD-PCR. Les expressions des génes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondriale, detoxification et la répartion de l'ADN ont été également modifiées en réponse à l'accumulation des Au NPs dans les tissus des poissons. Finalement, les Au NPs alétraient l'activité de neurotransmission puisque l'activité de l'acétylcholine estérase augmentaitdans le muscle en réponse aux deux concentrations d'Au NPs. Nous n'avons pas observé un effet des Au NPS sur l'activité de bioturbation des vers alors que la présence des poissons zèbre dans la colonne d'eau au-dessus du compartiment sédimenaires a présenté un effet marqué sur lecomportement des vers.

Impact of gold nnoparticles on tubificidae worms and zebrafish exposed to a spiked sediment.

Amina Dedeh¹, Aurélie Ciutat¹, Mona Treguer-Delapierre² & Jean -Paul Bourdineaud¹

¹University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station, Place du D^r Peyneau, 33120 Arcachon, France ²University of Bordeaux ,CNRS, UPR 9048, Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, 87, Avenue du Docteur Schweitzer, 33600 Pessac , France

Amina Dedeh: aminadedeh@gmail.com Tel. : +33 556 223 930; fax: +33 556 549 383 Aurélie Ciutat : <u>a.ciutat@epoc.u-bordeaux1.fr</u> Mona Treguer-Delapierre: <u>treguer@icmcb-bordeaux.cnrs.fr</u> **Corresponding author:** Jean -Paul Bourdineaud:jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr Phone: (+33) 5 56 22 39 30; Fax: (+33) 5 56 83 51 04

Abstract

The impact of contaminated sediment containing 14 nm gold nanoparticles (Au NPs) was investigated on the aquatic worm *Tubifex tubifex* and the zebrafish Danio rerio exposed for 20 days to two concentrations, C_1 : 14 and C_2 : 56 µg Au NPs /g of dry weight. Au NPs were released from the sediment to the water column, and during this period the mean concentrations of gold NPs in the water column of tanks containing worms and fish were $0.42 \pm 0.15 \ \mu g/L$ and 3.7 ± 1.66 μ g/L, respectively. A similar experiment with ionic gold contamination at the same concentration was performed subsequently to get a control. Nanoparticular gold was significantly more accumulated by zebrafish than ionic gold. In worms cultivated in absence of fish in the water column, the ionic gold was more bioavailable than the nanoparticular form, whereas in presence of fish, worms evenly accumulated both forms of gold. Au NPs exposure triggered genotoxicity in worms and fish tissues materialized by modifications of genome composition (as assessed by the quantitative RAPD-PCR genotoxicity test). Expression of genes involved in oxidative stress, mitochondrial metabolism, detoxification and DNA repair were also modulated in response to Au NPs contamination in fish tissues. Finally, Au NPs altered zebrafish neurotransmission, since muscle acetylcholine esterase activity increased in response to both doses of Au NPs. We did not observe effects of Au NPS on worms' bioturbation activity whereas the presence of zebrafish in the water column above the sediment compartment did presented a marked effect on worms' behavior.

Keywords: gold nanoparticles; tubificidae worms; zebrafish; bioaccumulation; genotoxicity; gene expression.

Introduction

Gold nanoparticles (Au NPs) are already in use for numerous applications, ranging from biosensors to catalysts, in electronics, new paints, cosmetics, and in cancer treatments, among others. Their unique properties, chemical stability, and their ability to exhibit a multiplicity of shapes, particle sizes, and surface chemistry ensure their role as key nano-scale components in many technologies (Daniel and Astruc, 2003; Cobley et al, 2011; Gonzalez et al, 2011; Henry et al, 2011). Despite their advantages, their widespread use could lead to potential ecological risks (Klaine et al, 2008). Accordingly, it is likely that nanoscale products will enter the aquatic environment and then will sink down in the sediment compartment (Daughton, 2004; Howard, 2004; Moore, 2002; Moore et al, 2004). Several authors underline the need to carry out experiment using soil matrix (Hooper et al, 2011; Kool et al, 2011) or sediments (Keller et al, 2010) to well understand complex mechanisms, which can modify NPs bioavailability in this particular compartment. Indeed sediment constitutes a very important storage reservoir for complex contaminants resulting from the deposit of particles in suspension in the water column (Ciutat and Boudou, 2003). Findings regarding NPs ecotoxicity for soil species had highlighted the varied nature of responses to different NP types. For example, it has been shown that earthworms do not readily absorb carbon NPs from soil (Petersen et al, 2008a, 2008b), whereas metal NPs like TiO₂, ZnO, Ag, CeO₂, Au, and CuO can be taken up (Hu et al, 2010; Oughton et al, 2008; Unrine et al, 2010; Pang et al, 2012). In freshwater and marine invertebrate organisms, many studies demonstrated the potential impact of these nanomaterials to activate the detoxication system, genotoxic and oxidative responses, as well as causing harsh impact on organisms' behavior (including burrowing and locomotion) (Buffet et al, 2011; Buffet et al, 2012a; Buffet et al, 2012b; Cong et al, 2011; Li et al, 2012; Jackson et al, 2012). It has been shown that in mesocosms modelling an estuarine food web, a single dose of Au NPs could be transferred from the water column to sediments, biofilms, plants, clams, snails, shrimp and fish (Ferry et al, 2009). Au NPs cytotoxicity could depend on their nature (solubility and metal used), size (Cho et al, 2009) and concentration. Dietary and sedimentary exposures of zebrafish to gold nanoparticles demonstrated genotoxic impact and gene expression modulation (Geffroy et al, 2011; Dedeh et al, 2014). Tubificid oligochaetes are considered as one of the major agent of bioturbation in freshwater environments (Fisher et al, 1980), developing in addition a high density and a worldwide distribution (Avel, 1959). Their physiological, ecological and behavioral characteristics make them very interesting for toxicological studies, especially those relating to the role of sediment compartment in accumulation of pollutants (Ciutat et al, 2005). Tubificid worms are known to produce a bioadvection activity consisting in the ingestion of sediment particles in the background galleries and their rejection as fecal pellets on the sediment surface after extraction of the assimilable organic matter (Rhoads, 1974). Several species of oligochetes have been used for acute, chronic toxicity and bioaccumulation studies, and also as benthic indicators of freshwater pollution (Warren et al, 1998; Leynen et al, 1999; Chapman, 2001; Mermillod-Blondin et al, 2005). Until now, only few studies used T. tubifex to investigate NPs toxicity (Stanley et al, 2010; Verma et al, 2011). Acute toxicity tests were performed on T. tubifex using metal oxide NPs dispersed in the water column for 96 h. Median lethal dose values (LC₅₀) were 32, 100, 250 and 320 mg/L for CuO, PbO, ZnO and FeO NPs, respectively (Verma et al, 2011). T. tubifex were exposed to a spiked sediment containing aluminum oxide NPs for 10 days, at levels up to 100.10³ mg/kg of Al₂O₃ NPs but no effect on worm survival was observed (Stanley et al, 2010).

The purpose of the study was to assess the bioavailability and toxic effects of Au NPs (14 nm) mixed within the sediment in experimental units containing two animal model species such as tubificid oligochaetes worms (often used as detritivore and bioadvective model) and zebrafish. Exposure concentrations did not reflect the natural levels and were selected based on a previous study in which the effects of sediment contaminated by 16 and 55 μ g Au NPs/g dry weight had been previously investigated on zebrafish using bioaccumulation, neurotoxicity

assessment, DNA damages and gene expression levels during 20 days (Dedeh et al, 2014). To our knowledge this is the first study applying zebrafish as a vertebrate model along with worms to investigate the influence of each species on the other in terms of bioavailability, of NPs release into the water column, of DNA damage and gene expression levels, and impact on worms' bioturbation activity. For comparative purposes and to provide a control, worms and zebrafish were also exposed to sediment containing the ionic form of gold by addition of KAuCl₄.

Materials and methods

Preparation of gold nanoparticles

AuNPs were prepared according to the refined Turkevich method, which is based on the reduction of gold ions in aqueous solution with trisodium citrate as described (Dedeh et al, 2014).

Experimental design, sediment and animals sampling

The experiment used glass aquaria of $12 \times 12 \times 24$ cm containing 6 cm of sediment and filled with 3 L of freshwater representing a water column height of 16 cm laid above a 6 cm thick layer of sediment. Average water parameters throughout the experiment were as follows: temperature of $21.2 \pm 0.4^{\circ}$ C; conductivity of 990 \pm 96 μ S/cm and pH of 8.1 \pm 0.1 (mean \pm SD). The experimental units were permanently aerated by air bubbling in the superficial layer of the water column in order to produce an oxygen-saturated environment and exposed to a 12h:12h light:dark regime. Replicates were set up as follow: 3 independent aquaria with out animals, 3 independent aquaria with worms and 5 independent aquaria with fish and worms. A similar experiment with gold salt (KAuCl₄) was performed subsequently to obtain a control for gold ionic form. Time zero for the experiment was set just after the addition of animals to the experimental units (EUs). The experiment lasted 20 days with seven sampling times for water analysis: 0, 3, 7, 10, 13, 17 and 20 days. The complete experimental design was based on 33 EUs set up subsequently for each gold form

as described (Table S1), making a total of 66 EUs. The whole experiment implied to perform two independent experiments with two different batches of animals: one for each of Au NPs and KAuCl₄ exposures, because it was not possible to handle at the same time 66 EUs.

The sediment used had been collected from the Garonne River 8 km upstream from Bordeaux at a site called Cadaujac (44° 45' 23" N, 0° 31' 44" W, France), and its main characteristics have already been reported (Dedeh et al, 2014). It was homogenized, sieved at 2.5 mm of diameter and stored at 4°C in the dark for 72 h. Five samples were collected in order to determine the "fresh weight/dry weight" ratio (fw/dw = 1.58 ± 0.08 , mean \pm SD, after 72 h of desiccation at 60°C), and the background gold concentration in sediment (0.050 \pm 0.007 µg/g dw). The sediment was contaminated by adding one of the forms of gold solution followed by a 15 minute mechanical homogenization with a mixer (Peugeot, Pc20543, Paris, France) then stored at 4°C for 72 hours. We added 111 and 555 mL of a suspension containing 90 mg/L AuNPs per kg of sediment for C_1 and C_2 concentrations, respectively. For ionic gold conditions, we added 19 and 95 mL of a solution containing 521 mg/L of KAuCl₄ per kg of sediment for C_1 and C_2 concentrations, respectively. After sediment contamination, five sediment samples were collected randomly from each contamination condition at different places and depths and checked for gold distribution. The experimental conditions were as follows: Controls [C₀NPs and C₀IAu], contaminated sediment with $14.6 \pm 1.2 \,\mu g/g$ dry weight of AuNPs [C₁NPs], contaminated sediment with $56.6 \pm 1.2 \ \mu g/g \ dry$ weight of AuNPs [C₂NPs], contaminated sediment with $14.2 \pm 2.6 \ \mu g/g \ dry$ weight of KAuCl₄ [C₁IAu] and contaminated sediment with $56.8 \pm 1.2 \ \mu g/g \ dry$ weight of KAuCl₄ [C₂IAu] (Table S1). Eight hundred g of control or contaminated sediment (fresh weight) was introduced into each EU. Dechlorinated tap water (3L) was then carefully added after 48h to avoid disturbance at the sediment surface. The EUs were allowed to settle down for 8 days before worms and fish were placed.

Tubificid worms were purchased from a commercial company (GREBIL, Arry, France) and were acclimatized for 7 days at 20°C in large tanks containing the Garonne River sediment. Batches of 3 g (fw) of worms were randomly placed in EUs, each batch corresponding to 806 worms or about 60 000 worms.m⁻² which was close to densities found in natural environment (McCall and Fisher, 1980). The bioturbation activity of worms within the sediment compartment was analyzed using conservative fluorescent particulate tracers (Gérino et al, 1994). In each EU, a mixture of 4 g of luminophores and 80 g of Garonne sediment, in a 3mm thick frozen mud cake, was deposited after the introduction of worms and before the introduction of fish. Wild-type adult zebrafish (Danio rerio) were purchased from a commercial company (Exomarc, Lormont, France), and acclimatized for 7 days at 20°C in a large tank filled with dechlorinated water (body weight: 0.81 ± 0.01 and 0.72 ± 0.03 g (wet wt) for fish used in AuNPs and KAuCl₄ exposures, respectively; standard length: 3.33 ± 0.07 and 2.97 ± 0.04 cm for fish used in AuNPs and KAuCl₄ experiments, respectively, n = 6). Five fish were randomly placed in experimental units and fed 25 mg of food per fish every three days (Dr. Bassleer Biofish Food). Six fish were sampled to determine the background gold concentration but the value was below the detection threshold (<15 ng Au/g). After 20 days of exposure, fish were collected, killed within seconds by immersion in melting ice in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program, dissected and frozen at -80°C for bioaccumulation, neurotoxicity assessment, genotoxicity and gene expression analyses. The water column in each EU was delicately removed with a syringe. Cylindrical polyvinyl chloride units were placed in each sediment compartment and used to recover a cylindrical core for measurements of vertical distribution of gold and luminophores in the sediment. The remaining sediment was sieved for worms' collection. Worms were then frozen at -80°C for further bioaccumulation and genotoxicity analysis.

Turbidity measurements

Turbidity was measured at the seven sampling times in the water column of each experimental unit. Ten mL of water were collected from the central part of the experimental units. Water samples were then processed for measurement with a turbidimeter (Turb 430 IR/T; WTW Company, Weilheim, Germany). Results were expressed in Formazine Turbidity Units (FTU), which are equivalent to Nephelometric Turbidity Units (NTU).

Sampling of water and sediment

Gold determination was made on water samples at the seven sampling times. Twenty milliliters of water were collected from each experimental unit. Ten mL were directly acidified for gold determination in unfiltered samples. The other 10 mL were filtered at 0.2 μ m (cellulose acetate membrane) and then acidified for gold quantification in the filtered fraction. Sediment cores collected in cylindrical polyvinyl chloride unit were cut into eight layers: 0 - 0.5, 0.5 - 1, 1 - 1.5, 1.5 - 2, 2 - 3, 3 - 4, 4 - 5, 5 - 6 cm of depth. Each layer was weighed (fw), lyophilized (Thermo scientific-Heto- PowerDry LL3000, Waltham, MA, USA) and weighed again (dw) in order to determine the fw/dw ratio. Approximately 50 mg of lyophilized sediment of each layer were acidified in 3 mL of *aqua regia* before gold quantification to determine the vertical distribution of gold in sediment.

Vertical distribution of luminophores in sediment

For luminophores counting, each lyophilized sediment layer was mechanically mixed and weighed. Then, 2 g of sediment from each layer powder were weighed and spread in a Petri dish. Photography of each Petri dish was then taken under UV light using a Nikon D100 camera (Tokoyo, Japan). Photos were then processed with ObviousAviExplore V2.3 software (Jean-Claude Duchêne, CNRS Arcachon) to count the number of luminophores in each Petri dish and hence to get the luminophores concentration expressed in luminophores per g of dry sediment. Luminophores distribution in each layer has then been expressed as percentage relative to the total luminophores count. The luminophores-based methodology has been introduced to measure the sediment reworking. Its main

advantage is that they allow a direct quantification of sediment reworking over short temporal scales after the input of a tracer pulse at the sediment surface (Maire et al, 2008). Bioturbation assessment was based on the measurement of the vertical distribution of luminophores within the sediment column. The underlying principle is that tracers initially deposited at the sediment–water interface, are displaced due to the action of benthic fauna.

Gold quantification

Gold quantifications in water, worms and zebrafish tissues were carried out by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (M6 Solaar AA spectrometer, Thermoptec, Mulgrave, Australia) with a detection limit of 25 ng Au/L. Gold quantification in sediment samples was carried using flame atomic absorption spectrometry (Varian, AA20, Australia), with a detection limit of 2.5 mg Au/L. Gills (tissue weight between 10 and 20 mg) were digested in 1 mL of aqua regia (0.25 vol of 65 % HNO3 -Merck, Darmstadt, Germany and 0.75 vol of 37% HCl – Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Germany) at 100°C for 3h. Worms, zebrafish digestive tract and muscles samples (tissue patches weighing more than 20 mg) were digested in 3 mL of aqua regia at 100°C for 3 h. Liquid from digested tissues underwent a six-fold dilution with ultrapure water (MiliQ, Bedford, MA, USA). Fish brains (weighing less than 10 mg) were digested in 0.2 mL of aqua regia at 100° C for 3h then diluted fivefold with ultrapure water. Detection limits were 5 ng/g for brains weighing 5 mg, 8 ng/g for gill samples weighing 15 mg, and 15 ng/g for muscle samples weighing 30 mg. Gold quantification was performed on water samples from the seven sampling times. Twenty milliliters were collected from each experimental unit, 10 mL were directly acidified with aqua regia (600 μ L) for gold determination in unfiltered samples; the other 10 mL were filtered at 0.2 µm (cellulose acetate membrane SFCA) and then acidified with aqua regia (600 µL) for gold quantification in the filtered water fraction. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by analyzing standard solutions of gold (Prolabo, Nantes, France). Values were consistently within the certified ranges.

Acetylcholine esterase activity measurement

Brain and muscle acetylcholine esterase (AchE) activity, a neurotoxicity biomarker, was assessed according to the Ellman method, using microplate spectrometry as described (Dedeh et al, 2014). This assay makes use of the thiocholine-mediated cleavage of the chromogenic disulfide 5,5-dithiobis 2nitrobenzoic acid. Before enzymatic assays, total protein content of brain and muscle was measured according to the Bradford method. AchE activity was expressed as the specific initial velocity of AchE in nmol of hydrolyzed substrate per mg of protein per minute in fish.

Quantification of genotoxic damages by RAPD-PCR and analysis of the melting temperature curves of the PCR products

Genotoxic effects of Au NPs and ionic gold were assessed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology. This method was successfully used on zebrafish exposed to cadmium, and gold or cadmium sulfide NPs (Cambier et al, 2010; Orieux et al, 2011; Geffroy et al, 2012; Ladhar et al, 2013; Dedeh et al, 2014). Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen fish tissues with a scalpel and using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Primers used for RAPD-PCRs were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3'), OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'). Reference probes for *T. tubifex* worms were from the 28S ribosomal RNA gene (GQ 355465): reverse 5'-CCAGCTATCCTGAGGG-3'; forward 5'AGAGCGTACACGTTGG-3', and for zebrafish, β -actin probes (NM 131031): forward, 5'- GTTTAGGTTGGTCGTTCGTTTG-3' and reverse 5'- AAGTGCGACGTGGACA-3'. Primers were purchased from Sigma-Proligo (St. Louis, MO, USA). Real time RAPD-PCRs were done with the Lightcycler apparatus (Roche, Basel, Switzerland) as described (Lerebours et al, 2013). The principle of the calculation of the number of hybridization sites per genome unit has already been described (Lerebours et al, 2013). In the case of worms, since we do not know the number of 28S ribosomal RNA gene copies, we could only perform a relative quantification of the hybridization sites. For each worm, using OPB7, OPA9 and 28S ribosomal RNA probes, the difference $\Delta = Ct$ (28S) - Ct (OPB7 or OPA9) reflects the difference of hybridization efficiencies between the RAPD and the 28S probes. It can be calculated from $2^{\Delta+1}$, which corresponded to the number of hybridization sites of OPB7 or OPA9 probe relative to the number of copies of 28S gene. Melting temperature (T*m*) curves analyses were done using the LightCycler Software 3.5 (Roche) as described (Lerebours et al, 2013).

Gene expression analysis in zebrafish

After 20 days, zebrafish were dissected and sampled tissues (brain, gills, digestive tracts and muscle) kept frozen in RNA-later (QIAGEN) at -80°C until used. The expression of eight genes was analyzed (Table S2); five samples were used for each exposure. Samples were crushed and total RNA was extracted using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions and as described (Dedeh et al, 2014). First-strand cDNA was synthesized from 14 μ L of total RNA using the Affinity ScriptMulti Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene) and as described (Dedeh et al, 2014). All primers pairs were designed with the Lightcycler probe designer setup (Dedeh et al, 2014). Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the β -actin gene expression. The choice of β -actin gene as a reference was relevant because its expression did not vary with Au NPs contamination. In gills, for example the mean Ct remained constant for the different conditions (control: 21.6 ± 1.7; C₁NPs: 20.7 ± 2.2; C₂NPs: 19.9 ± 1.6).

Statistical analysis

Significant differences in number of hybridizing sites and frequency PCR products when compared to control were determined with the Mann-Whitney U-test or a t-test depending on data normality. Other significant differences in gold

levels, acetylcholinesterase activity and relative gene expressions in fish tissues under different conditions were determined with the ANOVA on ranks using Tukey and Dunn's tests (p < 0.05). The statistical software used for all tests was Sigma Stat 3.5 (San Jose, CA, USA).

Results

Water turbidity and gold release in the water column

In EUs without animals or containing worms only, the water turbidity values were low during the 20 days of exposures (< 5 FTU). In contrast, in EUs containing fish, water turbidity displayed high values meaning that fish swimming was responsible for sediment particles suspension. In those EUs, turbidity values reached 56 \pm 21, 39 \pm 21 and 47 \pm 14 FTU for C₀NPs, C₁NPs and C₂NPs exposures, respectively, and 73 ± 29 , 34 ± 13 and 30 ± 9 FTU (mean \pm SD) for C₀IAu, C₁IAu and C₂IAu exposures (Figure S1). Gold concentrations in filtered water samples were below the detection threshold (< 25 ng Au/L). Data for total gold concentration in unfiltered water samples are shown in Figure S2 (a. b). The EUs containing worms only and those containing both animals will be labeled [W] and [WF], respectively. The mean concentration in unfiltered water samples reached 0.22 \pm 0.07 and 0.2 \pm 0.05 µg/L for C₁NPs and C₂NPs exposures in [W] EUs, respectively, and 0.42 \pm 0.15 and 3.7 \pm 1.66 µg/L for C₁NPs and C₂NPs exposures in [WF] EUs, respectively (means \pm SD). For ionic Au exposures, the mean concentration in unfiltered water samples reached 0.22 ± 0.03 and 0.8 ± 0.1 0.05 μ g/L for C₁IAu and C₂IAu exposures in [W] EUs, respectively, and 0.81 ± 0.09 and 1.85 \pm 0.51 for C₁IAu and C₂IAu exposures in [WF] EUs, respectively (means \pm SD). Thus, the highest gold concentrations released in the water column are from sediments spiked with the highest nanoparticular and ionic forms of gold in presence of fish. The fractions of gold released relative to that sequestered in the sediment were 2.8.10⁻⁵ and 6.10⁻⁵ for C_1NPs and C_2NPs exposures in [WF] EUs, respectively, and 5.10⁻⁵ and 3.10⁻⁵ for C₁IAu and C₂IAu exposures in [WF] EUs, respectively.

r r r r r r r						
condition		[W]			[WF]	
	control	C ₁ 14 mg/kg	C_2 56 mg/kg	control	C ₁ 14 mg/kg	C_2 56 mg/kg
Au NPs	0.032 ± 0.01	1.03 ± 0.06 *	2.6 ± 0.5 *	0.028 ± 0.004	$0.38\pm0.14^{\ast b}$	$1.48 \pm 0.12^{*b}$
KAuCl ₄	0.031 ± 0.003	1.05 ± 0.04 *	$5.1 \pm 0.2 *^{a}$	0.03 ± 0.007	$0.33\pm0.03^{\ast b}$	$1.25 \pm 0.14^{*b}$
BAF AuNps		0.073	0.048		0.027	0.026
BAF ionic Au		0.075	0.092		0.023	0.022

Table 1. Gold concentrations measured in worms (μ g/g, fresh weight) and bioaccumulation factor (BAF) after 20 days of exposure.

Results are mean \pm SEM, n = 4; * Asterisks indicate a significant differential gold concentrations compared to the control worm assessed by the ANOVA on ranks test- Dunn's test (p < 0.05); ^a Statistically significant values compared to Au NPs exposure, ^b Statistically significant values compared to worms units as assessed by the Mann-Whitney U-test (p < 0.05). BAF: Bioaccumulation factor = Au concentration in worms / Au concentration in sediment.

Gold accumulation in animals

When worms were exposed to the higher Au NPs concentration without fish, gold was less accumulated than ionic Au. In worms exposed alone, 32- and 83fold increases in gold concentration compared to control worms were observed for C_1NPs and C_2NPs exposures, respectively. The ionic gold was as efficiently accumulated since gold concentration increased 33- and 163-fold after C₁IAu and C₂IAu exposures, respectively. The presence of fish in worms' UEs was accompanied by decreased gold accumulations in worms. In fact, gold concentrations were less intense than in worms exposed without fish: they were 3and 2-fold weaker for C₁NPs and C₂NPs exposures in [WF] EUs, respectively, and 3- and 4-fold weaker for C₁IAu and C₂IAu exposures in [WF] EUs, respectively (Table 1). Bioaccumulation factors (calculated as the ratio of the concentration of gold in animals tissues over the concentration of gold in the sediment) in worms exposed without fish presented low values that were even weaker when worms were exposed in presence of fish for both nanoparticular and ionic forms. For instances, at the higher contamination pressure of 56 mg/kg bioaccumulation factors decreased from 0.048 down to 0.026, and from 0.092 down to 0.022 in the cases of nanoparticular and ionic forms, respectively (Table 1).

In zebrafish, gold was much more accumulated from the nanoparticular than the ionic form. For instances, after exposure to 54 mg/kg, the accumulation ratios between Au NPs and ionic gold exposures reached values equal to 1.4, 7, 10 and 13 in brain, gills, muscle and digestive tract, respectively (Table 2).

AchE activity in zebrafish brain and muscles

AchE activity reached 662 ± 121 and 375 ± 7 nmol/mg/minute in control zebrafish brain and muscle, respectively. Au NPs exposures did not modify AchE activity in brain but triggered a significant increase in AchE activity in muscles with recorded values of 2521 ± 398 and 2341 ± 755 nmol/mg/minute after exposure to C₁NPs and C₂NPs, respectively, resulting in 2.8-fold and 2.5-fold increase as compared to control values, respectively.

	Brain	Gills	Digestive tract	Muscles
Control	0.0135 ± 0.0012	0.051 ± 0.002	0.05 ± 0.01	0.038 ± 0.015
		A	u NPs	
C ₁ NPs 14 mg/kg	$0.15 \pm 0.03*$	0.08 ± 0.009 *	$0.61 \pm 0.06*$	$0.19 \pm 0.038*$
C ₂ NPs 56 mg/kg	$0.28 \pm 0.04*$	0.66 ± 0.21*	$2.4 \pm 0.7*$	0.33 ± 0.019*
		Ioni	ic Au	
C ₁ IAu 14 mg/kg	$0.065 \pm 0.001^{*a}$	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.05^a	0.035 ± 0.01^{a}
C ₂ IAu 56 mg/kg	$0.209 \pm 0.04*$	0.09 ± 0.012^{a}	0.18 ± 0.06^{a}	0.031 ± 0.007^{a}

Table 2. Gold concentrations measured in zebrafish brain, gills, digestive tract and muscles $(\mu g/g)$ and bioaccumulation factors fresh weight after 20 days of exposure.

Results are mean \pm SEM; n = 3.* Asterisks indicate a significant differential gold levels compared to control worm assessed by the ANOVA on ranks and - Dunn's test (p < 0.05); ^a Statistically significant values compared to Au NPs exposure as assessed by the Mann-Whitney U-test (p < 0.05). Bioaccumulation factors represent the ratio of accumulated Au in fish' tissues/ Au concentration in the water column.

In contrast, ionic gold exposures did not influence muscle AchE activity but triggered a significant increase in brain AchE activity with recorded values of 558 \pm 93 and 488 \pm 23 nmol/mg/minute after exposure to C₁NPs and C₂NPs, respectively, resulting in 1.5-fold and 1.3-fold increase as compared to control values, respectively.

Genotoxic outcomes in worms

After 20 days of exposure, OPB7, OPB11 and OPA9 primers unraveled differences in DNA composition between contaminated and control worms (Table 3 and Table S3). The number of OPB7 relative hybridization sites displayed a significant 7-fold decrease and that of OPA9 a total loss after exposure to the lower gold NPs concentration in EUs devoid of fish. In contrast, at higher concentration of gold NPs, we only noticed a tendency towards the increase of OPB7 and OPA9 relative hybridization sites, probably due to the balance between creation and loss of hybridization sites, a drawback of that method. Upon addition of fish to EUs containing worms, we did not observe significant differences in OPB7 and OPA9 relative number of hybridization sites for both concentrations of gold NPs, which indicated that the presence of fish indirectly influenced gold NPs genotoxic potential, and that matter of fact is most probably due to the weaker accumulation of gold within worms' tissues in presence of fish.

When looking at the frequencies of PCR products materialized by their T*m*, we also found differences between contaminated and control worms (Tables S4 and S5). Indeed, we noticed significant differences in the frequency of PCR products of T*m* belonging to the temperature intervals [82-83°C[(decrease from 0.5 for control down to 0) and [79-80°C[(increase from 0.1 for control up to 0.6) using OPB7 and OPA9, respectively, on DNAs coming from worms sampled from EUs without fish and exposed to C₁NPs (Table S4).

Table 3. Number of relative hybridization sites per genome unit of RAPD probes, after RAPD-PCR performed on individual genomic DNA from control and contaminated worms and fish.

		AuNPs			Ionic Au					
	Control AuNPs	C ₁ NPs	C ₂ NPs	Control IAu	C ₁ IAu	C ₂ IAu				
	Worms									
Primers	[W]									
OPB7	$(5.1 \pm 1.4).10^{-3}$	$(0.7^* \pm 0.4).10^{-3}$	$(13 \pm 7.5).10^{-3}$	(5.7±1.1).10 ⁻³	$(7.1 \pm 1).10^{-3}$	$(4.2 \pm 0.9).10^{-3}$				
OPA9	$(34.6 \pm 13.6).10^{-5}$	0*	(84.3 ± 39.6).10 ⁻⁵	$(86.3 \pm 18.6).10^{-5}$	$(7.35^* \pm 1.7) .10^{-5}$	(6.13*± 2.37).10 ⁻⁵				
	[WF]									
OPB7	$(0.2 \pm 0.06).10^{-3}$	$(0.4 \pm 0.01).10^{-3}$	$(0.4 \pm 0.09).10^{-3}$	$(5.6 \pm 1.2).10^{-3}$	$(12 \pm 1.6).10^{-3}$	$(0.35^{*a} \pm 0.1).10^{-3}$				
OPA9	$(1.82 \pm 0.8).10^{-5}$	$(6.4 \pm 2.3).10^{-5}$	$(5.43 \pm 1.64).10^{-5}$	$(79 \pm 10).10^{-5}$	$(137 \pm 21.1).10^{-5}$	(6.28*± 2.8).10 ⁻⁵				
	fish									
OPB7	1.76 ± 0.43	1.21 ± 0.42	1.03 ± 0.34	1.38 ± 0.34	$0.26 \pm 0.08*$	2.69 ± 0.21*				
OPB11	(15.6 ± 4.6).10 ⁻⁵	(53.4 ± 18.7).10 ⁻⁵	(5.63 ± 2.65).10 ⁻⁵	$(481 \pm 164). \ 10^{-5}$	(67.9 ± 22.8).10 ⁻⁵ *	(2834 ± 719).10 ⁻⁵ *				

Results are mean \pm SEM (n = 10). The relative number of hybridization sites of a RAPD probe is defined as the ratio of the total hybridization sites of the RAPD probe over 28S ribosomal gene copies number. *statistically significant compared to control as assessed by the Mann-Whitney U-test p < 0.05.

At higher concentration of gold NPs, although we could not observe significant effects in terms of relative hybridization sites, the frequency of PCR products of Tm belonging to the temperature intervals [80-81°C] decreased from 0.5 for control down to 0, signaling the usefulness and complementarity of that qualitative approach. The same holds true with gold NPs exposure in presence of fish. Using OPB7, PCR products of Tm belonging to the temperature interval [84-85°C[showed a significant increase in frequency of generation (from 0.3 for control up to 0.8 for both C_1NPs and C_2NPs exposures), and those belonging to the interval [79-80° C] showed a significant decrease in frequency of generation using OPA9 (from 0.4 for control down to 0 for C_1NPs and C_2NPs exposures) (Table S5). The ionic gold form also triggered genotoxic outcomes in worms DNA whatever the absence or presence of fish in the water column, as illustrated by the significant 12- and 14-fold decreases of OPA9 relative number of hybridization sites after C₁IAu and C₂IAu exposures, respectively, in EUs without fish, and the significant 16- and 14-fold decreases of OPB7 and OPA9 relative number of hybridization sites after C₂IAu exposure in EUs containing fish (Table 3).

Genotoxic outcomes in zebrafish

Exposure of zebrafish to Au NPs for 20 days did not show significant differences in terms of OPB7 and OPA9 hybridization sites, which can be due to the compensatory balance between creation and loss of hybridization sites (Table 3). Indeed, the effects of gold NPs on fish DNA integrity could be unraveled by the observed differences of frequencies of PCR products generation. Using OPB7, PCR products of T*m* belonging to the temperature intervals [83-84°C[, [84-85°C[and [88-89°C[displayed differences in frequencies after exposure to gold NPs. The same was observed using OPB11, for PCR products of T*m* belonging to the intervals [79-80°C[, [80-81°C[, [82-83°C[, [83-84°C[and [84-85°C[after exposure to gold NPs (Table S6).

Table 4. Differential gene ex	xpressions in var	rious tissues from c	contaminated fish a	fter 20 days of gold	l exposure.
Tissues	Genes	C ₁ NPs	C ₁ IAu	C ₂ NPs	C_2 IAu
		14 mg/kg	14 mg/kg	56 mg/kg	56 mg/kg
Brain					
Oxidative stress	sod 1	3*	=	=	=
	sod 2	3*	=	=	=
Mitochondrial metabolism	coxl	11*	=	2*	=
Detoxification	mt2	=	=	=	=
	hsp	=	=	1/5*	1/5*
DNA repair	gaad	=	=	=	=
	rad51	=	1/4*	=	1/4*
Neurotransmission	achE	=	=	=	=
Gills					
Oxidative stress	sod 1	8*	4*	5*	$2^{*^{ab}}$
	sod 2	2*	3*	=	2*
Mitochondrial metabolism	coxl	4*	2*	5*	2* ^a
Detoxification	mt2	=	=	16*	=
	hsp	=	5*	2*	$2^{*^{a}}$
DNA repair	gaad	3*	2*	=	3*
	rad51	5*	8*	4*	6*
Neurotransmission	achE	=	1/3* ^a	=	=
Digestive tract					
Oxidative stress	sod 1	1/6*	=	=	=
	sod 2	1/9*	=	1/3*	=
Mitochondrial metabolism	coxl	1/20*	1/8*	=	1/3*
Detoxification	mt2	=	1/7*	=	1/4*
	hsp	=	=	=	=
DNA repair	gaad	=	1/4*	=	=
	rad51	3*	3*	=	6*
Neurotransmission	achE	1/30*	=	=	1/10*
Muscle					
Oxidative stress	sod 1	=	=	=	=
	sod 2	1/8*	1/9*	1/6*	1/10*
Mitochondrial metabolism	coxI	1/3*	1/4*	1/3*	1/5*
Detoxification	mt2	1/10*	1/3*	=	1/8*
	hsp	5*	1/3* ^a	=	3 ^b
DNA repair	gaad	1/18*	=	1/70* ^b	=
	rad51	1/3*	=	1/7* ^b	1/3*
Neurotransmission	achE	=	1/4*	1/4*	=

Chapitre III : Résultats et discussions

The differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in fish cultured in the indicated contaminated conditions over that of fish cultured in uncontaminated conditions (mean, n = 5). *Asterisks represent significant differential expression compared with control assessed by the ANOVA on ranks - Tukey and Dunn's test (p < 0.05).^a Statistically significant differential expression compared to 14 mg/kg exposure, ^b Statistically significant differential expression compared to AuNPs condition assessed by Mann–Whitney test (p < 0.05). =: identical to control condition.

The ionic form of gold modified the composition of fish DNA. After 20 days of exposure, the number of primer hybridization sites to fish DNA decreased significantly after C_1IAu exposure, reaching 4- and 4-fold decreases as assessed by OPB7 and OPB11, respectively. At higher C_2IAu concentration, the number of primer hybridization sites significantly increased and reached 2- and 6-fold increases for OPB7 and OPB11, respectively (Table 3 and Table S6).

Gene expression variations in response to gold NPs

Relative gene expression in brain, gill, digestive tract and muscle from exposed fish were compared to those from control fish (Table S7). From these values, differential gene expressions were determined, calculated as the ratio of relative expression in contaminated fish tissue over that of control (Table 4). In gills, an acclimative genetic response to both gold forms occurred. The responsive genes sod1, sod2, cox1, hsp, rad51, gaad were up-regulated several times after AuNPs and ionic gold exposures. Significant differences in gene regulation were observed between the two gold forms in brain, and for instances, the genes *sod1*, sod2 and cox1 involved in oxidative stress and mitochondrial metabolism were 3-, 3- and 11-times more expressed in response to NPs than to ionic form, respectively, whereas the DNA repair gene rad51 was 4-times more repressed. In digestive tract, Au NPs exposure triggered the repression of sod1, sod2, cox1, and achE genes, whereas only cox1 and achE genes were repressed in response to ionic gold exposure. In muscles, the exposure to both forms of gold triggered the down regulation of several genes including sod2, cox1, mt2, achE, and rad51 genes. The repression of *gaad* was specific to the nanoparticular form. Worth to note the *rad51* gene involved in DNA repair was up regulated in response to both forms of gold in gills and digestive tract whereas it was specifically repressed by the nanoparticular form in muscles and by the ionic form in brain.


Figure 1. Fish disturb the activity of sediment reworking operated by worms. Shown are vertical profiles of particulate fluorescent tracers in the sediment after 20 days. The experimental conditions were as follows: [No]: EUs without animals; [W]: EUs with worms; [WF]: EUs with worms and fish. Since gold NPs exerted no effects on worms' activity, we just show data obtained under contamination of sediment with 14 mg Au Nps/kg. Data are similar in control EUs and those in which sediment is spiked with 56 mg Au Nps/kg.

Vertical distribution of gold and luminophores in the sediment

The vertical distribution of gold in control and Au NPs spiked-sediment is illustrated in Figure S3. Significant weaker gold concentrations from the surface of the sediment down to 2 cm of depth were observed in EUs spiked with Au NPs in absence of animals compared to EUs containing the same spiked sediment sheltering worms. For instances, in the 0-0.5 cm layer, gold concentration was equal to $20.7 \pm 2.3 \mu g/g$ in EUs devoid of animals whereas it reached 54.7 ± 4.5 and $58.4 \pm 2.1 \mu g/g$ in EUs containing worms or worms and fish, respectively. This indicated that worms' activity maintained a homogeneous concentration of total gold all along the depth transect.

The vertical distribution of luminophores in control and AuNPs spikedsediments is shown in Figure S4. Two important facts stemmed from those profiles: 1/ No significant differences of vertical distribution of luminophores were observed between control and gold NPs-spiked sediments for both C_1 and C_2 concentrations in EUs containing worms; 2/ The presence of fish in the water column completely suppressed the sediment reworking activity of worms (Figure 1). Since no impact of gold NPs could be detected on worms' activity, and due to the low number of independent EUs for some exposure conditions (it has been technically difficult to get perfect core sampling in all of the EUs), we decided to pool data from EUs containing no animals, or with worms only, or with both species, to allow statistical computations. Indeed, in EUs without animals (and whatever the content in gold NPs), the maximal concentration of luminophores remained confined to the upper sediment layers since about 70 ± 20 % of the total luminophore content was located in the 0-0.5 cm sediment layer ($n = 8, \pm$ SD). In sediment containing tubificid worms, worms' activity caused the shift of luminophores to downward depths since the highest luminophores concentration was in the 3-4 cm sediment layer, reaching 72 ± 27 % of the total luminophores content ($n = 7, \pm$ SD), whereas in the 0-0.5 cm sediment layer this proportion only reached 0.7 ± 1.3 % (n = 7). When fish were swimming in the water column, the

materialization of worms' activity vanished since the maximal concentration of luminophores remained confined to the upper sediment layers, reaching $53 \pm 18\%$ of the total luminophores content in the 0-0.5 cm sediment layer, like what has been observed in EUs devoid of animals ($n = 10, \pm$ SD). The differences of luminophores density in the 0-0.5 and 3-4 cm layers between EUs containing only worms with those devoid of animals or containing both species appeared significant as monitored with the Mann-Whitney U-test (p < 0.05).

Discussion

Metal and NPs release from the sediment

Water turbidity increased when worms were in presence of fish, which demonstrated a resuspension of sediment particles due to fish swimming near the sediment water interface. Such a phenomenon had already been observed in the case of zebrafish, who disturbed the sediment and increased gold concentration in the water compartment in EUs devoid of worms (Dedeh et al, 2014). Turbidity values in this work (Dedeh et al, 2014) were much higher (up to 800 FTU) compared to that in the present work (up to 56 FTU). The difference is due to the presence of tubificidae worms and suggests that tubificidae worms decreased sediment particles resuspension through sediment stabilization or that they had an effect on fish movements, unknown yet. In our previous study, zebrafish swimming movements caused the release of 11 µg Au/L in the water column resulting in a concentration of 0.8 µg Au/L in the filtered water fraction from a sediment spiked with 55 mg Au NPs/kg (Dedeh et al, 2014). In the present study, despite the presence of fish, worms contained the release of gold from a sediment spiked with 56 mg Au NPs/kg to 3.7 µg Au/L in the water column, and this resulted in a gold concentration in the filtered water below the detection threshold (< 25 ng/L). Since only the free gold and filterable NPs can be considered as bioavailable for fish, we were unable to determine the zebrafish contamination pressure from the direct route.

Suppression of worms' bioturbation activity by the presence of fish

The presence of fish in the water column completely suppressed the sediment bioturbation activity of worms, which indicate that zebrafish impacted worms' behavior. In fact luminophores profiles in EUs containing both species were similar to those obtained in EUs without animals. Those results suggested that worms could be perturbed by the presence of fish possibly leading to a full burying of worms in the depth of the sediment.

Several NPs like copper and zinc oxide can affect the burrowing behavior in invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* (Buffet et al, 2011; Buffet et al, 2012b). Aluminum oxide NPs impacted the locomotion behavior in *Caenorhabditis elegans* nematodes (Li et al, 2012). In the present study, gold NPs did not affect worm's bioturbation activity. The main difference with the above quoted articles is the level of bioaccumulation of metal from NPs exposure. For instances, *S. plana* and *H. diversicolor* accumulated 6.5 and 6.7 μ g Zn/g after 16 days of exposure to a sediment spiked with 3 mg/kg of ZnO NPs (Buffet et al, 2012b) whereas T. tubifex accumulated 2.6 μ g Au/g from a sediment spiked with 56 mg/kg of gold NPs.

Gold NPs bioaccumulation

Worms accumulated twice as much gold from ionic gold exposures than from gold NPs exposures when they were exposed alone which means that ionic gold is more bioavailable to tubificidae worms. When zebrafish was added to tanks containing worms, gold concentration in worms decreased 2- and 4-times for Au NPs and KAuCl₄ exposures, respectively. This means that the two forms of gold become less available to worms in presence of fish. This lesser accumulation of gold might be due to the fact that the presence of fish triggers the suppression of the bioturbation activity of worms, a probable behavior of predation escaping. Indeed, the bioturbation activity not only creates sediment remobilization and luminophores dispersion but allows worms feeding from ingestion of particulate matter. Bioaccumulation of NPs in worms has been demonstrated in worms after

exposures to contaminated sediment. Bioaccumulations factors reached 3.3 in H. *diversicolor* after exposure to a sediment spiked with 3 mg Zn NPs/kg for 16 days (Buffet et al, 2012), 0.37 and 0.17 in H. diversicolor after 10 days of exposure to a sediment spiked with 0.25 or 50 mg Ag NPs/kg, respectively (García-alonzo et al, 2011; Cong et al, 2011). In the present study, bioaccumulation factors in T. tubifex exposed to a sediment spiked with 56 mg gold NPS/kg for 20 days reached much lower values such as 0.048 and 0.026, when worms were alone in tanks or accompanied by zebrafish, respectively. A similar low values, 0.028, has already been observed after exposure of the earthworm Eisenia fetida to a sediment spiked with 50 mg gold NPs/kg for 28 days (Unrine et al, 2010), indicating that gold NPs are much less available than other metal NPs dispersed in a sediment. The presence of worms in the sediment completely modified the pattern of gold bioaccumulation in zebrafish tissues. In the present study, when zebrafish were exposed to gold NPs in presence of worms, gold from Au NPs was much more bioavailable than from the ionic form. When the sediment was spiked with 56 µg Au/g, digestive tract, muscles and gills accumulated 13-, 10- and 7-fold more gold from the nanoparticular form than from the ionic. The reverse situation was observed in absence of worms in the sediment, since digestive tract and gills accumulated 2.2- and 7.2-fold more gold from the ionic form than from the nanoparticular. This could be due to the fact that in presence of worms in the sediment, gold concentrations in the water column are 2-times higher in the case of the nanoparticular contamination than that of the ionic, with levels reaching 3.7 \pm 1.7 and 1.8 \pm 0.5 µg Au/L, respectively. Bioaccumulation of gold NPs in zebrafish embryos from the water column has already been demonstrated but at much higher contamination pressure such as 50 mg/L for 24h (Asharani et al, 2010) or 48h (Harper et al, 2011), and 5 mg/L for 120 h (Bar-Ilan, 2009). Therefore, we just have demonstrated that zebrafish could accumulate gold NPs from the water column at concentrations 1,350- and 13,500-times weaker than that described in the literature.

AchE activity modification

After 20 days of exposure to sediment contaminated with gold NPs at 14 and 56 mg/kg, and in tanks containing worms, AchE activity much increased in zebrafish muscles compared to control, reaching levels 6.7 and 6.2 greater than those recorded in control tissue, respectively. Usually, metallic contaminants inhibit AchE activity in zebrafish (lead, cadmium and mercury) (de Lima et al, 2013; Richetti et al, 2011). However, some articles mention an activation phenomenon. An increased AchE activity was observed in brain zebrafish exposed to uranium (Barillet et al, 2007), and in brain and white muscle of the Mediterranean bony fish *Sparus auratus* exposed for 20 days to sublethal cooper concentrations (100 or 500 ng/L) (Romani et al, 2007).

Genotoxicity results

In the present work, using quantitative RAPD-PCR, we looked at the creation or elimination of probe hybridization sites on genomic DNA of contaminated animals to control, along with modifications of PCR products' Tm profiles, which are effective parameters in detecting small changes in DNA sequences (Cambier et al, 2010). Results of RAPD-PCR emphasized the genotoxicity of gold NPs on worms, and showed modifications in the number of RAPD primers' hybridization sites in worm genomic DNA and in the frequency of PCR products generation. The only other article describing genotoxicity of metal NPs dispersed in the sediment is that showing a positive Comet test in *H. diversicolor* polychaetes exposed to 25 and 50 mg/kg of nanoparticular and micronic silver NPs for 10 days (Cong et al, 2011). Results of RAPD-PCR showed the genotoxicity of gold NPs on zebrafish. Citrate-capped gold NPs caused DNA damage in human HepG2 cells (Fraga et al, 2013), in *D. rerio* exposed by dietary route to 36 and 106 ng AuNPs/fish/day for 36 and 60 days (Geffroy et al, 2011). Studies have shown that gold NPs can alter genomic material by binding to DNA and causing conformational changes (Goodman et al, 2010). Some metallic NPs triggered genotoxicity in fish DNA such as silver NPs in medaka cells (Wise et al, 2010) and titanium NPs in rainbow trout cells (Vevers and Jha, 2008). Alteration effects on genomic materials caused by NPs are due to single mutations of genomic DNA caused directly (NPs binding to DNA) or indirectly (oxidative stress) because of ROS production, which can lead to DNA strand breaks, cross-linking and adducts of the bases or sugars (Cabiscol et al, 2000).

Gene expression modifications

The expression patterns observed in the present work indicate that gold NP exerted an influence on gene response. This is illustrated in brain from fish exposed to 14 mg Au/kg, where genes involved in oxidative stress (sod1 and 2) and mitochondrial respiration (cox I) displayed an increased expression in response to NPs compared to control and ionic gold exposures. In gills, ionic and nanoparticular exposures induced the up-regulation of the expression of genes involved in oxidative stress, mitochondrial metabolism and DNA repair. Gene expression alterations due to NPs in D. rerio have been investigated in studies. In zebrafish embryos, gold NPs disrupted the expression patterns of transcription factors regulating apoptosis, eye development and pigmentation (Kim et al, 2013), and silver NPs modified the expression of genes involved in oxidative phosphorylation and protein synthesis (Van Aerle et al, 2013). In adult zebrafish, dietary exposures to gold and cadmium sulfide NPs led to modulation in expression of genes involved in DNA repair, detoxication process, apoptosis, mitochondrial metabolism and oxidative stress (Geffroy et al, 2011; Ladhar et al, 2013).

Conclusion

The present study evaluated the effects of sediments spiked with gold NPs on invertebrate organism (tubificidae worms) exposed alone or in presence of a vertebrate organism (zebrafish). The study showed that gold NPs exposure led to various effects in worms and zebrafish including DNA alterations, AchE activity variation and gene expression level modifications. Moreover concentration pressures for zebrafish were below the detection limits when considering the bioavailable gold released in the water column. These results highlight the potential hazard of NPs to aquatic organisms. The exposure of both species impacted gold NPs toxicity. The presence of fish led to decreased gold accumulations in worms and modified worms' behavior, whereas the presence of worms was accompanied by increased gold accumulations in fish.

References

- Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveettil S. 2010. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. Nanotoxicology 5:43-54
- Avel M. 1959. Classe des Annélides Oligochètes. In Précis de Zoologie V, Paris.France .P.P. Grassé Masson(Ed).
- Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY.2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. Small 16: 1897- 1910
- Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A. 2007. Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium, Enviro Toxicol Chem 26 : 497-505
- Buffet PE, Amiard-Triquet C, Dybowska A, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C.2012 b. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. Ecotox Environ Safe 84: 191-198.
- Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012a. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). Environ Sci Technol 47: 1620-1628.
- Buffet PE, Tankoua OF, Pan JF, Berhanu D, Herrenknecht C, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Bérard JB, Risso C, Guibbolini M, Roméo M, Reip P, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere 84: 166-174.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol 3:3-8
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicol Environ Safe 73: 312-319
- Chapman PM , Farrel M A, Brinkhurst RO. 1982. Relative tolerance of selected oligochaetes to industrial polluants and environmental factors. Aquatic Toxicol. 2: 47-67.
- Cho WS, Kim S, Han BS, Son WC, Jeong J. 2009. Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. Toxicol Lett 191:96–102.
- Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, Yi J, Ryu DY. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquat Toxicol 100:151-159
- Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A. 2005. Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. Environ Toxicol Chem 24:1048-58
- Ciutat A, Boudou A. 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. Environ Toxicol Chem 22:1574-1581
- Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. 2011. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. Chem Soc Rev 40: 44-56
- Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE .2011. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. Aquat Toxicol. 105: 403-411.
- Daniel MC, Astruc D. 2003. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem Rev
- Daoud A ,Saud A , Sudhir K , Maqusood A , Maqsood AS. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail Lymnaea luteola L. Aquat Toxicol 124: 83 90
- Daughton CG. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. Environ Impact Asses Rev 24:711-32

- de Lima D, Roque GM, de Almeida EA. 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Mar Environ Res 91:45-51
- Dedeh A, Ciutat A, Treguer-Delapierre M, Bourdineaud JP. 2014. Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment. Natoxicology (in Press)
- Ferry JL, Graig P, Hexel C, Sisco P, Frey R, Pennington PL, Fulton MH, Scott IG, Decho AW, Kashiwada S. 2009. Transfer of gold nanoparticles from water column to the estuarine food web. Nature Nanotech 4:441-444
- Fisher JB, Lick WJ, McCall PL, Robbins JA. 1980. Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. J Geophys Res 85: 3997-4006.
- Fraga S, Faria H, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Pereira E, Costa-Pereira C, Teixeira JP, de Lourdes Bastos M, Carmo H.2013. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. J Appl Toxicol 33:1111-1119
- Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C. 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. Aquat Toxicol 86:333–340
- García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E. 2011. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. Environ Sci Tech 45:4630-4636.
- García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E.2011. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. Environ Sci Tech 45: 4630-4636.
- Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6:144-60
- Gérino M, Stora G, Durbec JP. 1994. Quantitative estimation of biodiffusive and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. Oceanol Acta 17:547-554.
- Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A, Bebianno MJ. 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel Mytilus galloprovincialis. Mar Environ Res 84:51-59
- Gonzalez E, Arbiol J, Puntes VF. 2011. Carving at the nanoscale: sequential galvanic exchange and kirkendall growth at room temperature. Science 334: 1377-1380
- Goodman CM, Chari NS, Han, G, Hong R, Ghosh P, Rotello VM. 2006. DNA binding by functionalized gold nanoparticles: mechanism and structural requirements. Chem Biol Drug Des 67:297–304
- Harper SL, Carriere JL, Miller JM, Hutchison JE, Maddux BL, Tanguay RL. 2011. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. ACS Nano 5:4688-97
- Henry AI, Bingham JM, Ringe E, Marks LD, Schatz GC, Van Duyne RP. 2011. Correlated structure and optical property studies of plasmonic nanoparticles. J Phys Chem C 115:9291-9305
- Hooper HL, Jurkschat K, Morgan AJ, Bailey J, Lawlor AJ, Spurgeon DJ, Svendsen C. 2011. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. Environ Int 37:1111–1117.
- Howard CV. 2004. Small particles big problems. Int Lab News 34:28-9
- Hu CW, Li M, Cui YB, Li DS, Chen J, Yang LY. 2010. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biol Biochem 42:586–91.
- Jackson BP, Bugge D, Ranville JF, Chen CY. 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ Sci Tech 46: 5550-5556
- Keller A, Wang H, Zhou D, Lenihan H, Cherr G, Cardinale B, Miller BJiZ. 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. Environ Sci Technol 44:1962–1967.
- Kim KT, Zaikova T, Hutchison JE, Tanguay RL. 2013. Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation. Toxicol Sci 133:275-288
- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ Toxicol Chem 27: 1825-1851
- Kool PL, Ortiz MD, vanGestel CAM. 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nanoZnO and ZnCl2 to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil.Environ Pollut 159:2713–2719.
- Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Durand E, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2013. Impact of dietary cadmium sulfide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure. Natoxicology 8:676-85
- Leynen M, Van den Berckt T, Aerts JM, Castelein B, Berckmans D, Ollevier F. 1999. The use of Tubificidae in a biological early warning system. Environ Pollut 105: 151-154

- Li Y, Yu S, Wu Q, Tang M, Pu Y, Wang D. 2012. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. J Hazard Mater 219: 221-230
- Maire O, Lecroart P, Meysman F, Rosenberg R, Duchêne JC, Grémare A. 2008. Quantification of sediment reworking rates in bioturbation research: a review. Aquat Biol 2: 219–238
- McCall PL, Fisher JB. 1980. Effects of tubificid oligochetes on physical and chemical proprieties of Lake Erie sediments. Aquatic oligichates biology .New York .USA. eds R.O.Brinkhurst and D.G.Cook. Plenum Press
- Méndez-Fernández L, Martínez-Madrid M, Rodriguez P. 2013. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. Ecotoxicology 22: 1445-60.
- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, Comte G, Grossi V, Fourel F, Lecuyer C, Simon L. 2013. Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. Sci Total Environ 450-451:230-41.
- Moore MN, Allen JI. 2002. Acomputational model of the digestive gland epithelial cell of the marine mussel and its simulated responses to aromatic hydrocarbons. Mar Environ Res 54:579-84
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard P. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat Res 552:247–68
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP. 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol Environ Safe 74: 974-983.
- Oughton DH, Hertel-Aas T, Pellicer E, Mendoza E, Joner EJ. 2008. Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. Environ Toxicol Chem 27:1883–7.
- Pang C, Selck H, Misra SK, BerhanuD ,Dybowska A, Valsmai-Jones E, Forbes V. 2012. Effects of sedimentassociated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: a comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. Aquat Toxicol 106–107,114–122.
- Petersen EJ, Huang Q, Weber WJ. 2008 a. Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. Environ Health Perspect 116:496–500.
- Petersen EJ, Huang QG, Weber WJ.2008 b. Bioaccumulation of radio-labeled carbon nanotubes by *Eisenia foetida*. Environ Sci Technol 42:3090–5.
- Rhoads DC. 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. Oceanogr Mar Biol Ann Rev 12: 263-300.
- Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD. 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. NeuroToxicology 32:116-122
- Romani R, Antognelli C, Baldracchini F, De Santis A, Isani G, Giovannini E, Rosi G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chem Biol Interact 145:321-329
- Stanley JK, Coleman JG, Weiss CA Jr, Steevens JA. 2010. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. Environ Toxicol Chem 29: 422-9
- Tedesco S, Doyle H, Redmond G, Sheehan D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. Mar Environ Res 66:131–133
- Unrine JM, Tsyusko OV, Hunyadi SE, Judy JD, Bertsch PM. 2010. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to copper nanoparticles. J Environ Qual 39:1942–53.
- van Aerle R, Lange A, Moorhouse A, Paszkiewicz K, Ball K, Johnston BD, de-Bastos E, Booth T, Tyler CR, Santos EM. 2013. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. Environ Sci Technol 47:8005-14.
- Verma S, Das S, Khangarot BS. 2011. Toxicity of metallic oxides nanoparticle suspensions to a freshwater sludge worm *Tubifex tubifex* Müller. J Biomed Nanotechnol 7: 216-7
- Vevers WF, Jha AN. 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. Ecotoxicology 17: 410–20.
- Warren LA, Tessier A, Hare L. 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. Limnol Oceanogr 43: 1442-1454.
- Wise JP Sr, Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongan AF, Walter RB, Thompson WD, Ng AK, Aboueissa AM, Mitani H, Spalding MJ, Mason MD. 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat toxicol 97:34-41

Supplementary materials :

Suppleme	entary table S1. E	xperimental system	ems			
Conditio	Uncontaminate	AuNPs	AuNPs	Uncontaminate	Ionic gold	Ionic gold
ns	d sediment	contaminated	contaminated	d sediment	contaminated	contaminated
		sediment	sediment		sediment	sediment
		concentration	concentration		concentration	concentration
		1: 14 mg/kg	2: 56 mg/kg		1: 14 mg/kg	2: 56 mg/kg
	$C_0 NPs$	$C_1 NPs$	C_2NPs	C ₀ IAu	C ₁ IAu	C ₂ IAu
No	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates
animals	5 replicates	5 replicates	5 replicates	5 replicates	5 replicates	5 replicates
[No]						
Worms	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates	3 replicates
[W]						
Worms	5 raplicates	5 raplicates	5 raplicates	5 replicates	5 raplicates	5 replicates
and Fish	5 Tepheates	5 Tepficates	5 replicates	JTephcates	5 Tepheates	5 replicates
[WF]						

226

Function	Gene name	Accession number	Primer (5'-3')
Cytoskeleton	bactin1	NM 131031	AAGTGCGACGTGGACA ^a
support		—	GTTTAGGTTGGTCGTTCGTTTGA ^b
Mitochondrial	corl	NC 002333	GGAATACCACGACGGTACTCTª
metabolism	COM	110_002333	AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
Oxidative stress	sodl	BC055516	TGAGACACGTGGGAGACCª
Oxidative stress	5041	DC035510	TGCCGATCACTCCACAGG ^b
	sod mt	CB923500	ATGGCTTTAACATAGTCCGGT ^a
			TTCAGGGCTCAGGCTGG ^b
	hsp70	AB062116	CCAGGGAGTTTTTAGCAGAAA ^a
	1		CATCGACGCCAACGGG ^b
DNA repair	gaad	BC059472	CTTCCCGCATTCAGCGAT ^a
-	0		GCTTGTTCGTGTCTTCTGTGG ^b
	rad51	BC062849	GCCTCGGCCTCTGGTAA ^a
			TGCTGCGTCTCGCTGA ^b
Neurotransmission	achE	NM_131846	GTTAAGCAGACGAGGC ^a
		—	CCCGCATGGTAATCC ^b

Supplementary table S2. Role, accession numbers and specific primer pairs for the selected *D. rerio* genes.

Abbreviations: mt – metallothionein; coxI – cytochrome C oxidase subunit I; sodI- superoxide dismutase; sod(mt) – mitochondrial superoxide dismutase; Hsp70- heat shock protein; gadd – growth-arrest-DNA-damage; AchE-Acetyl-Cholinesterase. ^aUpstream primer, ^bForward primer.

Supplementary table S3.	Ratio of hybridization sites per genome unit of RAPD probes of
contaminated exposure per	control, after RAPD-PCR performed on individual genomic DNA
from control and contamina	ated worms and fish.

primers	C ₁ NPs	C_2NPs	C ₁ IAu	C ₂ IAu			
	14 mg/kg	56 mg/kg	14 mg/kg	56 mg/kg			
		Worms expos	sed alone				
OPB7	1/7*	2	=	=			
OPA9	$0^{*^{\mu}}$	2^{b}	1/12*	1/14*			
Worms exposed with fish							
OPB7	2^{ab}	2 ^b	2	1/16*			
OPA9	3 ^a	3 ^b	2* ^a	1/14*			
		Fish exposed v	with worms				
OPB7	=	=	1/4*	2* ^a			
OPB11	3	1/3 ^b	1/4*	6*			

Results are mean \pm SEM (n = 10). The relative number of hybridization sites of a RAPD probe is defined as the ratio of the total hybridization sites of the RAPD probe over 28S ribosomal gene copies number and are represented by the ratio of hybridization sites in worm cultured in the indicated contaminated exposures over that of worms cultured in uncontaminated sediment, as assessed by the Mann-Whitney U-test p < 0.05; * indicate statistical significant difference with worms control units ,^a Statistically significant values compared with worms alone units, ^b Statistically significant values compared to ionic Au exposure. ^{μ} at C₁ 14 mg/kg Nano Au exposure, with OPA9 probe, Ct values were superior to negative control used without DNA which creates a total loss of hybridization sites.

OPB7						
		AuNPs			Ionic Au	
Temperature (°C)	C ₀ NPs	C ₁ NPs	C ₂ NPs	C ₀ IAu	C ₁ IAu	C ₂ IAu
I1 [69-76[0	0	0	0	0	0
I2 [76-77[0	0	0	0.4	0*	0*
I3 [77-80[0	0	0	0	0	0
I4 [80-81[0.5	0.7	0*	0	0	0
I5 [81-82[0.4	0.2	0.5	0.4	0*	0*
I6 [82-83[0.5	0*	0.3	0.2	0	0
I7 [83-84[0	0	0.2	0	0	0
I8 [84-85[0.1	0.4	0.4	0.9	1	1
I9 [85-86[0.4	0.2	0.3	0.1	0	0
I10 [86-87[0.2	0.1	0.1	0.1	0	0
I11 [87-88[0	0.1	0.2	0	0	0
I12 [88-89[0	0.1	0	0	0	0
		(OPA9			
I1 [69-79[0	0	0	0	0	0
I2 [79-80[0.1	0.6*	0	0.3	0	0.1
I3 [80-81[0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3
I4 [81-82[0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.1
I5 [82-83[0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
I6 [83-84[0.4	0.5	0.2	0.5	0.4	0.1*
I7 [84-85[0.2	0.4	0.5	0.3	0.2	0.5
I8 [85-86[0.4	0.2	0.4	0.4	0.5	0.1*
I9 [86-87[0.1	0	0	0.3	0	0.2
I10 [87-88[0.2	0	0	0.1	0.2	0.1
I11 [88-89[0.1	0	0	0	0	0
I12 [89-90[0.2	0.1	0	0	0	0.1

Supplementary table S4. Frequency according to the temperature intervals(C°) to which their Tm belong of the PCR products obtained with OPB7 and OPA9 on 10 individual genomic DNAs from worms exposed alone^a

*represents the temperature ranges for which the frequency of occurrents of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls. ^a (n = 10) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05

OPB7						
	Au NPs				Ionic Au	
Temperature (°C)	C ₀ NPs	C ₁ NPs	C ₂ NPs	C ₀ IAu	C ₁ IAu	C ₂ IAu
I1 [69-76[0	0	0	0	0	0
I2 [76-77]	0.3	0.3	0	0.1	0	0
I3 [77-81]	0	0	0	0	0	0.1
I4 [81-82[0.5	0.3	0.7	0	1*	0.2
I5 [82-83[0.3	0.2	0	0	0	0
I6 [83-84[0.2	0.2	0.1	0	0	0.2
I7 [84-85[0.3	0.8*	0.8*	1	1	0.5*
I8 [85-86[0.3	0	0.1	0.1	0	0.2
I9 [86-87[0	0.1	0.3	0	0	0.2
I10 [87-88[0.2	0.2	0.2	0	0	0.2
I11 [88-89[0.1	0.1	0	0	0	0
I12 [89-90[0	0.2	0	0	0	0.1
		C)PA9			
I1 [69-70[0	0	0	0	0.3	0
I2 [70-71[0	0	0	0	0	0
I3 [71-72[0	0	0	0.5	0*	0*
I4 [72-73[0	0	0	0	0	0
I5 [73-74[0	0	0	0	0.2	0
I6 [74-75[0	0	0	0	0	0.1
I7 [75-76[0	0	0	0.3	0.1	0
I8 [76-77[0	0	0	0	0.2	0
I9 [77-78[0.1	0	0	0	0	0
I10 [78-79[0	0	0	0	0.1	0.1
I11 [79-80[0.4	0*	0*	0	0.1	0
I12 [80-81[0.1	0	0.2	0.2	0	0.1
I13 [81-82[0.1	0	0.2	0.2	0	0.1
I14 [82-83[0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3
I15 [83-84[0.5	0.4	0.4	0.6	0.7	0.3
I16 [84-85[0.4	0.4	0.5	0.3	0.1	0.5
I16 [85-86[0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0
I17 [86-87[0.3	0.3	0.1	0.4	0.8*	0.3
I18 [87-88[0.1	0.2	0.3	0	0	0
I19 [88-89[0.1	0.1	0	0	0	0
I20 [89-90]	0	0.1	0.1	0	0.3	0

Supplementary table S5. Frequency according to the temperature intervals(C°) to which their Tm belong of the PCR products obtained with OPB7 and OPA9 on 10 individual genomic DNAs from worms exposed in presence of fish^a

*represents the temperature ranges for which the frequency of occurrents of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls. ^a(n = 10) as

Supplemantary table S6. Frequency according to the temperature intervals(C°) to which their Tm belong of the PCR products obtained with OPB7 and OPB11 on 10 individual genomic DNAs from fish ^a

OPB7						
		AuNPs			Ionic Au	
Temperature (°C)	C ₀ NPs	C ₁ NPs	C ₂ NPs	C ₀ IAu	C ₁ IAu	C ₂ IAu
I1 [69-76[0	0	0	0	0	0
I2 [76-80[0	0	0	0.1	0.4	0.4
I3 [80-81[0.3	0.2	0.3	0.7	0.6	0.7
I4 [81-82[0.6	0.8	0.7	0	0	0
I5 [82-83[0	0	0	0	0.3	0.6*
I6 [83-84[0.2	0.9*	0.3	0.5	0.4	0.2
I7 [84-85[0.4	0*	0.6	0.3	0.3	0.3
I8 [85-86[0.2	0.1	0.1	0.7	0.6	0.7
I9 [86-87[0.5	0.8	0.7	0	0	0
I10 [87-88[0.4	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1
I11 [88-89[0.4	0.7	0.9*	0	0	0
I12 [89-90[0	0	0	0	0	0
		Ol	PB11			
I1 [69-70[0	0	0	0	0	0
I2 [70-71[0	0	0	0	0	0
I3 [71-72[0	0	0	0	0.1	0
I4 [72-73[0	0	0	0	0	0
I5 [73-74[0	0	0	0	0	0
I6 [74-75[0	0	0	0	0	0
I7 [75-76[0	0	0	0	0.1	0
I8 [76-77[0.1	0	0	0.1	0	0
I9 [77-78[0	0	0	0.2	0.1	0
I10 [78-79[0.1	0.3	0	0	0.2	0.1
I11 [79-80[0.2	0.6*	0.5	0.4	0.1	0*
I12 [80-81[0.5	0.1*	0.3	0.1	0.2	0
I13 [81-82[0	0.1	0	0	0.2	0
I14 [82-83[0.7	0*	0.4	0.7	0*	0.3*
I15 [83-84[0.2	0.8*	0.4	0	0.1	0
I16 [84-85[0	0.1	0.4*	0	0.1	0
I16 [85-86[0.5	0.6	0.2	0.8	0.2*	1
I17 [86-87[0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0
I18 [87-88[0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0
I19 [88-89[0	0	0	0	0	0
120 [89-90]	0	0	0	0	0	0

* represents the temperature ranges for which the frequency of occurrents of peaks discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls. ^a(n = 10) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05

Supplementary table S7. Differential gene expressions in various tissues from contaminated fish after 20 days of gold exposure.

Ticene	Genes	Control	C ND ₂	C IAn	C ND ₂	C IAn
Drain	Utilts	Collubi	C ₁ INF S	C ₁ IAu	C ₂ INF 5	C ₂ IAu
Dialm	1	0.04 + 0.02	0.05* + 0.2	0.41 + 0.07	0.07 + 0.05	0.2 + 0.1
Oxidative stress	sod	0.24 ± 0.02	$0.85^{+} \pm 0.2$	0.41 ± 0.06	$0.3 / \pm 0.05$	0.3 ± 0.1
	sod mt	0.15 ± 0.02	0.48 ± 0.16	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.21 ± 0.04
Mitochondrial	coxl	39 ± 10.1	$447* \pm 175$	49.5 ± 3.5	$94.4* \pm 9.8$	59 ± 3.3
metabolism						
Detoxification	mt2	0.32 ± 0.1	0.4 ± 0.11	0.51 ± 0.09	0.56 ± 0.23	0.43 ± 0.07
	hsp	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.009 ± 0.0008	$0.007 * \pm 0.001$	$0.007* \pm 0.0008$
DNA repair	gaad	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.005	0.04 ± 0.007	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.006
	rad51	0.04 ± 0.005	0.03 ± 0.01	$0.01* \pm 0.003$	0.03 ± 0.01	$0.01* \pm 0.002$
Neurotransmission	achE	0.33 ± 0.13	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.006
Biological clock	clock1	0.28 ± 0.06	$0.04* \pm 0.005$	$0.03* \pm 0.003$	$0.02* \pm 0.008$	$0.02* \pm 0.004$
	clock3	0.14 ± 0.04	$0.03* \pm 0.01$	$0.04* \pm 0.005$	0.05 ± 0.02	0.23 ± 0.15
Gills						
Oxidative stress	sod	0.04 ± 0.004	$0.32* \pm 0.08$	$0.16^* \pm 0.01$	$0.22* \pm 0.02$	$0.09^{*ab} \pm 0.01$
	sod mt	0.02 ± 0.008	0.05*+0.008	0.06 *+ 0.008	0.04 ± 0.007	0.07*+0.02
Mitochondrial	cor1	2.81 ± 0.33	11 3* + 2 42	753 *+ 0.29	$13.3* \pm 0.73$	$6^{*a} + 0.8$
metabolism	0011	2.01 ± 0.00	11.3 ± 2.72	1.55 ± 0.25	15.5 ± 0.75	0 ± 0.0
Detoxification	mt2	0.01 ± 0.002	0.39 ± 0.23	0.06 ± 0.01	$0.16^{*} \pm 0.01$	0.02 ± 0.003
	hsp	0.0006 ± 0.0001	0.004 ± 0.002	$0.003* \pm 0.0003$	$0.001* \pm 0.0001$	$0.003^{*a} \pm 0.0003$
DNA repair	gaad	0.009 ± 0.002	$0.03* \pm 0.01$	0.018 *± 0.002	0.1 ± 0.05	$0.03* \pm 0.008$
1	rad51	0.0008 ± 0.0002	$0.005^* \pm 0.0009$	0.007 *± 0.0007	$0.003^* \pm 0.001$	$0.005^* \pm 0.001$
Neurotransmission	achE	0.008 ± 0.001	0.018 ± 0.007	$0.002 *^{a} \pm 0.0006$	0.007 ± 0.0005	0.004 ± 0.001
Biological clock	clockl	0.008 ± 0.001	0.08 ± 0.003	0.003 ± 0.0004	$0.09*\pm0.01$	$0.002^{*a} \pm 0.0003$
Diorogicui croch	clock?	$0.00096 \pm$	0.01*+0.0004	$0.005^{*a} + 0.0001$	0.009 ± 0.003	$0.0002^{a} + 0.00005$
	0100112	0.0003	0.01 - 0.0001	0.000 - 0.0001	0.0009 - 0.0005	0.0002 - 0.00000
	clock3	0.0005 ± 0.001	0.01*+0.001	0.005 ± 0.0008	0.01*+0.003	$0.002*^{a} + 0.0003$
Digasting tract	ciocks	0.005 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.005 ± 0.0000	0.01 ± 0.005	0.002 ± 0.0005
Oridativa strass	sod	0.50 ± 0.13	$0.00* \pm 0.01$	0.33 ± 0.06	0.20 ± 0.13	0.53 ± 0.04
Oxiduitive stress	sou and mt	0.39 ± 0.13	$0.09^{\circ} \pm 0.01$	0.33 ± 0.00	0.29 ± 0.13	0.53 ± 0.04
	soa mi	0.18 ± 0.01	$0.02^{+} \pm 0.004$	0.12 ± 0.02	$0.03^{\circ} \pm 0.03^{\circ}$	0.19 ± 0.01
Mitochonariai	COXI	21.4 ± 5.2	$1.05^* \pm 0.28$	$2.5/* \pm 0.8$	10.2 ± 6.82	$6.75^{*} \pm 1.2$
metabolism		1.05 + 0.00	0.05 + 0.10	0.1.44 . 0.01	0.000	0.0**
Detoxification	mt2	1.05 ± 0.28	0.35 ± 0.13	$0.14^* \pm 0.01$	0.06 ± 0.002	0.2*± 0.07
	hsp	0.004 ± 0.001	0.002 ± 0.0006	0.02 ± 0.008	0.002 ± 0.001	0.01 ± 0.003
DNA repair	gaad	0.04 ± 0.002	0.004 ± 0.001	$0.01* \pm 0.002$	0.015 ± 0.008	0.06 ± 0.02
	rad51	0.003 ± 0.0004	$0.01* \pm 0.001$	$0.01* \pm 0.002$	0.002 ± 0.0007	$0.02* \pm 0.003$
Neurotransmission	achE	0.01 ± 0.001	$0.0003* \pm 0.0001$	0.009 ± 0.004	0.006 ± 0.0009	$0.002^* \pm 0.0004$
Biological clock	clock1	0.002 ± 0.0003	$0.0003^{*}\pm 0.0001$	0.003 ± 0.0007	$0.02^{*b} \pm 0.006$	0.021 ± 0.008
	clock2	0.0008 ± 0.0001	0.001 ± 0.0003	0.0008 ± 0.0001	0.002 ± 0.001	0.0006 ± 0.0002
	clock3	0.005 ± 0.002	$0.0003^* \pm 0.0001$	$0.001^{\ast a} \pm 0.0001$	0.006 ± 0.002	0.001 ± 0.0004
Transporter	lapmt	0.14 ± 0.05	$0.03* \pm 0.001$	$0.03^{*}\pm 0.0002$	$0.01^{*b} \pm 0.005$	$1.8 \pm 0.14 \ .10^{-6} *$
Muscle						
Oxidative stress	sod	0.40 ± 0.13	0.36 ± 0.1	0.37 ± 0.04	0.2 ± 0.13	0.25 ± 0.03
	sod mt	4 ± 1.17	$0.48* \pm 0.08$	$0.46^* \pm 0.07$	$0.66* \pm 0.2$	$0.42* \pm 0.02$
Mitochondrial	coxI	598 ± 184	$183* \pm 65.1$	$165^* \pm 25.2$	$162* \pm 85$	$147* \pm 3.04$
metabolism					-	
Detoxification	mt2	0.6 ± 0.15	$0.06* \pm 0.004$	$0.2^* \pm 0.02$	0.39 ± 0.15	$0.07* \pm 0.01$
- crongrounon	hsp	0.02 ± 0.001	$0.1* \pm 0.03$	$0.008^{*a} + 0.003$	0.02 ± 0.008	$0.06^{b} \pm 0.003$
DNA renair	annd	0.02 ± 0.001 0.16 ± 0.03	0.008* + 0.002	0.000 ± 0.000	0.02 ± 0.000 $0.002 *^{b} + 0.0001$	0.00 ± 0.003
ыл терші	guuu rad51	0.10 ± 0.03 0.01 ± 0.0001	0.000 ± 0.002 $0.003* \pm 0.0004$	0.21 ± 0.07 0.02 ± 0.002	0.002 ± 0.0001	0.00 ± 0.007 $0.003 * \pm 0.0000$
Nouvotvanamiasion	ruus i ach E	0.01 ± 0.0001 0.48 ± 0.01	$0.003^{\circ} \pm 0.0000$	0.02 ± 0.002	$0.001^{\circ} \pm 0.0001^{\circ}$	$0.003^{\circ} \pm 0.0009^{\circ}$
Neuroiransmission	acne	0.40 ± 0.01	$0.3/\pm 0.12$	$0.11^{\circ} \pm 0.000$	$0.13^{\circ} \pm 0.01$	0.24 ± 0.03
Biological clock	CIOCKI	$0.3 / \pm 0.13$	$0.01^{*} \pm 0.001$	$0.03^{*} \pm 0.01$	0.02 = 0.008	$0.02^{+} \pm 0.00^{-}$
	clock3	0.1 ± 0.03	$0.02^* \pm 0.003$	0.04 ± 0.01	$0.02^* \pm 0.002$	$0.02^* \pm 0.003$

The differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in fish cultured in the indicated contaminated conditions over that of fish cultured in uncontaminated conditions (mean, n = 5).* Statistically significant differential expression compared with control (p < 0.05).^a Statistically significant differential expression compared with C₂ condition. ^b Statistically significant differential expression compared with AuNPs condition.



Supplementary figure S1. Evolution of turbidity in the water column over time 'a and b corresponded to Au NPs and ionic Au exposures, respectively'. The experimental conditions were as follows: [No]: EUs without animals; [W]: EUs with worms; [WF]: EUs with worms and fish. Control exposures were C_0NPs and C_0IAu . Contaminated exposures were C_1NPs : contaminated sediment (14 mg AuNps/kg), C_2 NPs: contaminated sediment (56 mg AuNPs/kg), C_1IAu : contaminated sediment (14 mg KAuCl₄/kg) and C_2IAu contaminated sediment (56 mg KAuCl₄/kg). Mean ± SE; n = 3, 5.



Supplementary figure S2. Gold concentration in unfiltered water column in the different during 20 days of contamination. The experimental conditions were as follows: [No]: EUs without animals; [W]: EUs with worms; [WF]: EUs with worms and fish. Control exposures were C₀NPs and C₀IAu. Contaminated exposures were C₁NPs: contaminated sediment (14 mg AuNps/kg), C2 NPs: contaminated sediment (56 mg AuNPs/kg), C1IAu: contaminated sediment (14 mg KAuCl₄/kg) and C₂IAu contaminated sediment (56 mg KAuCl₄/kg). mean \pm SD; n =3, 5.



Supplementary figure S3. Vertical profiles of gold measured in the particulate fractions of the sediment after 20 days of Au NPs exposure. The experimental conditions were as follows: [No]: EUs without animals; [W]: EUs with worms; [WF]: EUs with worms and fish. Control exposures were C₀NPs and C₀IAu. Contaminated exposures were C₁NPs: contaminated sediment (14 mg AuNps/kg), C₂ NPs: contaminated sediment (56 mg AuNPs/kg). (Mean; n = 3, 4). *Asterisks indicate a significant differential gold concentrations compared to C₂NPs [W] and [WF].



Supplementary figure S4. Bioturbation activity of worms under exposure to Au NPs. Shown are vertical profiles of particulate fluorescent tracers in the sediment after 20 days. The experimental conditions were as follows: [No]: EUs without and mals; [W]: EUs with worms; [WF]: EUs with worms and fish. Control exposures were C_0NPs and C_0IAu . Contaminated exposures were C_1NPs : contaminated sediment (14 mg Au Nps/kg), C_2NPs : contaminated sediment (56 mg AuNPs/kg).

D. APPROCHE MULTI-CONTAMINANTS ET MULTI-ORGANISMES

Altérations génomiques provoquées par des concentrations polymétalliques environnementales chez la palourde *Ruditapes philippinarum* et les vers polychètes *Hediste diversicolor*.

Nous avons exposé des palourdes (Ruditapes philippinarum) et des vers aquatiques (Hediste diversicolor) à des concentrations écologiquement pertinentes de deux mélanges de métaux contenant chacun trois métaux bivalents (C_1 en $\mu g/L$: Cd:1, Hg:0,1 et Pb:4) et (C_2 en μ g/L: Cd:17, Hg:1,1,et Pb:55). Les animaux ont été exposés pendant huit jours dans des microcosmes constitués d'un biotope mixte : colonne d'eau et sédiment marin naturel. Les mélanges de métaux C_1 et C_2 imité les concentrations de métaux minimales et maximales observées à la baie Skikda, Algérie. L'analyse de bioaccumulation a montré une augmentation significative de Cd, Hg et Pb chez les palourdes, en particulier à la concentration C_2 dans la colonne d'eau atteignant 2,3 ± 0,3 µg Cd/g, de 0,7 ± 0,2 µg Hg/g et 45 µg Pb/g (poids sec) dans le corps moux des plaourdes. Les altérations de l'ADN et la régulation du gène mitochondrial (cox1) ont également été observées dans les branchies des palourdes exposées aux mélanges de métaux. L'altération de l'ADN et l'augmentation significative des concentrations de cadmium et de mercure ont *été observées chez les vers exposés au mélange métallique* C_2 *atteingant* 0.5 ± 0.1 $\mu g Cd/g et 2 \pm 0.6 \mu g Hg/g$ (poids sec).

DNA alterations triggered by environmentally relevant polymetallic concentrations in marine clams *Ruditapes philippinarum* and polychaete worms *Hediste diversicolor*

Amina Dedeh, Aurélie Ciutat, Damien Tran, Jean-Paul Bourdineaud

University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station,

Place du D^r Peyneau, 33120 Arcachon, France

Amina Dedeh: <u>a.dedeh@epoc.u-bordeaux1.fr</u>

Tel. : +33 556 223 930; fax: +33 556 549 383

Aurélie Ciutat: <u>a.ciutat@epoc.u-bordeaux1.fr</u>

Damien Tran: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr

Corresponding author:

Jean-Paul Bourdineaud: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

Phone: (+33) 5 56 22 39 26; Fax: (+33) 5 56 83 51 04

Les résultats de cette étude ont été acceptés pour publication au journal Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Avril 2014)

Abstract

We exposed marine clams (*Ruditapes philippinarum*) and aquatic worms (*Hediste diversicolor*) to environmentally relevant concentrations of two metal mixtures each containing three divalent metals (C₁ in μ g/L: Cd: 1, Hg: 0.1, and Pb: 4) and (C₂ in μ g/L: Cd: 17, Hg: 1.1, and Pb: 55). Animals collected in the Arcachon Bay were exposed for eight days in microcosms made up of a mixed biotope consisting of a water column and natural marine sediment both taken up from the Arcachon Bay. Bioaccumulation analysis showed a significant increase of Cd, Hg and Pb in clams, particularly at C₂ concentration in the water column reaching in soft body 2.3 \pm 0.3 μ g Cd/g, 0.7 \pm 0.2 μ g Hg/g and 45 μ g Pb/g; dry weight. DNA alterations and up-regulation of the *cox1* mitochondrial gene were also observed in clam's gill after exposure to metals blend. For worms exposed to the C₂ metal blend, DNA alterations and significant increase of Cd and Hg concentrations were observed reaching 0.5 \pm 0.1 μ g Cd/g and 2 \pm 0.6 μ g Hg/g ; dry weight.

Keywords: metal mixture; bioaccumulation; genotoxicity; gene expression; sediment-water interface

1. Introduction

Among the many contaminants released into Skikda bay in Algeria, due to the industrial nature of the oil refineries adjacent to the city, are metals. These create significant marine pollution (Kehal et al. 2004; Nafissa et al. 2005) that may affect the aquatic environment through their potential toxicity to various ecosystem inhabitants, including humans, animals and plants.

Metals may accumulate in aquatic species, such as bivalves, at concentrations several times higher than concentrations in water and sediment due to the ability of these animals to filter large quantities of particles including contaminants, from the seawater, sediment or food. Consequently, clams Ruditapes philippinarum, commonly known as Manila clams, are used as sentinel organisms in monitoring programs assessing anthropogenic pressure, such as metal pollution (Ramos-Gómez et al. 2011; Roméo and Gnassia-Barelli 1997; Smaoui-Damak et al. 2009; Wang et al. 2012). Polychaetes comprise an important proportion of the total biomass of deposit-feeding aquatic benthic invertebrates and are key species of the benthic community in coastal and estuarine sediments. The sediment-dwelling ragworm, Hediste diversicolor, is known to play a crucial role in the fate of chemicals in estuarine areas as a consequence of its relative tolerance and its influence on metal speciation through bioturbation, particle mixing and irrigation (Banta and Andersen 2003; Berthet et al. 2003; Mouneyrac et al. 2003). H. diversicolor is thus an appropriate test organism for examining the fate and effects of metal in sediment systems. Its range extends from the Baltic Sea and North Sea southwards to the Azores and Mediterranean Sea.

Metal genotoxicity has been investigated in bivalve species using various methodologies such as the comet assay, micronucleus assay, 8-oxoguanosine quantification and random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology in clam species *Ruditapes decussatus* (Jebali et al. 2006) and *R. philippinarum* (Sacchi et al. 2013), and in mussel species *Mytilus galloprovincialis* (Bolognesi et al. 1999) and *Mytilus edulis* (Emmanouil et al. 2007; Pruski and Dixon 2002). A drawback of these *in situ* studies is that they cannot link genotoxic

outcomes with precisely identified pollutants, especially when a natural environment is polluted with several heavy metals and hydrocarbons (Jebali et al. 2006; Sacchi et al. 2013). The micronucleus assay detected the onset of genotoxicity in *M. galloprovincialis* gill cells at 40 μ g/L of divalent copper chloride, and 32 μ g/L of mercury chloride, but showed no effect at a cadmium chloride concentration as high as 184 μ g/L (Bolognesi et al. 1999). The comet assay showed DNA damage in the digestive gland of *M. edulis* after 10 days of exposure to 200 μ g/L cadmium and 10 μ g/L hexavalent chromium, corresponding to accumulated concentrations of 39 ± 11 μ g Cd/g wet tissue and 2.7 ± 2.9 μ g Cr/g wet tissue (Emmanouil et al. 2007). On the contrary, the comet assay showed no effect of Cd in the same organism exposed to 200 μ g/L for 4 weeks (Pruski and Dixon 2002). Thus, there are some discrepancies linked to the genotoxic effects of cadmium in mussel species.

In the present study, we assessed the genotoxic potential of polymetallic blends each containing three divalent metals (cadmium, lead and mercury). The aim was to assess the impact of environmentally relevant contamination such as those encountered in the Skikda bay on two marine organisms, marine clams (*R. philippinarum*) and aquatic worms (*H. diversicolor*), to two metal mixtures. Animals collected in the Arcachon Bay were exposed for eight days in microcosms made up of a mixed biotope consisting of a water column and natural marine sediment both taken up from the Arcachon Bay. Metal concentrations corresponded to the minimal and maximal observed *in situ* in Skikda bay (Kehal et al. 2004). Metal accumulation was investigated in both animals, worms and clams (soft body and gill), whereas DNA alterations and gene expression modification with the water, it constitutes the main target organ for metal uptake and accumulation, and therefore more susceptible to present gene expression modifications.

2. Materials and methods

The experiment was conducted in the laboratory at fall 2010 using glass aquaria of 12 x 12 x 24 cm containing a bottom layer of 7 cm sediment and filled with 2 L of sea water (Arcachon bay, France). Water temperature was $16 \pm 0.9^{\circ}$ C, a salinity 33.5 \pm 0.6 ‰, and pH 7.65 \pm 0.8. The experimental units were permanently aerated by air bubbling in the superficial layers of the water column in order to produce an oxygen-saturated environment and exposed to a 12 h:12 h light:dark regime. The inside aquaria walls were lined with plastic to avoid metal adsorption and contamination. The sediment used was collected in eastern Arcachon bay, in Graveyron (N 44° 42' 21", W 0° 57' 12", France) and was homogenized and sieved through a 2.5 mm mesh. Background metals concentrations were 0.52 \pm 0.007, 0.095 \pm 0.07 and 1.85 \pm 0.20 µg/g (dw) (mean \pm SD) for cadmium, mercury and lead, respectively.

We used two species: a bivalve (R. philippinarum) collected Fall 2010 at the entry to Arcachon bay, the Banc d'Arguin (N 44° 39' 50", W 1° 9' 51", France), $(30.6 \pm 2.7 \text{ mm shell length; mean} \pm \text{SD})$ and a polychaete worm (*H. diversicolor*) collected in Fall 2010 from the natural sediment at Graveyron (57.0 \pm 3.4 mm length; mean \pm SD). It was essential to use the same sediment (that of Arcachon bay) not to disrupt natural style of life of animals. The animals were introduced into the experimental units (EUs) at least one week after sediment and water settling to allow physico-chemical stabilization and acclimated for 24h before metals addition. The experimental conditions were as follows: EUs with clams only, EUs with worms only, and EUs without animals. To mimic the contamination levels in Skikda Bay, the water column was contaminated for eight days with two metal mixtures containing cadmium (Cd), mercury (Hg) and lead (Pb) chlorides. The contamination levels were: a control condition C_0 , a first nominal contamination level (C_1 in μ g/L: Cd: 1, Hg: 0.1, and Pb: 4) and a second nominal contamination level (C₂ in µg/L: Cd: 17, Hg: 1.1, and Pb: 55). C₁ and C₂ mimic the lowest and the highest metal concentrations observed in Skikda bay, respectively (Kehal et al. 2004). Water analyses were impossible to perform for Cd and Pb because it was necessary to dilute the seawater samples in order to avoid the Zeeman quenching effect due to sodium chloride. After a 15-fold dilution of water samples, and since the Cd and Pb concentrations were low, it appeared that metal concentrations were below the threshold of the Solaar spectrophotometer (0.1 µg Cd/L and 20 µg Pb/L). Indeed, in order to assay Cd and Pb in water samples, it was necessary to get salinity below or equal to 2.2 ‰ in water sample (original salinity was 33%). Therefore, water contamination was based on two additions of solutions containing CdCl₂ and PbCl₂ at time 0 and 48 h. At time 0, 200 μ L (C₁) or 3.4 mL (C₂) of a 10 mg/L CdCl₂ solution, and 0.8 μ L (C₁) or 11 μ L (C₂) of a 10 g/L PbCl₂ solution were added to aquaria, giving the desired C_1 and C_2 contamination levels. At time 48 h, double the time 0 volumes were added, thereby doubling the contamination levels. Mercury contamination was based on daily additions of a 150 mg/L HgCl₂ solution. Each day Hg concentration was analyzed and the amount of HgCl₂ (ultrapure HgCl₂, Merck) added was adjusted to compensate for the decrease in metal concentration over the 24 h cycles. Water additions were done carefully every day to compensate for losses due to evaporation of water. No daily change of water compartments was done not to resuspend sediment particles and cause water column contamination. After 8 days of exposure, worms and clams were removed from microcosms and dissected. Soft body and gills were collected from each clam and small body sections from each worm for metal quantification, genotoxicity and gene expression assessments. All samples were conserved at -80°C until analyses. Tissues were digested in 1 to 3 mL of nitric acid (depending on dry tissue weight) at 100°C for 3 h. The liquid underwent six-fold dilution with ultrapure water. Cadmium and Pb concentrations were determined by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (M6 Solaar AA spectrometer, Thermoptec). Quantification of mercury for water and dried tissues was performed by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic), with an estimated detection limit of $0.01 \mu g$ Hg/L. The analytical methods were simultaneously validated for each

sample series by analyzing standard biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas and Dolt-4: dogfish liver from National Research Council of Canada, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (Tort-2 in μ g/g: Cd = 26.7 ± 0.6; Pb = 0.35 ± 0.13 and Hg = 0.27 ± 0.06; Dolt-4 in μ g/g: Cd = 24.3 ± 0.8; Pb = 0.16 ± 0.04 and Hg = 2.58 ± 0.22).Genotoxic effects of metal mixtures were assessed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology (Cambier et al. 2010; Geffroy et al. 2012; Orieux et al. 2011). Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen clam and worm tissues with a scalpel. For each condition, eleven clams and ten worms were sampled. Crushed tissues were digested overnight at 37°C with DNA extraction buffer at 7 mL per gram of tissue, made up with 10 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS and 100 µg/mL proteinase K (Promega). After digestion, 2.5 mL saturated NaCl (6M) was added, followed by centrifugation. RNase (10 mg/mL) was added to the supernatant at 20 µg/mL, and after 15 min of incubation at 37°C, the DNA was precipitated with 2 volumes of 100 % absolute ethanol and removed by spooling. The DNA was rinsed with 70 % ethanol, dried and resuspended in TE buffer (10 mM Tris pH 8, 0.1 mM EDTA). Selected primers for RAPD-PCRs were obtained from Sigma-Proligo and were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3') for clam DNA and OPB7 and OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3') for worm DNA. Real time RAPD-PCRs were done with the Lightcycler apparatus (Roche) as described (Lerebours et al. 2013). For each clam, using OPB7, OPB11 and ribosomal 28S probes (forward 5'GCTGCTCCATAAGTCG-3' and reverse 5'-TGAACTATGTCTGAGTAGGG-3'), the difference $\Delta =$ Ct(28S) - Ct(OPB7 or OPB11) reflects the difference of hybridization efficiencies between the RAPD probe and 28S probe. It can be calculated from $2^{\Delta+1}$, which corresponds to the ratio of the number of hybridization sites of the OPB7 or OPB11 probe relative to the number of copies of the 28S gene. The same calculation was done for worm genomic DNA using OPB7, OPA9 and ribosomal (forward 5'-GTCCGCATTGGCCTACC-3' 16S probes and reverse 5'-

GTTCGGTTGGGGCGAC-3'). Melting temperature curve analysis was done using the LightCycler Software 3.5 (Roche). For a given RAPD-PCR capillary tube, the melting temperature (Tm) of each PCR product peak was obtained in order to establish a frequency distribution of peak appearance at equal Tm for a set of 10 different temperature intervals ranging from 78 to 89°C. The comparison of distributions between two different exposure conditions indicates temperature intervals for which the frequency of PCR products for a known Tm differed. After 8 days, clams were dissected and sampled tissues (gills) kept frozen in RNA-later (Qiagen) at - 80°C until used. The expression of 5 genes was analyzed using five clams for each condition. Samples were crushed and total RNA was extracted using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. However, in order to eliminate the maximum of lipids and proteins, we added a step of phenol:chloroform:isoamylic alcohol (25:24:1) extraction. At the end of this process, 30 µL containing total RNA were collected. First-strand cDNA was synthesized from 14 µL of total RNA using the Affinity ScriptMulti Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed in a thermocycler (Stratagene) following the manufacturer's recommendations. All primer pairs were designed with the Lightcycler probe designer software (forward and reverse primer, respectively): cox1: GTACCCTCCGTTGTCGTCA and CCTGTTACTCCTAAACACCAAGC; cytb: TTGATAGAGACGGGGATGT and ATACCACTCAGGCTGGA; CTGAGGCTACAGACAGATG cat: and GTTGCCCTGGGCGATG; sod: GATAATGTTGATCATGCTGGACC and GTCTACATCAGCGTGAACGCAA; 16S RNA: AGAAGACCCTGTCGAG and TTACGGCTGTTATCCCT. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to β -actin gene expression.



Figure 1. Metal bioaccumulation in soft body and gills of clams and worms. a: cadmium (Cd), b: mercury (Hg) and c: lead (Pb) concentrations in (μ g/g dry weight) as means \pm standard error (n = 3). Asterisk indicates statistically significant values as compared to control (C₀), as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.

The choice of the β -actin gene (forward and reverse primers were CGCACTTCCTCACGCCATCAT and GCAGCCGTCTCCATTTCTTGT respectively) as a reference was relevant because its expression did not vary upon exposure to different metal blend concentrations, since the mean Ct remained constant under different conditions (C₀: 25.92 ± 1.0; C₁:24.81 ± 3.2; C₂: 24.53 ± 2.8).

3. Results

Cadmium (Cd), lead (Pb) and mercury (Hg) accumulations were quantified in soft body and gills for clams, and parts of whole body for worms. Results in the soft body of clams showed a significant accumulation of the 3 metals, particularly at the highest concentration (C_2) , with 5.5-, 3.5- and 20-fold increases compared to control, respectively $(2.3 \pm 0.3 \ \mu g \ Cd/g, 0.7 \pm 0.2 \ \mu g \ Hg/g \ and 45 \ \mu g \ Pb/g; \ dry$ weight) (Figure 1 a,b,c). In gills, there were insignificant increases in Cd but significant accumulation of Hg, with 7.5- and 25-fold increases compared to control at lower and higher exposures, respectively $(0.6 \pm 0.2 \text{ and } 2 \pm 0.4 \text{ } \mu\text{g} \text{ Hg/g};$ dry weight) (Figure 1b), and in Pb with 2.7- and 14-fold increases compared to control at lower and higher exposures, respectively $(1.63 \pm 0.07 \text{ and } 8.6 \pm 0.4 \mu \text{g})$ Pb/g; dry weight) (Figure.1c). In worm tissue, no differential accumulation was observed at the lower metal exposure (Figure.1a,b,c). At higher exposure, Pb accumulation showed an insignificant increasing trend and there were significant Cd and Hg accumulations with 5.5- and 10-fold increases compared to control, respectively $(0.5 \pm 0.1 \ \mu g \ Cd/g \ and \ 2 \pm 0.6 \ \mu g \ Hg/g$; dry weight). RAPD-PCR on genomic DNA extracted from ten individual clam's gills revealed a significant 10fold decrease of OPB7 probe hybridization sites in clam DNA at C₂ exposure (Table.1), indicating metal-induced modifications in DNA composition.

When comparing the frequency distribution of the OPB7-obtained PCR product *T*m among the temperature intervals, distribution increased in C₂-contaminated clam genomic DNA compared to control at [83-84°C[: Only 5 out of 11 control clam DNA versus 10 out of 11 C₂-contaminated clam DNA presented a melting peak in this interval (p < 0.05) (Table.2).

 Table 1. Relative number of hybridization sites per genome unit of RAPD probes on genomic DNAs from control and contaminated clams and worms.

 Clama
 Worms

	Cl	ams	W	orms
	OPB7	OPB11	OPB7	OPA9
C ₀	0.02 ± 0.007	$(2.1 \pm 0.5).\ 10^{-4}$	3.3 ± 0.9	0.04 ± 0.008
C ₁	0.02 ± 0.005	$(39 \pm 10). \ 10^{-4}$	4.3 ± 1.1	$0.1 \pm 0.01*$
C ₂	0.002 ± 0.0006 *	(0.36 ± 0.09) . 10^{-4}	4.5 ± 2.4	0.03 ± 0.01

Results are mean \pm SEM (n = 11 for clams and 10 for worms). The relative number of hybridization sites of a RAPD probe is defined as the ratio of the total hybridization sites of the RAPD probe over 16S (for clams) or 28S (for worms) ribosomal gene copies number. Asterisks indicate significant differences as compared to unexposed controls as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.

For exposed worms, there was a 2.5-fold increase in the number of OPA9 probe hybridization sites in genomic DNA following C₁-exposure (Table.1). Differences in the distribution frequency of PCR product *T*m were observed. The OPB7 probe distinguised C₂-exposed DNA from both C₁-exposed and control DNA, for the temperature intervals [80-81°C[and [81-82°C[, and the OPA9 probe distinguished C₁- and C₂-exposed worms from control animals for the temperature intervals [88-89°C[and [85-86°C[, respectively (Table.2). Relative gene expression in gills from exposed clams was compared to those from control clams. There was a significant 50-fold induction of *cox1* gene expression in C₂-exposed animals. The expression of *cytb* and mitochondrial ribosomal 16S RNA genes were up regulated 10- and 20-times, respectively (Table.3).

Discussion

The present work showed that exposure of R. philippinarum and H. diversicolor to metal blends led to accumulation of Cd, Pb and Hg and triggered genotoxic effects on both animals. We performed combined exposures because single exposures to metals have already been described for R. philippinarum and H. diversicolor. When R. philippinarum was exposed to 15 µg/L of CdCl₂, 400 ng/g (dw) of Cd was quantified in gills after 7 days (Paul-Pont et al. 2010). Exposure of R. philippinarum to 700 μ g/L of PbCl₂ during 7 days led to accumulation of Pb reaching 170 and 160 μ g/g (dw) in soft body and gills, respectively (Blasco et al. 1999). In R. philippinarum collected from natural sites containing 0.65 ng/L of total Hg (0.35 ng/L of total dissolved Hg), body burden of Hg reached 47 ng/g (dw) (16.6 ng/g MeHg (dw) (Pan and Wang. 2011). Several studies assessed metal (Cd, Pb and Hg) bioaccumulation in *H. diversicolor*. When *H. diversicolor* was exposed to 10 μ M of CdCl₂, 4.5 μ g Cd/g was recorded in this worm after 7 days (Lianzhen et al. 2012). In H. diversicolor collected from Restronguet estuary sediment containing 336 µg/g of Pb (dw), body burden of Pb reached 89 µg/g (dw) (Rainbow et al. 2011). In worms collected from Mondego estuary sediment containing 5.3 μ g/g of Hg (dw), Hg reached 0.1 μ g/g (ww) (Cardoso et al. 2009).

from clamb and	wernib.	
C ₀	C ₁	C_2
	OPB7	
0.45	0.5	0.91*
	OPB7	
0.5	0.7	0.1 *
0	0.2	0.7*
	OPA9	
0.4	0.7	0*
0	0.8*	0.2
		$\begin{tabular}{ c c c c c } \hline C_0 & C_1 \\ \hline $OPB7$ \\ \hline $OPB7$ \\ \hline 0.45 & 0.5 \\ \hline $OPB7$ \\ \hline 0.5 & 0.7 \\ \hline 0 & 0.2 \\ \hline $OPA9$ \\ \hline 0.4 & 0.7 \\ \hline 0 & $0.8*$ \\ \hline \end{tabular}$

Table 2. Frequency according to the temperature intervals (C°) to which their $T_{\rm m}$ belong, of the PCR products obtained with probes on genomic DNAs from clams and worms.

* Designates the metal blend concentration for which the frequency of occurrences of peaks belonging to the indicated temperature intervals discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls (n = 11 for clams and 10 for worms) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05.

It should be stressed that the metal burden of the marine sediment we have collected in Arcachon is far lower than the above described metal concentrations, with 180-times less Pb than in Restronguet estuary and 56-times less Hg than in Chegado estuary. In the present study, differences of Cd and Hg accumulations were observed between clams' soft body and gills, since gills accumulated 2-times more Hg than soft body mainly at higher concentration. However, soft body accumulated 5-fold more Pb than gills. This difference could be due to the ability of clams to segregate Pb by forming granules, a way of detoxification. This has been shown in the earthworm Aporrectodea caliginosa collected from a nonpolluted soil containing 35 mg/kg (dw) of Pb. More than two-third of Pb accumulated in A. caliginosa was mainly found in the granular fraction, in which Pb was bound to cysteine residues coming from the degradation of metallothioneins (Vijver et al. 2006). Exposure of the freshwater bivalve Hyridella australis to Pb-spiked sediment also showed a difference of Pb accumulation between tissues due to granules formation. Labial palps accumulated 2.6-fold more Pb than gills reaching 13 µg Pb/g (dw) after exposure for 28 days to sediment spiked with 419 µg Pb/g. The tissue accumulating the most Pb was hepatopancreas and 75% of this metal was sequestered into the granule fraction (Marasinghe Wadige et al. 2014). A reversed pattern of accumulation had been described in that clam species exposed for 7 days to much higher Pb concentrations (350 μ g/L), that led to a 2.5 increased burden of Pb in gills as compared to soft body (Blasco et al. 1999). At higher concentrations of Pb (700 μ g/L) the difference vanished. For Cd and copper there were no differences in accumulated metal between soft body and gills at 200 or 600 µg Cd/L and 10 or 20 µg Cu/L (Blasco et al. 1999). These discrepancies are likely due to the very high metal concentration used in that study as compared to the present work. In the present study worms accumulated 5-times less Cd and 4.5times less Pb than clams, whereas worms accumulated 3-times more Hg than clam's soft body. This could be due to animals' lifestyles and exposure route.
Table 3. Relative expression of selected genes in gills from control and contaminated clams after 8 days of metal exposure.^a

	cox1	cytb	sod	cat	16S RNA
C ₀	4.7 ± 1.3	$(8 \pm 5).10^{-2}$	2.3 ± 1.4	0.2 ± 0.1	0.002 ± 0.001
C ₁	15.3 ± 6.8	$(81 \pm 52) . 10^{-2} *$	13.6 ± 8.5	0.5 ± 0.1	0.005 ± 0.004
C ₂	237 ± 125 *	$(650 \pm 509).10^{-2}$	20.1 ± 12.9	0.2 ± 0.05	0.04 ± 0.01 *

^a The differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in gill clam in the indicated condition over that of control clams. Clams exposure has been performed in presence of worms. * Statistically significant differential expression (mean \pm SEM, n = 5) as assessed by the Mann-Whitney U-test, p < 0.05. In fact, *R. philippinarum* and *H. diversicolor* are different in terms of habitat, behavior and feed. *H. diversicolor* lives buried in the sediment and display a bioturbation activity called biodiffusion, as such regularly irrigating its burrow with polluted water (Nielsen et al. 1995; Scaps 2002). Whereas *R. philippinarum* is a deposit filter feeding that lives buried partially in the sediment and filtering the water compartment. Accumulation results obtained in *H. diversicolor* are similar to those observed in tubificidae worms exposed to Cd from the overlying water column (20 μ g Cd/L), with an observed burden of 12 μ g Cd/g dry weight after 21 days (Ciutat et al. 2005b). This efficient bioaccumulation was shown to result from bioturbation, increasing the transfer of Cd from the water column to the sediment with calculated rates after 21 days of 616 ± 46 and 237 ± 44 ng Cd/cm²/day in presence and absence of worms, respectively (Ciutat et al. 2005a). Sediment can also be the predominant source of Cd accumulated by polychaete worms (Kalman et al. 2010).

Results showed DNA alterations caused by metal blends. In fact, genotoxicity was correlated with metals burden in animals. In the present work, using quantitative RAPD, we looked at the creation or elimination of hybridization sites of probes on genomic DNAs of contaminated organisms compared to control, along with modifications of PCR products' Tm profiles, which are effective parameters in detecting small changes in DNA sequences (Cambier et al. 2010; Lerebours et al. 2013). Indeed OPB7, OBP11 and OPA9 probes highlighted DNA alterations in *R. philippinarum* and *H. diversicolor* caused by metal contamination. It should be noted that clams and worms were collected *in situ* so they were genetically different; this genetic diversity is reflected by the fact that the frequency of PCR products for each melting temperature class is for many of the classes different from 1 and 0 (situation expected in the case of a clonal species). Metal genotoxicity has been demonstrated in Scrobicularia plana and the polychaete H. diversicolor exposed to 10 µg/L of ionic copper for 21 days (Buffet et al. 2012), and *H. diversicolor* exposed to a sediment spiked with 50 mg/kg of ionic Ag for 10 days showed accumulation of $10 \pm 5 \ \mu g \ Ag/g \ dry \ weight$ (Cong et

al. 2011). In the present study, the concentrations of metal resulting in DNA damage were in the same range (a few μ g/g dry weight). DNA damage was shown in worms by the increase of OPA9 probe hybridization sites after exposure to the C₁ polymetallic blend but not the C₂. This is reminiscent of the detection of genotoxicity in *M. galloprovincialis* gill cells after exposure to 40 but not 80 μ g/L of divalent copper chloride (Bolognesi et al. 1999). The comet assay showed DNA damage in the digestive gland of *M. edulis* after 10 days of exposure to 200 μ g/L cadmium and 10 μ g/L hexavalent chromium, corresponding to accumulated concentrations of 39 ± 11 μ g Cd/g wet tissue and 2.7 ± 2.9 μ g Cr/g wet tissue (Emmanouil et al. 2007). On the contrary, the comet assay showed no effect of Cd in the same organism exposed to 200 μ g/L for 4 weeks (Pruski and Dixon 2002).

However, because the detected number of hybridization sites is a balance between created and lost sites, the absence of difference between control and exposed animals does not necessarily indicate absence of DNA alterations. Indeed, the analysis of the frequency of PCR products showed significant differences for C_2 exposed worms compared to control.

Since CoxI is a subunit 1 of cytochrome c oxidase which performs the critical function of transferring electrons from cytochrome c to oxygen and hence contributing to ATP generation during respiration (Malatesta et al. 1995), mitochondrial respiration was likely impacted in C₂ exposed animals. Overexpression of the *cox1* gene has been demonstrated in a pyrethroid insecticide-resistant strain of *Blatella germanica* (German cockroach) (Pridgeon and Liu 2003), in *Danio rerio* (zebrafish) fed with diets contaminated by methyl mercury (Gonzalez et al. 2005) and in freshwater and marine bivalves exposed to cadmium (Achard-Joris et al. 2006). As CoxI is considered as the rate-limiting step for mitochondrial respiration (Villani and Attardi 2000), *cox1* gene overexpression could be a compensatory mechanism to restore the decrease in mitochondrial activity and to efficiently consume O₂, thus limiting Cd-induced damage in the cell. The proposal of such an adaptive mechanism is strengthened by the parallel overexpression of the *cytb* gene encoding the main subunit of

respiratory chain complex III. Lastly, the overexpression of the 16S ribosomal RNA gene indicates that the number of mitochondria increased and fits well with a compensatory response.

To conclude, animals exposed in the laboratory to environmentally relevant polymetallic concentrations displayed DNA alterations and a modified pattern of gene expression. The effects of the metal mixture were observed at the highest concentration after 8 days of exposure, revealing a rapid effect on animal molecular biology. In their natural habitat, animals are facing these levels of metal pollution for many months at a time, thus, the real impact might well be worse than observed in these microcosms.

References

- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP (2006) Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals 19:237-244.
- Banta G, Andersen O (2003) Bioturbation and the fate of sediment pollutants experimental case studies of selected *infauna* species. Vie Milieu 53:233-248.
- Berthet B, Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthelot Y, Le Hen A, Mastain O, Rainbow PS, Smith BD (2003) Accumulation and soluble binding of cadmium, copper, and zinc in the polychaete *Hediste diversicolor* from coastal sites with different trace metal bioavailabilities. Arch Environ Contam Toxicol 45:468-478.
- Blasco J, Puppo J (1999) Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). Comp Biochem Phys C 122:253–263
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. Environ Mol Mutagen 33:287-292.
- Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C (2013) A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana, Hediste diversicolor*). Environ Sci Technol 47:1620-8
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP (2010) Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicol Environ Safety 73:312-319.
- Cardoso PG, Lillebø AI, Pereira E, Duarte AC, Pardal MA (2009) Different mercury bioaccumulation kinetics by two macrobenthic species: the bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Hediste diversicolor*. 68:12-8.
- Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A (2005a) Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. Environ Toxicol Chem 24:1048-1058.
- Ciutat A, Gerino M, Mesmer-Dudons N, Anschutz P, Boudou A (2005b) Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. Ecotoxicol Environ Safety 60:237-246.
- Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE (2011) Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron and ionic-Ag in the polychaete *Nereis diversicolor*. Aquat Toxicol 105:403-411.
- Emmanouil C, Sheehan TMT, Chipman JK (2007) Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr (VI). Aquat Toxicol 82:27-35.

- Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP (2012) Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6:144-160.
- Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). Environ Sci Technol 39:3972-3980.
- Jebali J, Banni M, de Almeida EAD, Boussetta H (2007) Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. Environ Monit Assess 124:195-200.
- Kalman J, Smith BD, Riba I, Blasco J, Rainbow PS (2010) Biodynamic modelling of the accumulation of Ag, Cd and Zn by the deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*: Inter-population variability and a generalised predictive model. Mar Environ Res 69:363-373.
- Kehal M, Mennour A, Reinert L, Fuzellier H (2004) Heavy metals in water of the Skikda bay. Environ Technol 25:1059-1065.
- Lerebours A, Cambier S, Hislop L, Adam-Guillermin C, Bourdineaud JP (2013) Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen 755:55-60.
- Lianzhen L, Xiaoli L, Liping Y, Linbao Z, Jianmin Z, Huifeng W (2012) Uptake pathways and subcellular fractionation of Cd in the polychaete *Nereis diversicolor*. Ecotoxicology 21:104–110.
- Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M (1995) Structure and function of a molecular machine: Cytochrome c oxidase. Biophys Chem 54:1-33.
- Mouneyrac C, Mastain O, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Beaunier P, Jeantet AY, Simth BD, Rainbow PS (2003) Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. Mar Biol 143:731-744.
- Nafissa B, Bouzerna N, Chettibi H (2005) Assessment of the petrochemical industry pollution on the Skikda bay, Algeria. Int J Environ Public Health R 2:463-468.
- Nielsen AM, Eriksen NT, Lonsmann Iversen JJ, Riisgard HU (1995) Feeding, growth and respiration in the polychaetes *Nereis diversicolor* (facultative filter-feeder) and *Nereis virens* (omnivorous) a comparative study. Mar Ecol-Prog Ser 125:149-158.
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP (2011) Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol. Environ Safety 74:974-983.
- Pan K, Wang WX (2011) Mercury accumulation in marine bivalves: influences of biodynamics and feeding niche. Environ Pollut 159:2500-6.
- Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C, Baudrimont M (2010) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. Environ Pollut 158:3401-10.
- Pridgeon JW, Liu N (2003) Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.) Insect Biochem Mol Biol 33:1043-1048.
- Pruski AM, Dixon DR (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. Aquat Toxicol 57:127-137.
- Rainbow PS, Kriefman S, Smith BD, Luoma SN (2011) Have the bioavailabilities of trace metals to a suite of biomonitors changed over three decades in SW England estuaries historically affected by mining? Sci Total Environ 409:1589-602.
- Ramos-Gómez J, Coz A, Viguri JR, Luque A, Martín-Díaz ML, Ángel DelValls TA (2011) Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. Environ Pollut 159:1914-1922.
- Roméo M, Gnassia-Barelli M (1997) Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. Comp Biochem Phys C 118:33-37.
- Sacchi A, Mouneyrac C, Bolognesi C, Sciutto A, Roggieri P, Fusi M, Beone GM, Capri E (2013) Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). Environ Pollut. 177:82-9
- Scaps P (2002) A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida: Polychaeta). Hydrobiologia, 470:203-218.
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2009) Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). Comp Biochem Phys C 139:181-188.

- Villani G, Attardi G (2000) In vivo control of respiration by cytochrome *c* oxidase in human cells. Free Radical Bio Med 29:202-210.
- Wang Z, Yan C, Vulpe CD, Yan Y, Chi Q (2012) Incorporation of *in situ* exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. Mar Pollut Bul 64:90-98.

CHAPITRE IV SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Nous avons souhaité terminer ce mémoire en dégageant les principaux résultats de nos recherches et leurs implications dans l'étude de l'impact des nanoparticules sur les organismes aquatiques via une contamination sédimentaire.

Les principaux objectifs de cette thèse résidaient en la caractérisation des effets de la contamination du sédiment aux nanoparticules (cadmium et or) sur deux modèles biologiques : l'oligochète *Tubifex tubifex* et le poisson d'eau douce *Danio rerio*, et ce dans un contexte prédictif ne reflétant pas les concentrations naturelles.

Les approches pluridisciplinaires effectuées durant cette étude nous ont permis d'effectuer des comparaisons focalisant sur l'impact des formes nanoparticulaire. Le tableau ci-contre synthétise les objectifs et les principaux résultats ressortis de chaque expérience réalisée dans cette étude.

Nous avons ainsi réussi à répondre aux principales problématiques posées au début de ce travail de recherche; ces réponses sont détaillées dans ce chapitre sous forme de points synthétisant et concluant nos résultats tout en examinant les éventuelles extrapolations et tenant compte de la littérature. Nous avons rajouté aussi une partie sur les perspectives des recherches.

Chapitre IV : Synthèse générale et perspectives

	Objectifs	Résultats
CdSNPs/MPs 0,59 et 0,34 µg/g (ps)	Transfert du Cd vers la colonne d'eau. Accumulation de Cd dans les vers. Effets des formes de Cd sur le niveau des Mts, altération du génome et de l'activité de bioturbation des vers.	Transfert du Cd (fraction filtrable) depuis le sédiment vers la colonne d'eau : $CdCl_2 > CdSNPs$ > $CdSMPs$. Accumulation du Cd : $CdCl_2 >$ CdSNPs > CdSMPs Mts : CdS NPs = CdS NPs = Contrôle ; $CdCl_2$ Altération du génome : CdSNPs, CdSMPs, $CdCl_2$ Activité de bioturbation: CdSNPs et CdCl ₂
AuNPs	Transfert de l'or vers la colonne d'eau. Accumulation d'or dans les tissus du poisson. Effets des formes d'or sur la neuro- transmission, l'altération du génome et l'expression des gènes.	Transfert d'or (fraction filtrable) depuis le sédiment vers la colonne d'eau : AuNPs > KAuCl ₄ . Accumulation du KAuCl ₄ > AuNPs spécialement dans le tube digestif. AchE muscle et cerveau (AuNPs) Altération du génome : AuNPs et KAuCl ₄ . Modifications de l'expression des gènes dans les tissus provoquées par AuNPs et KAuCl ₄
AuNPs 2005 14 et 56 µg/g (ps)	Transfert de l'or vers la colonne d'eau. Accumulation d'or dans les vers. Effets des formes de l'or sur l'altération du génome et l'activité de bioturbation des vers.	Pas de transfert d'or (fraction filtrable) depuis le sédiment vers la colonne d'eau. Accumulation : KAuCl ₄ > AuNPs principalement à 56 μ g/g (ps). Altération du génome : AuNPs et KAuCl ₄ ; à 14 μ g AuNPs/g (ps) : perte totale de sites d'hybridation. Pas d'effet de l'or nanoparticulaire et ionique sur l'activité de bioturbation.
AuNPs δ δ AuNPs 14 et 56 μg/g (ps)	Transfert de l'or vers la colonne d'eau. Accumulation d'or dans les vers. Effets des formes de l'or sur l'altération du génome et l'activité de bioturbation des vers. Accumulation d'or dans les tissus des poissons. Effets des formes d'or sur la neurotrans- mission, l'altération du génome et l'expression des gènes. Effet de la présence de poissons sur les vers.	Pas de transfert d'or (fraction filtrable) depuis le sédiment vers la colonne d'eau. Accumulation dans les vers en présence des poissons et KAuCl ₄ = AuNPs. Altérations du génome des vers observées après analyse des produits de PCR. Modification de l'activité de bioturbation des vers en présence de poissons. Accumulation d'Au dans les poissons AuNPs > KAuCl ₄ spécialement dans le tube digestif. AchE → muscle (AuNPs) et le cerveau (AuNPs). Altérations du génome des vers observées après analyse des produits de PCR. Modification de l'expression des gènes dans les tissus : AuNPs et
		11 10014.

Les nanomatériaux sont des outils conçus pour dépasser les limites dans la conception des nouvelles technologies. L'attrait pour les avantages de ces produits ne doit pas masquer les éventuels risques qui pourraient survenir d'une utilisation accrue de ces matériaux. A l'heure actuelle, plus de 1300 nano-produits existent sur le marché ce qui indique leur forte utilisation, et donc un besoin très important se fait ressentir concernant l'évaluation du risque associé à ces produits (Buffet, 2012).

L'introduction des NPs dans l'environnement a été démontré par plusieurs auteurs (Moore, 2006 ; Handy *et al*, 2008 ; Klaine *et al*, 2008). Cependant, les quantités qui vont entrer dans l'environnement et notamment dans les systèmes aquatiques restent encore méconnues. L'évaluation des risques imposée par l'utilisation croissante des nanomatériaux dans les produits commerciaux nécessite une meilleure compréhension de leur mobilité, de leur biodisponibilité et de leur toxicité.

1. Transfert des nanoparticules depuis le sédiment vers la colonne d'eau

La turbidité élevée de la colonne d'eau enregistrée dans les unités expérimentales avec les animaux nous a permis de confirmer l'importante remise en suspension des particules sédimentaires résultant du mouvement des vers tubifex (activité de bioadvection et recouvrement du sédiment) et du poisson zèbre nageant tout près de l'interface eau-sédiment. Notons que les valeurs de turbidité présentaient des niveaux différents en fonction des organismes présents dans les UEs. En effet, quand les vers étaient exposés seuls dans les UEs en verre, les valeurs de turbidité étaient entre 5 et 10 FTU. Quand les poissons zèbres étaient exposés seuls dans les UEs, la turbidité atteignaient des valeurs de 400 jusqu'à 800 FTU. À l'inverse, lorsque les vers tubificidae étaient introduits avec le poisson zèbre dans les UEs en verre, la turbidité diminuait et atteignait des valeurs comprises entre 10 et 100 FTU (fig.2).



Figure 1. Transfert des nanoparticules depuis le compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau Concentration dans le sédiment (ps) → Concentration (Cd ou Au) dans l'eau non filtrée/filtrée ; ind : indétectable.

Cette remise en suspension a été largement observée avec les poissons zèbres avec de fortes valeurs de turbidité, arrivant jusqu'à 800 FTU (Dedeh et al, 2014). Lorsque les poissons étaient exposés en présence de vers tubifex, les valeurs de turbidité diminuaient en comparaison avec les valeurs obtenues chez les poissons seuls. Deux hypothèses peuvent expliquer cette diminution: la première est que la présence des vers peut influencer le comportement des poissons, ce qui conduit à ralentir leur mouvement et donc engendre une diminution de la remise en suspension des particules sédimentaires. La deuxième hypothèse est que la présence des vers permet de fixer les particules sédimentaires et donc réduit leur remise en suspension dans la colonne d'eau. Ce mouvement de remise en suspension des particules sédimentaires conduit au transfert des nanoparticules depuis le sédiment vers la colonne d'eau. Les niveaux de transfert des métaux (Cd et Au) sous forme nanoparticulaire depuis le compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau obtenus durant notre travail de recherche sont indiqués dans la fig.1.

Lors de la contamination du sédiment aux nano- et microparticule de CdS, nous avons observé un transfert de Cd depuis le compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau, la concentration de Cd dans la fraction filtrée de l'eau a augmenté principalement en présence de vers en raison de leur activité de bioturbation. Nos résultats démontrent que le transfert du Cd depuis le sédiment vers la colonne d'eau est plus marqué quand les vers sont exposés au CdCl₂ où la concentration du Cd dans la fraction filtrée de l'eau atteignait 0,1 μ g/L contre 0,026 et 0,018 μ g/L pour les expositions au CdS nano- et microparticulaire, respectivement.

Lorsque les vers étaient exposés au sédiment contaminé aux AuNPs et à de plus fortes concentrations que celles de CdNPs (14 et 56 μ g/g ps), nous avons observé un transfert d'Au depuis le sédiment vers la colonne d'eau mais seulement dans la fraction non filtrée de l'eau ; la concentration d'or dans l'eau filtrée était en dessous de la limite de détection. Ce phénomène a été également observé lorsque les vers étaient exposés avec les poissons zèbres malgré les valeurs de turbidité élevées (fig.1).



Figure 2. Transfert des nanoparticules d'or depuis le compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau en fonction de la turbidité et la présence des animaux.

Nous avons également montré que lors de l'exposition de poissons zèbres au sédiment contaminé avec les nanoparticules d'or, ces dernières sont transférées depuis le sédiment vers la colonne d'eau. La concentration d'or mesurée dans l'eau filtrée atteignait 0,25 et 0,8 µg Au/L (fig.1). Cette concentration indique que pour 50 ppm de AuNPs dans le sédiment, moins de 1µg Au/L est re-largué dans la colonne d'eau. Nous avons supposé que ces concentrations de NPs pouvaient être biodisponibles pour les poissons et avons considéré ces concentrations comme nos pressions de contaminations pour le poisson zèbre (Dedeh *et al*, 2014).

Ces résultats nous ont permis de caractériser le transfert des AuNPs dans les UEs en fonction de la présence des organismes (poissons zèbres, vers tubificidae). Le schéma est représenté dans la fig.2. Lorsque les vers sont exposés seuls, ou en présence de poissons zèbres, aux sédiments contaminés aux AuNPs, les niveaux de turbidité étaient compris entre 5 et 10 FTU pour les vers seuls et entre 10 et 100 FTU pour les vers avec les poissons, ce qui correspond à une remise en suspension des particules sédimentaires faible et moyenne, et conduit donc à un faible transfert de l'or se trouvant principalement associé aux particules sédimentaires. En revanche lorsque le poisson zèbre est exposé seul aux AuNPs, la turbidité élevée qui correspond à une importante remise en suspension des particules sédiment vers la colonne d'eau. L'or dans la colonne d'eau peut être associé aux particules sédimentaires ou sous forme d'agrégats > 0,2 μ m dans la fraction non filtrée de la colonne d'eau aux.

2. Accumulation des nanoparticules par les organismes aquatiques.

2.1. <u>Accumulation des nanoparticules de cadmium et d'or dispersées dans le</u> sédiment chez les vers tubificidae.

Il existe plusieurs données dans la littérature concernant la bioaccumulation des NPs chez les organismes aquatiques. Chez les invertébrés, Buffet *et al*, (2011) ont montré une accumulation de Cu sous forme nanoparticulaire chez *H. diversicolor* et *S. plana*. Des résultats similaires ont été observé chez le même annélide exposé à de l'Ag sous forme nanoparticulaire (Cong *et al*, 2011). Il a été observé qu'après 16 jours d'exposition à 3 mg ZnNPs/kg de sédiment, les niveaux de bioaccumulation chez *H. diversicolor* atteignaient 10 µg/g (Buffet *et al*, 2012b). Après 10 jours d'exposition à 250 ng AgNPS/g de sédiment, la concentration d'Ag dans *H. divesicolor* atteignait 218 \pm 15 µg/g (pf) (Garcia- Alonzo *et al*, 2011). Après 28 jours d'exposition à 50 mg AuNPs/kg de sédiment (ps), la bioaccumulation dans les vers de terre *Eisenia fetida* atteignait 1,4 \pm 0,2 mg/g (pf) (Unrine *et al*, 2010).

Plusieurs études ont montré que les métaux, comme le cadmium, peuvent être accumulés dans les vers oligochètes via l'absorption épidermique (Ciutat *et al*, 2005a, Méndez-Fernández *et al*, 2013). Le sédiment est ingéré par les vers dans les couches de surface jusqu'à une profondeur d'environ 5 cm, et peut donc constituer une source potentielle de contamination par voie trophique (Ciutat *et al*, 2003). Le Cd pourrait être pris par l'intestin des tubificidés depuis les sédiments ingérés comme c'est le cas avec *H. diversicolor* exposé aux nanoparticules d'argent par le sédiment (García- Alonso *et al*, 2011). Les vers Tubifex ingèrent les particules sédimentaires au fond des galeries et les rejettent en surface sous forme de pelotes fécales, après extraction d'une partie de la matière organique assimilable. Ils induisent donc un recouvrement de la surface oxydée du sédiment avec le sédiment réduit d'horizons inférieurs (McCall et Fisher, 1980). **Tableau 1.** Récapitulatif des niveaux de bioaccumulation dans les vers tubificidae obtenus durant nos expérimentations en $\mu g/g$ (poids humide).

	<i>i ubijex</i> exposes aux trois formes de cadmium						
Cd dans le sédiment	Contrôle 0,25 µg/g (ps)	CdSNPs 0,59 µg/g (ps)	CdMPs 0,34 µg/g (ps)	CdCl ₂ 0,6µg/g (ps)			
Cd dans les vers	$0,029 \pm 0,006$	$0,08 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,008$	$0,76 \pm 0,3$			

Tubifex exposés aux trois formes de cadmium

Tubi	<i>fex</i> ex	posés	aux	deux	formes	d'or	en	absence	de	poisson	zèbre

	Contrôle	Au	NPs	KAuCl ₄		
Au dans le sédiment	< dt	14 µg/g (ps)	56 µg/g (ps)	14 µg/g (ps)	56 μg/g (ps)	
Au dans les vers	0,031 ± 0,01	$1,03 \pm 0,06$	2,66 ± 0,5	$1,05 \pm 0,04$	$5,08 \pm 0,2$	

Tubifex exposés aux deux formes d'or, avec présence de poissons zèbres

	Contrôle	Au	NPs	KAuCl ₄		
Au dans le sédiment	< dt	14 µg/g (ps)	56 µg/g (ps)	14 µg/g (ps)	56 μg/g (ps)	
Au dans les vers	0,03 ± 0,003	0,38 ± 0,14	1,48 ± 0,12	0,33 ± 0,03	1,25 ± 0,14	

< dt : inférieur à la limite de détection ; ps : poids sec.</pre>

Dans ce travail de recherche, l'ensemble des résultats d'accumulation obtenus après exposition des vers à des sédiments contaminés aux deux métaux (Cd et Au) sous différentes formes (nanoparticules, microparticule et ionique) confirment la contamination de ces organismes par voie trophique. Dans le cas de la contamination du sédiment aux nano- et microparticules de CdS, nos travaux démontrent que même lorsque les vers T. tubifex sont exposés à de faibles concentrations de CdS NPs et CdS MPs, cette espèce accumule le Cd. L'exposition des vers oligochètes aux différentes formes de cadmium conduit à des niveaux d'accumulation différents, les vers accumulant 10 fois plus de Cd ionique comparé aux expositions nano- et microparticulaires. Ce qui suggère que ces formes sont moins disponibles pour les tubificidae. Les facteurs de bioaccumulation élevés observés indiquent les capacités des vers à concentrer le Cd sous forme ionique (Tableau.1). Nos résultats sont en accord avec une étude précédente soulignant que la modification chimique (revêtement de surface) des points quantique à base de Cd pouvait les protéger de l'ionisation (libération du Cd en phase aqueuse), ce qui pourrait réduire leur accumulation par les vers de terre Eisenia andrei (Stewart et al, 2013). Cependant, dans d'autres recherches, aucune différence n'a été observée dans les niveaux d'accumulation chez les animaux en fonction des formes du métal ; l'argent (Ag) par exemple était disponible dans les traitements aux formes nano, microparticulaire et ionique et a été accumulé aux mêmes niveaux dans les vers polychètes H. diversicolor. En effet après 10 jours d'exposition à des sédiments enrichis aux différentes formes d'Ag à 50 µg/g (ps), les niveaux d'accumulation dans les vers atteignaient $8,5 \pm 6,6,7 \pm 5,8$ et 10 ± 5 $\mu g/g$ (ps) pour les contaminations nanoparticulaire, microparticulaire et ionique, respectivement (Cong et al, 2011).

Or dans le sédiment	Cerveau	Branchies	Tube digestif	Muscle
Pois	sons exposés aux dei	ux formes d'or en abser	nce de vers	
Contrôles	<dt< td=""><td><dt< td=""><td>0,020 ± 0,001</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<></td></dt<>	<dt< td=""><td>0,020 ± 0,001</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	0,020 ± 0,001	<dt< td=""></dt<>
AuNPs 16 µg/g (ps)	<dt< td=""><td>$0,0140 \pm 0,0008$</td><td>$0,22 \pm 0,03$</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	$0,0140 \pm 0,0008$	$0,22 \pm 0,03$	<dt< td=""></dt<>
AuNPs 55 µg/g (ps)	<dt< td=""><td>$0,029 \pm 0,001$</td><td>1,4 ± 0,3</td><td><dt< td=""></dt<></td></dt<>	$0,029 \pm 0,001$	1,4 ± 0,3	<dt< td=""></dt<>
KAuCl₄ 16 μg/g (ps)	<dt< td=""><td>$0,0120 \pm 0,0008$</td><td>0,46 ± 0,05</td><td>$0,060 \pm 0,000$</td></dt<>	$0,0120 \pm 0,0008$	0,46 ± 0,05	$0,060 \pm 0,000$
KAuCl₄ 55 μg/g (ps)	<dt< td=""><td>0,21 ± 0,03</td><td>3,16 ± 0.52</td><td>0,16 ± 0,04</td></dt<>	0,21 ± 0,03	3,16 ± 0.52	0,16 ± 0,04
Poics	sons avnosás auv dau	iv farmas d'ar an nrása	nco do vors	

Contrôles	$0,0135 \pm 0,0012$	$0,05 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,01$	$0,038 \pm 0,015$
AuNPs 14 µg/g (ps)	0,15 ± 0,03	$0,08 \pm 0,009$	0,61 ± 0,06	$0,19 \pm 0,038$
AuNPs 56 µg/g (ps)	$0,28 \pm 0,04$	0,66 ± 0,21	2,4 ± 0,7	0,33 ± 0,019
KAuCl₄ 14 μg/g (ps)	$0,065 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,05$	$0,035 \pm 0,01$
KAuCl₄ 56 μg/g (ps)	$0,209 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,012$	0,18 ± 0,06	$0,031 \pm 0,007$

< dt : inférieur à la limite de détection ; ps: poids sec.

Dans notre travail de recherche, l'exposition des vers oligochètes aux deux formes d'or montre des différences d'accumulations en fonction des formes d'or et de la présence de poissons zèbres dans la colonne d'eau. En effet lorsque les vers étaient exposés seuls aux AuNPs, les AuNPs étaient 2 fois moins accumulées que la forme ionique, ce qui démontre que la forme nanoparticulaire est moins disponible. En revanche, l'ajout des poissons zèbres dans les unités expérimentales contenant des vers était accompagné d'une diminution des niveaux d'or dans les vers par rapport aux expositions sans poissons. En effet, la concentration d'or dans les vers diminuait par un facteur de 2 pour l'exposition aux AuNPs et par un facteur 4 pour l'exposition à KAuCl₄. Ce qui veut dire que les deux formes d'or deviennent moins disponibles en présence de poissons mais s'accumulent pareillement. Ceci peut être expliqué par la perturbation des vers due aux poissons. Comme il a été déjà précisé précédemment, la voie trophique est la principale voie de contamination des vers à partir du sédiment. En revanche, en présence de poissons les vers changeaient leur comportement (enfouissement moins profond et activité de bioadvection perturbée). La diminution d'accumulation d'or peut être expliquée par le fait que les vers ingéraient moins de particules sédimentaires.

2.2. <u>Accumulation des nanoparticules d'or dispersées dans le sédiment chez les</u> poissons zèbres.

Dans ce travail de recherche, nous avons exposé pour la première fois un vertébré d'eau douce (poisson zèbre) à un sédiment contaminé aux AuNPs, afin d'observer le transfert potentiel des AuNPs dans la colonne d'eau, son éventuelle disponibilité pour le poisson zèbre, et caractériser les effets de cette contamination sur l'organisme choisi (Dedeh *et al*, 2014). L'exposition des poissons zèbres aux AuNPs à 16 et 55 μ g/g (ps) présentait une augmentation des niveaux d'or dans les tissus du poisson zèbre, principalement dans le tube digestif et les branchies (Tableau.2). Les taux d'accumulation observés dans le tube digestif étaient 70 plus élevés que ceux des contrôles après exposition à 55 μ g/g de AuNPs. Ces valeurs peuvent être expliquées par le transfert de l'or depuis les branchies vers le foie ou bien par la contamination des poissons par voie alimentaire qui se nourrissent des

dépôts de matière organique se trouvant en surface, comme les biofilms (Dedeh *et al*, 2014). Ces résultats sont en accord avec l'accumulation de métaux dans les poissons zèbres exposés à un gradient polymétallique (rivière du Lot, France) : les concentrations de Cd les plus élevées ont été observées dans le tube digestif en dépit de l'exposition hydrique (Orieux *et al*, 2011). Les valeurs enregistrées en métal chez le poisson zèbre étaient, respectivement, de 4,6 et 1,9 nmol de Cd/g de tissu dans le tube digestif et les branchies après 3 jours d'exposition à 15 μ g Cd/L. Il a été également observé que les niveaux de bioaccumulation chez les poissons exposés à l'AuNPs étaient 2 moins élevés en comparaison avec les poissons exposés aux KAuCl₄, indiquant ainsi que la forme nanoparticulaire est la moins disponible. En effet, les expositions aux AuNPs présentaient des accumulations très faibles et même en-dessous du seuil de détection dans le cerveau et le muscle (Tableau.2).

Dans ce travail de recherche nous avons aussi exposé pour la première fois un invertébré (tubificidae) et un vertébré d'eau douce (poisson zèbre) à un sédiment contaminé aux AuNPs afin de caractériser l'effet potentiel d'un organisme sur la contamination du deuxième. Cette exposition a présenté des différences d'accumulation par rapport à la forme ionique et en comparaison avec l'exposition des poissons seuls. En effet, à notre grande surprise, les niveaux d'accumulation étaient nettement plus élevés dans le cas de l'exposition aux AuNPs qu'à l'or ionique. À 56 μ g/g d'AuNPs dans le sédiment, les branchies, le tube digestif et le muscle accumulaient respectivement, 6, 2 et 10 fois plus d'or que lors de l'exposition au KAuCl₄. Ce qui démontre que lorsque les poissons étaient exposés en présence de vers, la forme nanoparticulaire devenait la plus disponible.

Nous avons noté que le tube digestif accumulait la plus forte concentration d'or après exposition aux AuNPs, lorsque les poissons étaient exposés en présence de vers, ce qui nous conduit à croire que la principale voie de contamination des poissons zèbres est trophique, en ingérant les vers préalablement contaminés à partir du sédiment. En revanche, l'augmentation d'accumulation d'AuNPs dans les branchies par un facteur 22 après introduction des vers, nous laisse supposer que les AuNPs transférées dans la colonne d'eau peuvent être sous forme d'agrégats d'or supérieur à $0,2 \mu m$ ou bien des NPs associées aux particules sédimentaires mais disponibles pour les poissons, puisque l'or n'est pas quantifiable dans la l'eau filtrée.

D'après les résultats de bioaccumulation obtenus, deux voies de contamination au AuNPs possibles peuvent être déduites : la voie directe qui représente l'or disponible dans la colonne d'eau et la voie trophique qui peut être soit les particules de sédiment en surface ou bien les vers chargés d'AuNPs.

Tubifex exposés aux trois formes de Cd						
	CdSNPs	CdMPs	CdCl ₂			
Cd dans le sédiment	0,59 µg/g (ps)	0,34 µg/g (ps)	0,6µg/g (ps)			
Cd dans les vers	0,08 µg/g (pf)	0,07 µg/g (pf)	0,76 µg/g (pf)			
Nombre de sites d'hybridation	OPB7 =	OPB7 🗸	OPB7 ↓			
	OPA9 🗸	OPA9 🗸	OPA9 🗸			

Tableau 3. Récapitulatif des sites d'hybridation dans l'ADN génomique des vers tubificidae obtenus durant nos expérimentations

Tubifex exposés aux deux formes d'or

	Au	NPs	$KAuCl_4$		
Au dans le sédiment Au dans les vers	14 μg/g (ps) 1,03 μg/g (pf)	56 μg/g (ps) 2,66 μg/g (pf)	14 μg/g (ps) 1,05 μg/g (pf)	56 μg/g (ps) 5,08 μg/g (pf)	
Nombre de sites	ОРВ7 ↓	OPB7 =	OPB7 =	OPB7 =	
d'hybridation	OPA9	OPA9 =	OPA9 ↓	орая ↓	
	totale des sites)				

Tubifex exposés aux deux formes d'or en présence de poissons zèbres

	AuNI	Ps	KAuCl ₄		
Au dans le sédiment Au dans les vers	14 μg/g (ps) 0,38 μg/g (pf)	56 μg/g (ps) 1,48 μg/g (pf)	14 μg/g (ps) 0,33 μg/g (pf)	56 μg/g (ps) 1,25 μg/g (pf)	
Nombre de sites	OPB7 =	OPB7 =	OPB7 =	OPB7 ↓	
d hyondation	OPA9 =	OPA9 =	OPA9 个	OPA9 ↓	
= : identique au contrôle	e; augmentation,	on, dimunition en comparaison au contrôle.			

ps: poids sec, pf: poids frais

3. Effets génotoxiques des nanoparticules (CdS et Au) sur les tubifex

L'étude menée sur les vers tubifex exposés aux nanoparticules de sulfure de cadmium et d'or nous a permis de mettre en évidence l'impact génotoxique de ces deux nanomatériaux en utilisant la méthode de RAPD-PCR quantitative (Tableau.3). Cette technique permet d'examiner le nombre de création ou de suppression des sites d'hybridation sur l'ADN génomique des animaux contaminés par rapport aux contrôles en utilisant des amorces aléatoires. Cette méthode a déjà été utilisée et validée avec le poisson zèbre pour mettre en évidence la génotoxicité des AuNPs (Geffroy *et al*, 2011), CdSNPs (Ladhar *et al*, 2013) et de l'uranium (Lerebours *et al*, 2013). Cette technique est complétée par l'analyse des profils de Tm qui sont des paramètres efficaces pour détecter les petits changements dans la séquence de l'ADN (Cambier *et al*, 2010). L'induction des dommages à l'ADN a été reconnue avec le stress oxydant provoqué par les radicaux libres, parmi les effets les plus connus des NPs (Moore, 2006; Klaine *et al*, 2008; Canesi *et al*, 2012; Atha *et al*, 2012; Buffet *et al*, 2014a).

Les résultats de RAPD-PCR obtenus après l'exposition des vers tubifex aux formes de cadmium montre l'effet génotoxique du sulfure de cadmium nano et microparticulaire mais aussi du cadmium ionique (CdCl₂). En effet, cette exposition a montré une modification du nombre des sites d'hybridation par les amorces OPB7 et OPA9 sur l'ADN génomique de vers tubifex malgré le faible niveau de cadmium mesuré dans les vers exposés aux formes nano et microparticulaires en comparaison avec les vers exposés au CdCl₂, ce qui met en évidence la forte réactivité des matériaux manufacturés en comparaison avec la forme ionique. On peut conclure que la concentration n'est plus suffisante pour décrire l'effet du contaminant, car au-delà de la concentration, les propriétés de surface, la forme, la taille et bien d'autres paramètres spécifiques aux NPs (Cf Chapitre I) ont un impact sur le comportement et les effets des NPs.

Les résultats de RAPD-PCR obtenus après l'exposition des vers tubifex aux nanoparticules d'or ont mis en évidence un effet génotoxique des AuNPs et ont montré une modification du nombre de site d'hybridation par la sonde OPB7 sur l'ADN génomique ainsi qu'une variation des fréquences des produits de la PCR. À 14 µg/g (ps) d'AuNPs dans le sédiment, le nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPB7 diminuait et plus encore avec l'amorce OPA9, puisque les sites d'hybridation disparaissaient totalement. En revanche, lorsque les vers tubifex étaient exposés aux AuNPs en présence de poissons zèbres, les niveaux d'accumulation d'or dans les vers diminuaient par un facteur 2,7 et 1,8 pour les concentrations 14 et 56 μ g/g (ps) dans le sédiment, respectivement. Ce qui se traduisait par une modification du nombre de sites d'hybridation et de la fréquence des Tm, relativement à l'exposition des vers en absence de poissons. En effet, les amorces OPB7 et OPA9 ne présentaient plus de différence dans leur nombre de sites d'hybridation sur l'ADN génomique par rapport au contrôle, mais présentaient des différences en termes de produits de PCR, telles que visualisées par les Tm de ces produits. Ce qui veut dire que même en présence de poissons et malgré la diminution d'accumulation des AuNPs, celles-ci restaient encore réactives et induisaient des altérations de l'ADN.

Chez les invertébrés, il a été démontré que les nanoparticules pouvaient présenter des effets génotoxiques : chez les polychètes *H. diversicolor* exposés durant 10 jours à un sédiment contaminé à 25 et 50 μ g/g (ps) de nano et microparticule d'argent (Cong *et al*, 2011), chez les moules *Elliption complanata* exposées durant 24 h à 1,6, 4 et 8 mg/L de CdTe NPs (Gagné *et al*, 2008a), chez les moules *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 25 jours à 10 μ g/L de nanoparticules d'oxyde de cuivre et d'argent (Gomes *et al*, 2013), et chez l'escargot d'eau douce *Lymnaea luteola* exposé pendant 24 et 96 h à 32 μ g/ml (Daoud *et al*, 2012). Les altérations de l'ADN génomique peuvent être causées directement par les nanoparticules en se liant à l'ADN ou bien indirectement par le stress oxydant provoqué par les nanoparticules (Donaldson *et al*, 2010; Singh *et al*, 2009). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) après une

contamination aux nanoparticules a été démontrée dans les cellules d'adénocarcinome humaines (Lovrić *et al*, 2005), les cellules de neuroblastome humaines (Choi *et al*, 2007), et dans les branchies des moules (Gagné *et al*, 2008a) exposées à des nanoparticules de cadmium.

4. Effet des nanoparticules de sulfure de cadmium sur l'activité de bioturbation des vers tubifex.

Les résultats de la distribution des luminophores et le modèle de bioadvection-biodiffusion dans les unités contrôles confirment l'activité de bioturbation des vers après enfouissement des particules fluorescentes jusqu'à 6 cm de profondeur. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés (McCall et Fisher, 1980; Ciutat *et al*, 2005) indiquant que ces vers convoyeurs conduisent, par leur mode de nutrition, à la remobilisation du sédiment. Les luminophores, qui sont assez gros en taille et ne sont pas ingérés par les tubificidés migrent verticalement dans le sédiment aussi loin que la zone d'ingestion. (Juget, 1978; Rodriguez *et al*, 2001).

Les résultats des traceurs fluorescents démontrent après exposition des vers tubificidae que les CdSNPs et le CdCl₂ présentent des effets sur le mouvement des vers. En effet, après exposition aux CdSNPs, l'enfouissement des traceurs à 4 cm de profondeur au lieu de 6 cm et la diminution du coefficient de bioadvection témoignent du ralentissement du mouvement des vers potentiellement causé par la forme nanoparticulaire du CdS. Nos résultats sont en accord avec ceux montrant que le mouvement des vers *H. diversicolor* est impacté par les CdSNPs (10 μ g/L) dispersés dans de l'eau de mer (Buffet *et al*, 2014b). Il a été démontré que les nanomatériaux peuvent affecter le comportement de locomotion des invertébrés aquatiques. Les nanoparticules d'oxyde de cuivre affectent le comportement fouisseur de *Scrobicularia plana* (Buffet *et al*, 2011). Chez *H. divesicolor*, des comportements fouisseurs et alimentaires déficients ont été observés après exposition à un sédiment contaminé par des nanoparticules d'oxyde de zinc (Buffet *et al*, 2012b). L'impact des nanoparticules d'oxyde d'aluminium sur la locomotion

des nématodes *Caenorhabditis elegans* est dû au stress oxydatif généré par les nanoparticules (Li *et al*, 2012a). Après exposition des vers aux CdCl₂, l'absence de teneur maximale en luminophores enfouis en profondeur dans les profils verticaux des traceurs et la diminution du coefficient de bioadvection mettent en évidence l'effet du CdCl₂ sur les vers, suggérant que l'activité de bioadvection spécifque aux *Tubifex tubifex* peut être modifiée après exposition au cadmium ionique. En outre, des effets sur les comportements des invertébrés (l'activité d'enfouissement, le taux d'alimentation) ont été précédemment observés chez *S. plana* ou *H. diversicolor* exposés aux nanoparticules de CuO et d'or (Buffet *et al*, 2011; Pan *et al*, 2012), ou les escargots *Potamopyrgus antipodarum* exposés aux CuNPs (Pang *et al*, 2012).

5. Effets génotoxiques des nanoparticules d'or sur le poisson zèbre

Dans notre travail de recherche (Tableau.4), les résultats de la méthode RAPD-PCR quantitative ont souligné les altérations de l'ADN génomique du poisson zèbre induites par l'exposition aux AuNPs incluses dans le sédiment. Cet impact a été observé aussi bien en absence qu'en présence de vers tubifex, mais différemment. En effet, lorsque les poissons étaient exposés seuls au AuNPs, nous avons observé une création de sites d'hybridation relatifs à l'amorce OPB7 et des variations des fréquences des produits de PCR. En revanche, lorsque les poissons zèbres étaient exposés en présence de vers tubifex, les effets génotoxiques des nanoparticules d'or étaient observés seulement sous forme de variation des produits de PCR. Ne pas observer de modification du nombre de sites d'hybridation ne veut pas forcément dire qu'il n'y a pas eu de modification de ces sites mais que le nombre de créations a pu compenser celui de suppressions de ces sites. Cette différence observée entre les poissons exposés en présence et en absence de vers peut être due aux différents niveaux d'accumulation d'or déterminés dans les tissus des poissons

	Nombre de sites		Variation de la fréquence des produits de PCR ^a		
	d hyon	Poissons exp	osés seuls		
AuNPs 16 μg/g (ps)	ОРВ7 🕇	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 +	
AuNPs 55 µg/g (ps)	орв7 🕇	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 =	
KAuCl ₄ 16 μg/g (ps)	ОРВ7	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 =	
KAuCl ₄ 55 μg/g (ps)	OPB7 =	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 =	
	P	oissons exposés	avec les tubife	<u>x</u>	
AuNPs 14 µg/g (ps)	OPB7 =	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 +	
AuNPs 56 µg/g (ps)	OPB7 =	OPB11 =	OPB7 +	OPB11 +	
KAuCl ₄ 14 μg/g (ps)	OPB7	OPB11	OPB7 =	OPB11 +	
KAuCl ₄ 56 μg/g (ps)	OPB7	OPB11	OPB7 +	OPB11 +	

Tableau 4. Récapitulatif de la variation des sites d'hybridation dans l'ADN génomique des poissons zèbres, et de celle de la fréquence des produits de PCR obtenue durant nos expérimentations.

^a Telle que visualisée par l'occurrence des T*m* par classe de température. = : identique au contrôle ; \uparrow augmentation, diminution en comparaison au contrôle.

En effet il a été noté une augmentation très conséquente des niveaux d'or dans les 4 tissus du poisson zèbre après exposition aux AuNPs en présence de vers tubifex. Rappelons qu'à 55 μ g/g d'AuNPs dans le sédiment, les poissons zèbres accumulaient 2 et 22 fois plus d'or dans le tube digestif et les branchies, respectivement, comparés à ceux exposés en absence de vers. Des différences similaires ont été également observées entre les poissons exposés en présence et en absence de vers après expositions au KAuCl₄, ce qui peut être également expliqué par les différences d'accumulations observées entre les deux expositions. En effet, il a été noté une très forte diminution des niveaux d'or dans les tissus du poisson zèbre (branchies, tube digestif et muscle) après exposition au KAuCl₄ en présence de vers tubifex. Dans le tube digestif, le niveau d'or diminuait par un facteur 17 après exposition à 56 μ g/g KAuCl₄ en présence de vers.

Plusieurs études ont démontré que les AuNPs peuvent modifier le matériel génomique en se liant à l'ADN ce qui peut provoquer des changements de conformation (Goodman *et al*, 2010). Les AuNPs provoquent des dommages de l'ADN dans les cellules humaines HepG2 (Fraga *et al*, 2013) et chez le poisson zèbre (Geffroy *et al*, 2011). D'autres nanoparticules métalliques peuvent également déclencher des dommages de l'ADN aux poissons telles celles d'argent, qui induisent des aberrations chromosomiques et l'aneuploïdie dans les cellules de medaka (Wise *et al*, 2010). En outre les NPs d'argent peuvent causer des lésions de l'ADN par deux voies : la voie directe, par interaction avec l'ADN, puisque les NPs ont été détectées dans les noyaux des cellules des embryons de poissons zèbres et les cellules humaines (Asharani *et al*, 2008, 2009), et par un effet indirect conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial, la production de ROS, la libération des protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie, qui à leur tour, déclenchent des dommages de l'ADN et des aberrations chromosomiques (Asharani *et al*, 2008).

		Poissons exposés seuls		Poissons exposés avec les	
				vers	
Tissus	Gènes	16 µg/g	55 μg/g	14 μg/g	56 μg/g
		AuNPs	AuNPs	AuNPs	AuNPs
Cerveau	[Au] _{tissu}	< dt	< dt	0,15 µg/g (pf)	0,28 μg/g (pf)
Stress oxydant	sod 1	=			=
	sod 2	=			=
Métabolisme mitochondrial	cox1	=			
Détoxification	mt2	=		=	=
	hsp70	=		=	\rightarrow
Réparation de l'ADN	gaad	=		=	=
	rad51	=	=	=	=
Neurotransmission	ache	=		=	=
Branchies	[Au] _{tissu}	0,01 μg/g (pf)	0,03 µg/g (pf)	0,08 µg/g (pf)	0,66 µg/g (pf)
Stress oxydant	sod 1	=	=	~	\rightarrow
	sod 2	\rightarrow	\rightarrow		=
Métabolisme mitochondrial	cox1	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	
Détoxification	mt2	=	=	=	
	hsp70	=	=	=	
Réparation de l'ADN	gaad				=
	rad51	\rightarrow	\rightarrow		
Neurotransmission	ache	\rightarrow	=	=	=
Appareil digestif	[Au] _{tissu}	0,22 μg/g (pf)	1,4 µg/g (pf)	0,61 µg/g (pf)	2,4 µg/g (pf)
Stress oxydant	sod 1	=	=	\rightarrow	=
	sod 2	=	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow
Métabolisme mitochondrial	cox1	=	\rightarrow	\rightarrow	=
Détoxification	mt2	=	=	=	=
	hsp70	=	=	=	=
Réparation de l'ADN	gaad	\rightarrow	=	=	=
	rad51				=
Neurotransmission	ache	-	=	\rightarrow	=
<u>Muscles</u>	[Au] _{tissu}	< dt	< dt	0,19 µg/g (pf)	0,33 µg/g (pf)
Stress oxydant	sod 1	=	\rightarrow	=	=
	sod 2	=	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow
Métabolisme mitochondrial	cox1	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow
Détoxification	mt2		\rightarrow	\rightarrow	=
	hsp70	\rightarrow	\rightarrow		=
Réparation de l'ADN	gaad	=	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow
	rad51	\rightarrow	=	\rightarrow	\rightarrow
Neurotransmission	ache	\rightarrow	\rightarrow	=	\rightarrow

Tableau.5. Expressions différentielles des gènes sélectionnés dans les tissus des poissons après 20 jours d'exposition aux AuNPs.

=: identique au témoin, < dt : inférieur à la limite de détection

→ répression de l'expression du gène ; → surexpression de l'expression du gène.

6. Modulation de l'expression génétique chez le poisson zèbre en réponse à la contamination aux nanoparticules d'or.

L'analyse génétique que nous avons effectuée dans ce travail de recherche s'est portée sur le choix de gènes spécifiques (Tableau.5). Ces 8 gènes sont impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, les mécanismes de détoxification, la réparation de l'ADN et la neurotransmission. Nos résultats mettent en évidence l'effet des nanoparticules d'or sur l'expression des gènes chez les poissons zèbres en présence et en absence de vers tubifex.

En effet, nous avons montré que l'exposition des poissons zèbres seuls aux AuNPs (55 μ g/g) exerce une influence sur la réponse des gènes et provoque une réponse adaptative dans le cerveau sous forme d'induction de la majorité des gènes sélectionnés malgré la faible concentration d'Au détecté dans ce tissu (inférieur à la limite de détection). Ce qui correspond à la protection de l'animal contre la contamination aux AuNPs. L'induction des gènes *sod1* et *sod2* peut être expliquée par la mise en place de la réponse cellulaire contre le stress oxydant. La surexpression du gène *achE* impliqué dans l'activité de l'acétylcholinestérase est corrélée avec l'augmentation de l'activité de l'enzyme (AchE), ce qui montre que les AuNPs influencent l'activité de neurotransmission dans le cerveau. Dans les branchies, le cerveau et l'appareil digestif, les AuNPs induisent la surexpression du gène *gaad* impliqué dans la réparation de l'ADN, ce qui est bien corrélé avec les résultats de génotoxicité. Nous pouvons ainsi suggérer le déclenchement d'un processus de réparation d'ADN activé après altérations de l'ADN induites par les AuNPs (Dedeh *et al*, 2014).

En revanche, lorsque les poissons étaient exposés en présence de vers, des différences d'expressions étaient observées dans la majorité des tissus. Dans le cerveau et à 14 μ g/g d'AuNPs, l'apparition d'une réponse adaptative contre le stress oxydant était bien corrélée avec l'augmentation du niveau d'or. Dans les branchies, la réponse majoritairement contre-adaptative observée avec les poissons exposés seuls se transformait en réponse adaptative après l'ajout des vers tubifex et se traduisait par l'induction de la majorité des gènes. Dans l'appareil digestif,

une réponse contre-adaptative était observée à 14 μ g/g d'AuNPs se traduisant par l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. Notons que ce tissu enregistrait le niveau le plus élevé d'or après exposition en présence de vers, avec une concentration d'or arrivant jusqu'à 2,4 μ g/g après exposition à 56 μ g/g d'AuNPs. Dans le muscle, malgré l'augmentation de la concentration d'or après exposition des poissons zèbres aux AuNPs en présence de vers, l'expression des gènes présentait une réponse contre-adaptative similaire à la réponse des poissons exposés aux AuNPs en absence de vers.

De nombreux auteurs ont étudié l'altération de l'expression génétique due aux nanoparticules chez le poisson zèbre. L'exposition alimentaire de *Danio rerio* aux AuNPs et CdSNPs conduisait à la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, la détoxification, l'apoptose, le métabolisme mitochondrial et le stress oxydant (Geffroy *et al*, 2011; Ladhar *et al*, 2013). Les AgNPs entraînaient d'importantes modifications dans l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la synthèse protéique après 24 h d'exposition chez les embryons de *Danio rerio* (Van Aerle *et al*, 2013), et les AuNPs perturbaient l'expression des gènes régulant l'apoptose, le développement et la pigmentation de l'œil (Kim *et al*, 2013).

7. Bilan final

Réponses aux principales problématiques posées dans ce travail de recherche :

- Les nanoparticules sont-elles biodisponibles pour les organismes vivants à l'interface entre le compartiment sédimentaire et la colonne d'eau en cas de contamination du sédiment ? Oui, ceci a été démontré avec les niveaux élevés de Cd et Au détectés dans les vers tubificidae après chaque contamination.
- La contamination du sédiment aux nanoparticules (CdS, Au) présente-elle un effet toxique sur les organismes vivants à l'interface entre le compartiment sédimentaire et la colonne d'eau (vers aquatiques) au niveau moléculaire? **Oui,** ceci a été démontré par les dommages à l'ADN détectés dans le matériel génomique des vers après chaque contamination en utilisant pour la première fois la méthode de RAPD-PCR quantitative sur ces organismes.
- La bioturbation engendrée par le mouvement des vers en surface contribue-t-elle au transfert du métal vers la colonne d'eau ? Ce métal devient-il biodisponible pour les organismes vivant dans le compartiment sus-jacent (poisson) ? **Oui, il** y a un transfert potentiel du métal du sédiment vers la colonne d'eau. Ce métal peut être biodisponible (cas des CdSNPs). Pour l'or, le métal transféré est associé aux particules sédimentaires, ou bien sous forme d'amas colloïdaux de taille supérieure à 0,2 μ m. Les poissons sont contaminés par consommation des vers, et possiblement par les amas de NPs d'or colloïdaux (taille > 0,2 μ m) (fig.1).
- Quels sont les effets du sédiment dopé aux nanoparticules d'or sur le poisson zèbre (enzymatiques et génétiques)? En plus des fortes accumulations d'or dans l'appareil digestif et les branchies des poissons, notre étude a montré que les AuNPs augmentent l'activité de l'acétylcholinestérase, provoquent des altérations de l'ADN et engendrent une modification de l'expression génétique dans plusieurs tissus.

8. Perspectives de recherches

Les principales perspectives qui découlent de notre travail de recherche s'inscrivent dans une démarche qui a pour objectif d'approfondir et de diversifier certaines approches, pour compléter et renforcer l'analyse interprétative de nos résultats :

- Il serait très appréciable de pouvoir distinguer entre la distribution du métal au sein de la phase particulaire et dissoute par des analyses géochimiques, afin de déterminer la spéciation chimique sur les différentes fractions colloïdales du métal et analyser les modifications engendrées par le mouvement des animaux, via les transferts entre les compartiments sédimentaire et la colonne d'eau.
- Il serait intéressant d'effectuer des analyses de microscopie électronique à transmission (TEM), pour permettre la localisation des NPs au niveau tissulaire et d'observer leurs effets au niveau cellulaire ; la TEM constitue un outil très performant pour obtenir des résultats plus fins et précis.
- Afin de remédier aux résultats de bioaccumulation biaisés par les concentrations métalliques naturellement présentes dans le sédiment et les animaux, il serait judicieux d'utiliser à l'avenir des NPs marquées avec des isotopes stables ou radioactifs.
- Des analyses enzymatiques pourraient être envisagées pour pouvoir corréler les résultats des expressions génétiques obtenues lors de notre travail de recherche et comprendre ainsi le mécanisme de toxicité des NPs.
- Une étude multipliant les échantillonnages pourrait être projetée afin d'observer la cinétique de toxicité des NPs dans le temps, évaluer la pénétration des NPs dans l'organisme et cerner les mécanismes de toxicité.

CHAPITRE V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

\mathcal{A}

Ahamed M, Siddiqui MA, Akhtar MJ, Ahmad I, Pant AB, Alhadlaq HA. 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 396: 578-83.

Allen HJ, Impellitteri CA, Macke DA, Heckman JL, Poynton HC, Lazorchak JM, Govindaswamy S, Roose DL, Nadagouda MN. 2010. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 29: 2742-50.

Ambrosone A, Mattera L, Marchesano V, Quarta A, Susha AS, Tino A, Rogach AL, Tortiglione C. 2012. Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. Biomaterials 33 :1991-2000.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. <u>Toxicol Lett</u> 179: 93- 100.

Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata. <u>Sci Total Environ</u> 407: 1461-1468.

Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveettil S. 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. <u>Nanotoxicology</u> 5: 43-54

AshaRani PV, Low Kah Mun G, HandeMP, Valiyaveettil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. <u>ACS Nano</u> 3:279–90.

Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveettil S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. <u>Nanotechnology</u> 19: 255102

Atha DH1, Wang H, Petersen EJ, Cleveland D, Holbrook RD, Jaruga P, Dizdaroglu M, Xing B, Nelson BC. 2012. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. <u>Environ Sci Technol</u> 46:1819–27.

Atienzar FA, Billinghurst Z, Depledge MH. 2002. 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. <u>Environ Pollut</u>. 120: 735-738.

Atienzar FA, Conradi M, Evenden A, Jha A, Depledge M. 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using RAPD: comparaison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. <u>Environmental Toxicol Chem</u> 18: 2275-2282.

Atienzar FA, Jha AN. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. <u>Mutat Res</u> 613: 76-102.

Atienzar, FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. 2000a. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. <u>Aquat Toxicol</u>. 50: 1-12.

Atienzar, FA, Evenden A, Jha A, Savva D, Depledge M. 2000b. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. BioTechniques 28: 52-54.

Atienzar, FA, Jha AN. 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. <u>Mutat Res</u> 552: 125-140.

Avel M. 1959. Classe des Annélides Oligochètes. In Précis de Zoologie V, P.P. Grassé (Ed), Masson, Paris: 224-470.

\mathcal{B}

Back H. 1990. Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. <u>Oecologia</u> 85: 226-232.

Bai W, Zhang ZY, Tian WJ, He X, Ma YH, Zhao YL, Chai ZF. 2010. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. J Nanopart Res 12: 1645-1654.

Banni M, Chouchene L, Said K, Kerkeni A, Messaoudi I. 2011. Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish *Danio rerio*. <u>Biometals</u> 24:981-92.

Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. <u>Small</u> 16:1897–1910.

Bayne CJ, Moore MN. 1998. Non-lymphoid immunologic defenses in aquatic invertebrates and their value as indicators of aquatic pollution. In: Zelikoff JT, editor. Eco Toxicology: responses, biomarkers and risk assessment, Published for OECD by sos Publications, Fair Haven, New Jersey; p. 243–61.

Béchard KM, Gillis PL, Wood CM. 2008. Trophic transfer of Cd from larval chironomids (*Chironomus riparius*) exposed via sediment or waterborne routes, to zebrafish (*Danio rerio*): tissue-specific and subcellular comparisons. <u>Aquat Toxicol</u> 90:310-21.

Bernard G. 2013. Mesures expérimentales et modélisation du remaniement sédimentaire dans le bassin d'Arcachon. Thèse de doctorat N° 4821. Université Bordeaux 1.

Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis ASG. 2004. Cell response to dextranderivatised iron oxide nanoparticles post internalization. <u>Biomaterials</u>: 25:5405-13.

Bervoets L, Blust R, de Wit M, Verheyen R. 1997. Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in Tubificid worms and Chironomid larvae. Environ Pollut 95: 345-356.

Bhattacharya P, Lin SJ, Turner JP, Ke PC. 2010. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. J Phys Chem C 114: 16556-61.
Bian SW, Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Grassian VH. 2011. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. <u>Langmuir</u> 27: 6059-6068.

Biswas P, Wu P. 2005. Nanoparticles and the environment. <u>J Air Waste Manag Assoc</u> 55: 708–746.

Blair NE, Levin LA, DeMaster D, Plaia G. 1996. The short term fate of fresh algal carbon in continental slope sediments. <u>Limnol Oceanogr</u> 41:1208–1219.

Blaser SA, Scheringer M, Macleod M, Hungerbuhler K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. <u>Sci Total Environ</u> 390: 396–409.

Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. <u>Environ Pollut</u> 158: 41-47.

Bouché ML, Habets F, Biagianti-Risbourg S, Vernet G. 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. Ecotox Environ Saf 46: 246-251.

Bourdineaud JP, Rossignol R, Brèthes D. 2013. Zebrafish: a model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial bioenergetics. Int J Biochem Cell Biol 45: 16-22

Boxall ABA, Chaudhry Q, Sinclair C, Jones A, Aitken R, Jefferson B, Watts C. 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. <u>Anal Chem</u> 72:248-254

Brayner R, Dahoumane S A, Yepremian C, Djediat C, Meyer M, Coute A, Fievet F. 2010. ZnO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Ecotoxicological Studies. Langmuir 26: 6522-6528.

Brayner R, Sicard C, Ben Sassi H, Beji Z, Yepremian C, Coute A, Fievet F. 2011. Design of ZnO nanostructured films: Characterization and ecotoxicological studies. <u>Thin Solid Films</u> 519: 3340-3345.

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. <u>Adv Drug Deliv Rev</u> 54:631–51.

Brinkhurst RO, Cook DG. 1974. Aquatic Earthworms (Annelida: Oligochaeta). In: Pollution ecology of freshwater invertebrates, Hart C. W. and S. L. Fuller (eds.) Academic Press: 143-156.

Brinkhurst RO. 1971. A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. In: Aquatic Oligochaeta of the world. Brinkhurst R. O. and Jamieson B. G. (Eds) Oliver & Boyd, Edinburgh, 860 p.

Brook RD. 2002. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. <u>Circulation</u> 105:1534–6.

Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> 175:191–9.

Buffet PE, Amiard-Triquet C , Dybowska A, Risso-de Faverney C , Guibbolini M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012 b. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. Ecotox Environ Saf 84: 191-198.

Buffet PE, Pan JF, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, 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. <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> 89:117-24.

Buffet PE, Poirier L, Zalouk-Vergnoux A, Lopes C, Amiard JC, Gaudin P, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Perrein-Ettajani H, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2014b. 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.

Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C . 2012a. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). Environ Sci Technol 47: 1620-1628.

Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, 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 47:1220–8.

Buffet PE, Tankoua OF, Pan JF, Berhanu D, Herrenknecht C, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Bérard JB, Risso C, Guibbolini M, Roméo M, Reip P, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. <u>Chemosphere</u> 84: 166-174.

Buffet PE, 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. 2014a. 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*. <u>Sci Total Environ</u>. 471:1151–1159.

Buffet PE. 2012. Evaluation du risque environnemental des nanoparticules métalliques: biodisponibilité et risque potentiel pour les deux espèces clés des écosystèmes estuariens. Thése de doctorat. Université de Nantes.

Buffle J, Leppard GG. 1995. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material. <u>Environ Sci Technol</u> 29:2169–2175.

Buffle J, Wilkinson KJ, Stoll S, Filella M, Zhang J. 1998. A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach. <u>Environ Sci</u> <u>Technol</u> 32: 2887–2899.

Burnison BK, Meinelt T, Playle R, Pietrock M, Wienke A, Steinberg CE. 2006. Cadmium accumulation in zebrafish (*Danio rerio*) eggs is modulated by dissolved organic matter (DOM). <u>Aquat Toxicol</u> 79:185-91

C

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. <u>Int Microbiol</u> 3:3-8

Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> 73:312-9

Campbell CT. 2004. The active site in nanoparticle gold catalysis. Science, Vol. 306, pp. 234-235.

Campbell PGC, Lewis AG, Chapman PM, Crowder AA, Fletcher WK, Imber B, Luoma SN, Stokes PM, Winfrey M. 1988. Biologically available metals in sediments. National Research Council Canada, Publication number NRCC n° 27694. Ottawa, 298 p.

Canesi L, Ciacci C, Betti M, Fabbri R, Canonico B, Fantinati A, Marcornini A, Pojana G. 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. <u>Environ Int</u> 34: 1114-1119.

Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G. 2012. Bivalve molluses as a unique target group for nanoparticle toxicity. <u>Mar Environ Res</u> 76:16–21.

Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G. 2010a. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, $TiO_{(2)}$, $SiO_{(2)}$) on Mytilus hemocytes. <u>Aquat Toxicol</u> 96: 151-158.

Canesi L, Fabbri R, Gallo G, Vallotto D, Marcomini A, Pojana G. 2010b. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₍₂₎, Nano-SiO₍₂₎). <u>Aquat Toxicol</u> 100: 168-177.

Casals E, Vázquez-Campos S, Bastús NG, Puntes V. 2008. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. <u>Trends Anal Chem</u> 27: 672–683.

CE (Communauté Européenne). 2001a. Directive du Conseil n° 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses – Annexe 5 - Partie C.14 - Poisson, Essai sur la croisance des juvéniles [Modifiée par la directive n° 2001/59/CE du 6 août 2001], Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE), p. 17.

CE (Communauté Européenne). 2001b. Directive du Conseil n° 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses – Annexe Partie C.15 - Poisson, Essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin [Modifiée par la directive n° 2001/59/CE du 6 août 2001], Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE), p. 18.

Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). <u>AquatToxicol</u> 94: 320-327.

Chan WH, Shiao NH. 2008. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development. <u>Acta Pharmacol Sin</u> 29:259–266.

Chapman PM, Farrel MA, Brinkhurst RO. 1982. Relative tolerance of selected oligochaetes to industrial polluants and environmental factors. <u>Aquatic Toxicol</u> 2: 47-67.

Chapman PM. 2000. Aquatic Oligochaetes are useful for (but underutilized in) Ecological Risk Assassement. (ERA). <u>SETAC Globe</u> 1: 31-33.

Chapman PM. 2001. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. <u>Hydrobiologia</u> 463: 149-169.

Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh SP, Gupta V, Chakrabarti P. 2010. The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the Vibrio cholera ToxR protein. <u>FEBS J</u> 277: 4184-4194.

Chen G, White PA. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. <u>Mutat</u> <u>Res</u> 567:151-225

Cheng XK, Kan AT, Tomsom MB. 2004. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C-60 fullerene. <u>J Chem Eng Data</u> 49:675–83.

Chinnapongse SL, MacCuspie RI, Hackley VA. 2011. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. <u>Sci Total Environ</u> 409: 2443-2450.

Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Roder B, Hackbarth S, Winnik FM. 2007. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. <u>Langmuir</u> 23:1974–1980.

Cho WS, Kim S, Han BS, Son WC, Jeong J. 2009. Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. <u>Toxicol Lett</u> 191:96–102.

Choi AO, Cho SJ, Desbarats J, Lovric J, Maysinger D. 2007. Quantum dot induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. <u>J Nanobiotechnology</u> 5:1.

Choi CHJ, Alabi CA, Webster P, Davis ME. 2010a. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. <u>Proc Natl Acad Sci USA</u> 107:1235–1240.

Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, Yi J, Ryu DY. 2010b. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. <u>Aquat Toxicol</u> 100: 151-159.

Choi O, Dang JD, Kim N-J, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. <u>Wat Res</u> 23: 1974-1980.

Chow ES, Hui MN, Lin CC, Cheng SH. 2008. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. <u>Aquat Toxicol</u> 87:157-69

Ciarelli S, Van Straalen NM, Klap VA, Van Wezel AP. 1999. Effects of sediment bioturbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). Environ Toxicol Chem 18: 318-328.

Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A. 2005a. Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. <u>Environ Toxicol Chem</u> 24:1048-58.

Ciutat A, Boudou A. 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. <u>Environ Toxicol</u> <u>Chem</u> 22:1574-81.

Ciutat A, Gerino M, Boudou A. 2007. Remobilization and bioavailability of cadmium from historically contaminated sediments: influence of bioturbation by tubificids. <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> 68:108-17

Ciutat A, Gerino M, Mesmer-Dudons N, Anschutz P, Boudou A. 2005b. Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> 60:237-46.

Ciutat A. 2003. Impact de la bioturbation des sédiments sur les transferts et la biodisponibilité des métaux -Approches expérimentales Thèse de doctorat N° 2693. Université Bordeaux 1

Clift MJ, Boyles MS, Brown DM, Stone V. 2010. An investigation into the potential for different surface-coated quantum dots to cause oxidative stress and affect macrophage cell signalling in vitro. <u>Nanotoxicology</u> 4:139-149

Colvin VL. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. <u>Nat</u> <u>Biotechnol</u> 21:1166–70.

Colvin VL. 2004. Sustainability for nanotechnology. The Scientist 18:26-7.

Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE. 2011. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. Aquat Toxicol 105: 403-11.

Croteau MN, Dybowska AD, Luoma SN, Valsami-Jones E. 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. <u>Nanotoxicology</u> 5: 79-90.

${\mathcal D}$

Dabbousi BO, RodriguezViejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R, Jensen KF, Bawendi MG. 1997. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. J Phys Chem B 101:9463–9475.

Dabrunz A, Duester L, Prasse C, Seitz F, Rosenfeldt R, Schilde C, Schaumann GE, Schulz R. 2011. Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. <u>Plos One</u> 6:5.

Daoud A ,Saud A , Sudhir K , Maqusood A , Maqsood AS. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. <u>Aquat</u> <u>Toxicol</u> 124: 83 – 90

Dasari TP, Hwang HM. 2010. The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. <u>Sci Total Environ</u> 408: 5817-5823.

Daughton CG. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. <u>Environ</u> <u>Impact Assess Rev 24:711–32</u>.

Dean JM. 1974. The accumulation of ⁶⁵Zn and other Radionuclides by Tubificid worms. <u>Hydrobiologia</u> 45: 33-38.

Deeds JR, Klerks PL. 1999. Metallothionein-like proteins in the freshwater oligochaete *Limnodrilus udekemianus* and their role as a homeostasic mechanism against cadmium toxicity. <u>Enviro Pollut</u> 106: 381-389.

Donaldson K, Poland CA, Schins RPF. 2010. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. <u>Nanotoxicology</u> 4:414–420

Donaldson K, Stone V, Gilmour PS, Brown DM, MacNeeW. 2000. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. <u>Philos Trans R Soc Lond</u> 358:2741–9.

Dowling A. 2004. Development of nanotechnologies. Mater Today 7:30-5.

${\mathcal F}$

Fabrega J, Renshaw JC, Lead JR. 2009. Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. <u>Environ Sci Technol</u> 43: 9004-9.

Fako VE, Furgeson DY. 2009. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. <u>Adv Drug Deliv Rev</u> 61:478-486

Fang XH, Yu R, Li BQ, Somasundaran P, Chandran K. 2010. Stresses exerted by ZnO, $CeO_{(2)}$ and anatase $TiO_{(2)}$ nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea*. J Colloid Interface Sci 348: 329-334.

Faraday M. 1857. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. Philos. Trans. R. Soc. Vol. 147, p. 145.

Farré M, Gajda-Schrantz K, Kantiani L, Barceló D. 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. <u>Anal Bioanal Chem</u> 393:81–95.

Ferry DK. 2008. Nanowires in Nanoelectronics. Science 319: 579-580.

Ferry JL, Craig P, Hexel C, Sisco P, Frey R, Pennington PL, Fulton MH, Scott IG, Decho AW, Kashiwada S, Murphy CJ, Shaw TJ. 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. <u>Nat Nanotechnol</u> 4: 441-444.

Fisher JB, Lick WJ, McCall PL, Robbins JA. 1980. Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. J Geophys Res 85: 3997-4006.

Forstner U and Wittmann GTW. 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2nd edition. Springer-Verlag, New-York, 468 p.

Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. Environ Sci Technol 41: 8484-8490.

Fraser TWK, Reinardy HC, Shaw BJ, Henry TB, Handy RD. 2011. Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes ($C_{(60)}$) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Nanotoxicology 5: 98-108.

G

Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C. 2008a. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. <u>Aquat Toxicol</u> 86:333–340.

Gagné F, Maysinger D, André C, Blaise C. 2008b. Cytotoxicity of aged cadmium-telluride quantum dots to rainbow trout hepatocytes. <u>Nanotoxicology</u> 2:113–120.

Galloway T, Lewis C, Dolciotti I, Johnston BD, Moger J, Regoli F. 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. <u>Environ Pollut</u> 158: 1748-1755.

Garcia A, Espinosa R, Delgado L, Casals E, Gonzalez E, Puntes V, Barata C, Font X, Sanchez A. 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. <u>Desalination</u> 269: 136-141.

García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E. 2011. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. Environ Sci Technol 45: 4630-4636.

Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. <u>Nanotoxicology</u> 6:144-60

George S, Xia TA, Rallo R, Zhao Y, Ji ZX, Lin SJ, Wang X, Zhang HY, France B, Schoenfeld D, Damoiseaux R, Liu R, Lin S, Bradley KA, Cohen Y, Nal AE. 2011. Use of a High-Throughput Screening Approach Coupled with In Vivo Zebrafish Embryo Screening To Develop Hazard Ranking for Engineered Nanomaterials. <u>Acs Nano</u> 5: 1805-1817.

Gilliland FD, Li Y-F, Saxon A, Diaz-Sanchez D. 2004. Effect of glutathione-Stransferase M1 and P1 geneotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. <u>Lancet</u> 363:119–25.

Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ. 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ Sci Techno<u>1</u>45: 9356-62.

Gong N, Shao KS, Feng W, Lin ZZ, Liang CH, Sun YQ. 2011. Biotoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. <u>Chemosphere</u> 83: 510-516.

Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). <u>Biometals</u> 19:225-35.

Goodman CM, Chari NS, Han, G, Hong R, Ghosh P, Rotello VM. 2006. DNA binding by functionalized gold nanoparticles: mechanism and structural requirements. <u>Chem Biol</u> <u>Drug Des</u> 67:297–304.

Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B. 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₍₂₎, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different Regions. <u>Environ Sci Technol</u> 43: 9216-9222.

Gratzel M. 2001. Photoelectrochemical cells. Nature 414:338-344.

Griffitt RJ, Hyndman K, Denslow ND, Barber DS. 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. <u>Toxicol Sci</u> 107: 404-15.

Griffitt RJ, Lavelle CM, Kane AS, Denslow ND, Barber DS. 2013. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. <u>Aquat Toxicol</u> 15:192-200.

Griffitt RJ, Weil R, Hyndman KA, Denslow ND, Powers K, Taylor D, Barber DS. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). Environ Sci Technol 41:8178-86.

Grognet JM. 2008. Nanotechnologies: des sciences de l'information à la pharmacologie. <u>Thérapies</u> 63:1-9.

Gross M. 1999. Travels to the nanoworld: miniature machinery in nature and technology. New York: Plenum Trade: 254 pp.

Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR. 2011. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. <u>Environ Pollut</u> 159: 1551-1559.

Gunnarsson JS, Hollertz K, Rosenberg R. 1999. Effects on organic enrichment and burrowing activity of the polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of tetrachlorobiphenyl in marine sediments. <u>Environ Toxicol Chem</u> 18: 1149-1156.

Gustafsson O, Gschwemd G. 1997. Aquatic colloids: Concepts, definitions and current challenges. <u>Limnol Oceanogr</u> 42:517–528.

\mathcal{H}

Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusk, *Mytilus edulis*. <u>Aquat Toxicol</u> 74, 205-217.

Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. 2004. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. <u>Phys Med Biol</u> 49:309-15.

Hall S, Bradley T, Moore JT, Kuykindall T, Minella L. 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale $TiO_{(2)}$ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on $TiO_{(2)}$ toxicity. <u>Nanotoxicology</u> 3: 91-97.

Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. 2008a. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. <u>Ecotoxicology</u> 17:315–325.

Handy RD, Von der Kammer F, Lead JR, Hassellov M, Owen R, Crane M. 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. <u>Ecotoxicology</u> 17: 287-314.

Hao LH, Wang ZY, Xing BS. 2009. Effect of sub-acute exposure to $TiO_{(2)}$ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). J Environ Sci China 21: 1459-1466.

Hardman R. 2006. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. <u>Environ Health Persp</u> 114:165–172.

Hare L, Campbell PGC, Tessier A, Belzile N. 1989. Gut sediments in burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*): their contribution to animal trace element burdens, their removal and the efficacy of a correction for their presence. <u>Can J Fish Aquat Sci</u> 46: 451-456.

Harper SL, Carriere JL, Miller JM, Hutchison JE, Maddux BL, Tanguay RL. 2011. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. <u>ACS Nano</u> 5:4688-97

Harrison RM, Harrad SJ, Lead JR. 2003. The global disposition of contaminants. In Hoffman DA, Rattner BA, Burton GA, Cairns J, eds, Handbook of Ecotoxicology, 2nd ed. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 633–651.

Hartmann NB, Von der Kammer F, Hofmann T, Baalousha M, Ottofuelling S, Baun A. 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. <u>Toxicology</u> 269: 190-197.

Heinlaan M, Kahru A, Kasemets K, Arbeille B, Prensier G, Dubourguier HC. 2011. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: a transmission electron microscopy study. Water Res 45: 179-90.

Heinrichs H, Schulz-Dobrick B, Wedepohl KH. 1980. Terrestrial Geochemistry of Cd, Bi. Ti, Pb, Zn and Rb. <u>Geochim Cosmochim Acta</u> 44: 1519-1532.

Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. 2002. Nanoparticles—known and unknown health risks. J Nanobiotechnol 2:12

Hopkins DS, Pekker D, Goldbart PM, Bezryadin A. 2005. Quantum interference device made by DNA templating of superconducting nanowires. Vol. 308, pp. 1762-1765.

Howard CV. 2004. Small particles - big problems. Int Lab News 34:28-9.

Hsu T, Huang KM, Tsai HT, Sung ST, Ho TN. 2013. Cadmium (Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. <u>Aquat Toxicol</u> 126:9-16.

Hull MS, Chaurand P, Rose J, Auffan M, Bottero JY, Jones JC, Schultz IR, Vikesland PJ. 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloidally stable gold nanoparticles. <u>Environ Sci Technol</u> 45: 6592-9.

Hund-Rinke K, Simon M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles TiO₂ on algae and daphnids. <u>Environ Sci Pollut Res</u> 13: 225-232.

I

ISO (International Organization for Standardization), 1996a, Norme ISO 7346-1 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téleostei, Cyprinidae)] - Partie 1 : Méthode statique.

ISO (International Organization for Standardization), 1996b, Norme ISO 7346-2 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téleostei, Cyprinidae)] - Partie 2 : Méthode semi-statique.

ISO (International Organization for Standardization), 1996c, Norme ISO 7346-3 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téleostei, Cyprinidae)] - Partie 3 : Méthode avec renouvellement continu.

Ispas C, Andreescu D, Patel A, Goia DV, Andreescu S, Wallace KN. 2009. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish. <u>Environ Sci Technol</u> 43:6349-56.

J

Johnston BD, Scown TM, Moger J, Cumberland SA, Baalousha M, Linge K, van Aerle R, Jarvis K, Lead JR, Tyler CR. 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₍₂₎, CeO₍₂₎, and ZnO to Fish. <u>Environ Sci Technol</u> 44: 1144-1151.

Jovanovic B, Anastasova L, Rowe EW, Zhang YJ, Clapp AR, Palic D. 2011. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). Ecotoxicol Environ Saf 74: 675-683.

Juget J. 1978. The particle size of the sediment texture and diet oligochaetes limnicoles. <u>Hydrobiologia</u> 65: 145-154

Ju-Nam Y, Lead JR. 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. <u>Sci Total Environ</u> 400:396–414.

${\mathcal K}$

Kadar E, Tarran GA, Jha AN, Al-Subiai SN. 2011. Stabilization of engineered zerovalent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermiotoxicity. <u>Environ Sci</u> <u>Technol.</u> 45:3245-51.

Kai Y, Komazawa Y, Miyajima A, Miyata N, Yamakoshi Y. 2003. Fullerene as a novel photoinduced antibiotic. <u>Fulle Nanotub Car N</u> 11:79–87.

Karickhoff SW, Morris KR. 1985. Impact of tubificid oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. <u>Environ Sci Technol</u> 19: 51-56.

Khangarot BS. 1991. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller). <u>Bull Environ Contam Toxicol</u> 46: 906-912.

Kim D, El-Shall H, Dennis D, Morey T. 2005. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. <u>Colloids Surf B</u> 40:83–91.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 3 : 95-101.

Kim KT, Klaine SJ, Cho J, Kim SH. Kim SD. 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO_2 nanoparticles according to size fraction. <u>Sci Total</u> Environ 408: 2268-2272.

Kim KT, Zaikova T, Hutchison JE, Tanguay RL. 2013. Gold Nanoparticles Disrupt Zebrafish Eye Development and Pigmentation. <u>Toxicol Sci</u> 133:275–288

Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. J Phys Chem B 110:15700–15707

Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ Toxicol Chem 27:1825–51.

Klaine SJ, Cobb GP, Dickerson RL, Dixon KR, Kendall RJ, Smith EE, Solomon KE. 1996. An ecological risk assessment for the use of the biocide dibromonitrilopropionamide (DBNPA), in industrial cooling systems. Environ Toxicol Chem 15:21–31.

Klaper R, Crago J, Barr J, Arndt D, Setyowati K, Chen J. 2009. Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: changes in toxicity with functionalization. Environ Pollut 157: 1152- 6.

Klerks PL, Bartholomew PR. 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cdresistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. <u>Aquat Toxicol</u> 19:97-112.

Koeneman BA, Zhang Y, Hristovski K, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG. 2009. Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots. <u>Toxicol In Vitro</u> 23:955–962.

Krantzberg G. 1985. The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. <u>Environ Toxicol</u> 39: 99-122.

Ĺ

Laban G, Nies LF, Turco RF, Bickham JW, Sepulveda MS. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. <u>Ecotoxicology</u> 19: 185-195.

Lacava LM, Garcia VAP, Kuckelhaus S, Azevedo RB, Sadeghiani N, Buske N. 2003. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. J <u>Magn Magn Mater</u> 272–276:2434–5.

Lacerda L, Salomons W. 1998. Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb? Springer-Verlag, Berlin, Germany. 78 p.

Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Durand E, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2014. Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on Danio rerio zebrafish at very low contamination pressure. <u>Nanotoxicology</u> 8: 676-85

Laib JE, Shaw CF, Petering DH, Eidsness MK, Elder RC, Garvey JS. 1985. Formation and characterization of aurothioneins: Au, Zn, Cd-thionein, Au, Cd-thionein, and (thiomalato-Au)chi-thionein. <u>Biochem</u> 24: 1977-86

Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. 2004. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. <u>Toxicol Sci</u> 77:126–34.

Lee HM, Shin DM, Song HM, Yuk JM, Lee ZW, Lee SH. 2009. Nanoparticles upregulate tumor necrosis factor alpha and CXCL8 via reactive oxygen species and mitogen activated protein kinase activation. <u>Toxicol Appl Pharm</u> 238:160–169

Lee J, Ji K, Kim J, Park C, Lim KH, Yoon TH, Choi K. 2010. Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in *Daphnia magna* under various light conditions. <u>Environ Toxicol</u> 25: 593-600.

Lee SW, Kim SM, Choi J. 2009a. 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 Phar 28: 86-91.

Lerebours A, Cambier S, Hislop L, Adam-Guillermin C, Bourdineaud JP. 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. <u>Mutat Res</u> 755: 55-60.

Li MH, Czymmek KJ, Huang CP. 2011. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO_2 and Al_2O_3 nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. <u>J</u> Hazard Mat 187: 502-508.

Li T, Albee B, Alemayehu M, Diaz R, Ingham L, Kamal S, Rodriguez M, Bishnoi SW. 2010. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. <u>Anal Bioanal Chem</u> 398: 689-700.

Li Y, Yu S, Wu Q, Tang M, Pu Y, Wang D. 2012. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. J Hazard Mater 219-220:221-230.

Lilienfeld P, Gustav Mie. 1991. Applied Optics, Vol. 30, 33, pp. 4696-4698

Lim YT, Kim S, Nakayama A, Stott NE, Bawendi MG, Frangioni JV. 2003. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. <u>Mol Imaging</u> 2:50–64.

Lin CH, Yang MH, Chang LW, Yang CS, Chang H, Chang WH, Tsai MH, Wang CJ, Lin P. 2011. Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hepatotoxicity in mice. <u>Nanotoxicology</u> 5:650-653.

Lin SJ, Bhattacharya P, Rajapakse NC, Brune DE, Ke PC. 2009. Effects of Quantum Dots Adsorption on Algal Photosynthesis. J Phy Chem C 113: 10962-10966.

Ling X, Zhang Y, Lu Y, Huang H. 2011. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water. <u>Environ Technol</u> 32:1463-70.

Lovern SB, Strickler JR, Klaper R. 2007. Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C-60, and C(60)HxC(70)Hx). <u>Environ Sci Technol</u> 41: 4465-4470.

Lovrić J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. 2005. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. <u>Chem Biol</u> 12: 1227-34.

Luo ZX, Wang ZH, Li QZ, Pan QK, Yan CZ, Liu F. 2011. Spatial distribution, electron microscopy analysis of titanium and its correlation to heavy metals: Occurrence and sources of titanium nanomaterials in surface sediments from Xiamen Bay, China. J Environ Monit 13: 1046-1052.

Luoma SN. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements ? Hydrobiologia. 176: 379-396

\mathcal{M}

Madden AS, Hochella MF, Luxton TP. 2006. Insights for sizedependent reactivity of hematite nanomineral surfaces through Cu^{2+} sorption. <u>Geochim Cosmochim Acta</u> 70:4095-4104.

Mahaut ML, Graf G. 1987. A luminophore tracer technique for bioturbation studies. Oceanol Acta 10:323-328.

Maire O, Lecroart P, Meysman FJR, Rosenberg R, Duchene JC, Grémare A. 2008. Methods of sediment reworking assessment in bioturbation research: a review. <u>Aquat.</u> <u>Biol</u> 2:219-238.

Male KB, Lachance B, Hrapovic S, Sunahara G, Luong JHT. 2008. Assessment of cytotoxicity of quantum dots and gold nanoparticles using cell-based impedance spectroscopy. <u>Anal Chem</u> 80:5487–5493.

Manciulea A, Baker A, Lead JR. 2009. A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles. <u>Chemosphere</u> 76: 1023-1027.

Marcon L, Riquet F, Vicogne D, Szunerits S, Bodart JF, Boukherroub R. 2010. Cellular and in vivo toxicity of functionalized nanodiamond in Xenopus embryos. J Mat Chem 20: 8064-8069.

Mashino T, Nishikawa D, Takahashi K, Usui N, Yamori T, Seki M, Endo T, Mochizuki M. 2003. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. <u>Bioorg Med Chem Lett</u> 13:4395–4397.

Mashino T, Okuda K, Hirota T, Hirobe M, Nagano T, Mochizuki M. 1999. Inhibition of E. coli growth by fullerene derivative and inhibition mechanism. <u>Bioorg Med Chem</u> Lett 9:2959–2962.

Matisoff G, Fisher JB, Matis S. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. <u>Hydrobiologia</u> 122: 19-33.

Matisoff G, Wang X, McCall PL. 1999. Biological redistribution of Lake Sediments by Tubificid Oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. J Gt Lakes Res 25: 205-219.

Matisoff G, Wang X. 1998. Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. <u>Limnol Oceanogr</u> 43: 1487-1499.

Matisoff G. 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In : Metal contaminated aquatic sediments. Allen, H.E. (Ed.) Ann Arbor Press, Chelsea, MI, USA, pp 201-272.

Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. <u>Appl Environ</u> <u>Microbiol</u> 69:4278–4281.

Maysinger D, Lovric J, Eisenberg A, Savica R. 2007. Fate of micelles and quantum dots in cells. <u>Eur J Pharm Biopharm</u> 65:270–281.

McCall PL, Fisher JB. 1980. Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In : Aquatic Oligochaete Biology, R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (Eds) New York, Plenum Press : 253-317

Méndez-Fernández L, Martínez-Madrid M, Rodriguez P. 2013. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. <u>Ecotoxicology</u> 22: 1445-60.

Mermillod-Blondin F, Gérino M, Creuzé des Châtelliers M, Degrange V. 2002. Functional diversity among 3 detritivorous hyporheic invertebrates: an experimental study in micrososms. J N Am Benthol Soc 21: 132-149.

Miao AJ, Luo ZP, Chen CS, Chin WC, Santschi PH, Quigg A. 2010. Intracellular Uptake: A Possible Mechanism for Silver Engineered Nanoparticle Toxicity to a Freshwater Alga *Ochromonas danica*. <u>Plos One</u> 5:12.

Miao AJ, Schwehr KA, Xu C, Zhang SJ, Luo ZP, Quigg A, Santschi PH. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. <u>Environ Pollut</u> 157: 3034-3041.

Mie G. 1908. Contributions to the optics of turbid media. S. L: Annals of Physics.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. <u>Nucleic Acids Res</u> 16: 1215.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard P. 2004. An integrated biomarkerbased strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. <u>Mutat Res</u> 552:247–68.

Moore MN. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. <u>Histochem J</u> 22:187–91.

Moore MN. 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. <u>Aquat</u> <u>Toxicol</u> 59:1–15.

Moore MN. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? <u>Environ Int</u> 32: 967–976.

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.

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*. <u>Aquat Toxicol</u> 87: 127-137.

Mueller NC, Nowack B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environ Sci Technol 42: 4447-4453.

Musee N, Oberholster PJ, Sikhwivhilu L, Botha AM. 2010. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behavior of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). <u>Chemosphere</u> 81: 1196-1203.

\mathcal{N}

Na K, Lee TB, Park K-H, Shin E-K, Lee Y-B, Choi H-K. 2003. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. <u>Eur J Pharm Sci</u> 18:165–73.

0

Oberdörster E. 2004a. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C_{60}) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. <u>Environ Health Persp</u> 112:1058–62.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. 2004b. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. <u>Inhal Toxicol</u> 16:437–45.

Oberdörster G. 2000. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. <u>Phil Trans R Soc</u> Lond A 358:2719–40.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004a, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 203 : Fish, acute toxicity test, in OECD, ed., p. 9.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004b, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 204 : Fish, prolonged toxicity test : 14 day study, in OECD, ed., p. 9.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004c, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 210 : Fish, early-life stage toxicity test, in OECD, ed., p. 18.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004d, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 212 : Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, in OECD, ed., p. 18.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004e, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 215 : Fish, juvenile growth test, in OECD, ed., p.17.

Oppenheim RC. 1981; Solid colloidal drug delivery systems: nanoparticles. <u>Int J Pharm</u> 8:217–34.

Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP. 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). <u>Ecotoxicol Environ Safe</u> 74: 974-983.

Orlanducci S, Valentini F, Piccirillo S, Terranova ML, Botti S, Ciardi R, Rossi M, Palleschi G. 2004. Chemical/structural characterization of carbon nanoparticles produced by laser pyrolysis and used for nanotube growth. <u>Mater Chem Phys</u> 87:190-5.

Owen G. 1970. The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. <u>Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci</u> 258 B: 245–60.

\mathcal{P}

Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. 2004. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. <u>Drug Deliv</u> 11:169–183.

Pan JF, Buffet PE, Poirier L, Amiard-Triquet C, Gilliland D, Joubert Y, Pilet P, Guibbolini M, Risso de Faverney C, Roméo M, Valsami-Jones E, Mouneyrac C. 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: the tellinid clam *Scrobicularia plana*. Environ Pollut 168:37-43.

Pang C, Selck H, Misra SK, Berhanu D, Dybowska A, Valsami-Jones E, Forbes VE. 2012. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: a comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. <u>Aquat Toxicol</u> 106–107:114–22.

Panyam J, Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissues. <u>Adv Drug Deliv Rev</u> 55:329–47.

Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. 2003. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (D,L-lactideco-glycolide) nanoparticle. Int J Pharm 262:1–11.

Park JW, Henry TB, Menn FM, Compton RN, Sayler G. 2010. No bioavailability of 17 alpha-ethinylestradiol when associated with nC(60) aggregates during dietary exposure in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 81: 1227-1232.

Park SS, Jaffé PR. 1996. Development of a sediment redox potential model for theassessment of a postdepositional metal mobility. <u>Ecol Model</u> 91:169-181.

Paterson G, Ataria JM, Hogue ME, Burns DC, Metcalfe CD. 2011. The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). <u>Chemosphere</u> 82: 1002-1009.

Pelkmans L, Helenius A. 2002. Endocytosis via caveolae. Traffic 3:311-20.

Peng XHPXH, Palma S, Fisher NS, Wong SS. 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. <u>Aquat Toxicol</u> 102: 186-196.

Perkel JM. 2004. Nanoscience is out of the bottle. <u>The Scientist</u> 17:20-3.

Petersen K, Kristensen E, Bjerregaard P. 1998. Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. <u>Mar Environ Res</u> 45 : 403-415.

Peterson GS, Ankley GT, Leonard EN. 1996. Effect of bioturbation on metalsulfide oxidation in surficial freshwater sediments. <u>Environ Toxicol Chem</u> 15: 2147-2155.

Peyrot C, Gagnon C, Gagné F, Willkinson KJ, Turcotte P, Sauvé S. 2009. Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. <u>Comp Biochem Physiol C</u> 150: 246-51.

Pickering KD, Wiesner MR. 2005. Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. <u>Environ Sci Technol</u> 39:1359–1365.

Plaire D, Bourdineaud JP, Alonzo A, Camilleri V, Garcia-Sanchez L, Adam-Guillermin C, Alonzo F. 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of Daphnia magna exposed to uranium. <u>Comp Biochem</u> <u>Physiol C</u> 158:231-43

Powers CM, Yen J, Linney EA, Seidler FJ, Slotkin TA. 2010. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival. <u>Neurotoxicol Teratol</u> 32: 391-397.

Poynton HC, Lazorchak JM, Impellitteri CA, Smith ME, Rogers K, Patra M, Hammer KA, Allen HJ, Vulpe CD. 2011. Differential Gene Expression in *Daphnia magna* Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO Nanoparticles and Zn Ions. <u>Environ Sci Technol</u> 45: 762-768.

Q

Quadros ME, Marr LC. 2010. Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. J Air Waste Manag Assoc 60: 770-81

\mathcal{R}

Raloff J. 2003. Air sickness: how microscopic dust particles cause subtle but serious harm. <u>Sci News</u> 164:1–11.

Ramsden CS, Henry TB, Handy RD. 2013. Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. <u>Aquat Toxicol</u> 126:404-13

Rasmussen AD, Banta GT, Andersen O. 2000. Cadmium dynamics in estuarine sediments: effects of salinity and lugworm bioturbation. <u>Environ Toxicol Chem</u> 19: 380-386.

Readman JW, Mantoura RFC, Rhead MM. 1984. The physico-chemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aquatic systems. <u>Fresenius Z Anal Chem</u> 319:126–31.

Reible DD, Popov V, Valsaraj KT, Thibodeaux LJ, Lin F, Dikshit M, Todaro MA, Fleeger JW. 1996. Contaminant fluxes from sediment due to tubificid oligochaete bioturbation. <u>Wat Res</u> 30: 704-714.

Reiman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. 2004. Size-dependant internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. <u>Biochem J</u> 377:159–69.

Renault S, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Mornet S, Brisson A. 2008. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: A phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). <u>Gold Bull</u> 41:116–126.

Rhoads DC. 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. <u>Oceanogr Mar</u> <u>Biol Ann Rev</u> 12: 263-300.

Robbins JA, McCall PL, Fisher JB, Krezoski JR. 1979. Effects of deposit feeders on migration of ¹³⁷Cs in lake sediments. <u>Earth Planet Sc Lett</u> 42: 277-287.

Rodriguez P, Martinez-Madrid M, Arrate JA, Navarro E. 2001. Selective feeding by the oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). <u>Hydrobiologia</u> 463:133-140.

Rosso A, Lafont M, Exinger A. 1993. Effets des métaux lourds sur les peuplements d'oligochètes de l'Ill et de ses affluents (Haut-Rhin, France). <u>Annls Limnol</u> 29: 295- 305.

Royal Society and Royal Academy of Engineering. 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. London: The Royal Society p. 113.

S

Sager M, Pucsko R. 1991. Trace element concentrations of oligochaetes and relations to sediment characteristics in the reservoir at Altenwörth, Austria. <u>Hydrobiologia</u> 226: 39-49.

Sanders MB, Sebire M, Sturve J, Christian P, Katsiadaki I, Lyons BP, Sheahan D, Weeks JM, Feist SW. 2008. Exposure of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to cadmium sulfide nanoparticles: biological effects and the importance of experimental design. <u>Mar Environ Res</u> 66:161-163.

Sass J. 2007. Nanotechnology's invisible threat: Small science big consequences. NRDC Issue Paper. Natural Resources Defense Council, New York, NY, USA.

Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD. 2004. The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. <u>Nano lett</u> 4:1881–7.

Schwartz J. 1994. Total suspended particulate matter and daily mortality in Cincinnati, Ohio. <u>Environ Health Persp</u> 102:186–9.

Schwartz J. 2004. The effects of particulate air pollution on daily deaths: a multi-city case crossover analysis. <u>Occup Environ Med</u> 61:953-4.

Service RF. 2005. Nanotechnology Takes Aim at Cancer. Science. 2005, Vol. 310, pp. 1132-1134.

Shi JP, Evans DE, Khan AA, Harrison RM. 2001. Sources and concentration of nanoparticles (<10 nm diameter) in the urban atmosphere. <u>Atmos Environ</u> 35:1193-202.

Shi JY, Abid AD, Kennedy IM, Hristova KR, Silk WK. 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. <u>Environ Pollut</u> 159: 1277-1282.

Shin J-S, Abraham SN. 2001. Caveolae — not just craters in the cellular landscape. <u>Science</u> 293:1447–8.

Shull DH, Yasuda M. 2001. Size-selective downward particle transport by cirratulid polychaetes. J Mar Res 59: 453-473.

Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TG, Wright CJ, Doak SH. 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. <u>Biomaterials</u> 30:3891-3914

Slaveykova VI, Startchev K. 2009. Effect of natural organic matter and green microalga on carboxyl-polyethylene glycol coated CdSe/ZnS quantum dots stability and transformations under freshwater conditions. <u>Environ Pollut</u> 157: 3445-3450.

Smedes F. 1994. Sampling and partition of neutral organic contaminants in surface waters with regard to legislation, environmental quality and flux estimations. Int J Environ Anal Chem 57:215–29.

Smedsrud T, Dannevig BH, Tolleshaug H, Berg T. 1984. Endocytosis of a mannoseterminated glycoprotein and formaladehyde-treated human serum albumin in liver and kidney cells from fish (*Salmo alpinus* L.). Dev Comp Immunol 8:579–88.

Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram negative bacteria. <u>J Colloid Interface Sci</u> 275:177–182.

Soster FM, Harvey DT, Troksa MR, Grooms T. 1992. The effect of tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erié sediment. <u>Hydrobiologia</u> 248: 249-358.

Stanley JK, Coleman JG, Weiss CA Jr, Steevens JA. 2010. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. <u>Environ Toxicol Chem</u> 29: 422-9.

Stewart DT, Noguera-Oviedo K, Lee V, Banerjee S, Watson DF, Aga DS. 2013. Quantum dots exhibit less bioaccumulation than free cadmium and selenium in the earthworm *Eisenia andrei*. Environ Toxicol Chem 32:1288-1294

Strigul N, Vaccari L, Galdun C, Wazne M, Liu X, Christodoulatos C, Jasinkiewicz K. 2009. Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. <u>Desalination</u> 248: 771-782.

${\mathcal T}$

Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Hatta T, Tanaka A, Tsuge O. 1999. Study of the DNA interaction with water-soluble cationic fullerene derivatives. <u>Chem Lett</u> 28:319-320.

Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. 2010. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. <u>Aquat Toxicol</u>100: 178-186.

Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. 2010a. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. Comp Biochem Physiol C 151 : 167-74.

Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. 2010b. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. <u>Aquat Toxicol</u> 100:178-86.

Tedesco S, Doyle H, Redmond G, Sheehan D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. <u>Mar Environ Res</u> 66: 131-3.

Tessier A, Campbell PGC. 1987. Partitioning of trace metals in sediments: Relationships with bioavaliability. <u>Hydrobiologia</u> 149: 43-52.

Thill A, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M, Flank AM. 2006. Cytotoxicity of CeO2 nanoparticles for *Escherichia coli*: A physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. <u>Environ Sci Technol</u> 40:6151–6156.

Truong L, Saili KS, Miller JM, Hutchison JE, Tanguay RL. 2012 a. Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles. <u>Comp Biochem Phys C</u> 155 :269-274

Truong L, Tilton SC, Zaikova T, Richman E, Waters KM, Hutchison JE, Tanguay RL. 2013. Surface functionalities of gold nanoparticles impact embryonic gene expression responses. <u>Nanotoxicology</u> 7:192-201

Truong L, Zaikova T, Richman EK, Hutchison JE, Tanguay RL. 2012 b. Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle exposure. Nanotoxicology 6:691-699

Tsai YC, Chen SY, Liaw HW. 2007. Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. <u>Sensor Actuat B: Chem</u> 125:474–481.

U

Unrine JM, Hunyadi SE, Tsyusko OV, Rao W, Shoults-Wilson WA, Bertsch PM. 2010. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). Environ Sci Technol 44:8308-8313

US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2002. Fish life-cycle test guideline – Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p.133.

US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2003. Revised draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p. 142.

Vale C, Sundby B. 1998. The interactions between living organisms and metals in intertidal and subtidal sediments. In: Metal metabolism in aquatic environments. W. J. Langston and M. J. Bebianno (Eds) : 19-29. London.

van Aerle R, Lange A, Moorhouse A, Paszkiewicz K, Ball K, Johnston BD, de-Bastos E, Booth T, Tyler CR, Santos EM. 2013. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. <u>Environ Sci Technol</u> 47:8005-14.

van der Goot FG, Gruenberg J. 2002. Oiling the wheels of the endocytic pathway. <u>Trends Cell Biol</u> 296–9.

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. <u>Environ Toxicol Pharma</u> 13: 57-149.

Van Hoecke K, De Schamphelaere KAC, Van der Meeren P, Smagghe G, Janssen CR. 2011. Aggregation and ecotoxicity of CeO(2) nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. <u>Environ Pollut</u> 159: 970-976.

Verma S, Das S, Khangarot BS. 2011. Toxicity of metallic oxides nanoparticle suspensions to a freshwater sludge worm *Tubifex tubifex* Müller. J Biomed Nanotechnol 7:216-7

\mathcal{W}

Wall SB, Isely JJ, La Point TW. 1995. Fish bioturbation of cadmium-contaminated sediments: factors affecting Cd availability to *Daphnia magna*. <u>Environ Toxicol Chem</u> 15: 294-298.

Wallace WG, Lopez GR, Levinton JS. 1998. Cadmium resistance in an oligochaetes and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorus shrimp. <u>Mar Ecol Prog Ser</u> 172: 225-237.

Wang X, Tao G, Meng Y. 2009. Nanogold hollow microsphere-based electrochemical immunosensor for the detection of ferritin in human serum. <u>Microchim Acta</u> 167:147–152.

Wang Y, Seebald JL, Szeto DP, Irudayaraj J. 2010. Biocompatibility and Biodistribution of Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobes in Zebrafish Embryos: In vivo and Multiplex Imaging. <u>Acs Nano</u> 4: 4039-4053.

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. 2003. Comparative pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in rats. <u>Toxicol Sci</u> 77:117125.

Warheit DB. 2004. Nanoparticles: health impacts? Mater Today 7:32-5.

Warren LA, Haack EA. 2001. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. <u>Earth Sci Rev</u> 54: 261-320.

Warren LA, Tessier A, Hare L. 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. <u>Limnol Oceanogr</u> 43: 1442-1454.

Wei CX, Zhang YB, Guo J, Han B, Yang X, Yuan JL. 2010a. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. J Environ Sci (China) 22: 155-160.

Wei LP, Thakkar M, Chen YH, Ntim SA, Mitra S, Zhang XY. 2010b. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. Aquat Toxicol 100: 194-201.

Wheatcroft RA, Jumars PA, Smith CR Nowel ARM. 1990. A mechanistic view of the particulate biodiffusion coefficient: rest periods and transport directions. J Mar Res 48: 177-201.

Wheatcroft RA, Olmez I, Pink FX. 1994. Particle bioturbation in Massachusetts Bay: preliminary results using a new deliberate tracer technique. <u>J Mar Res</u> 52:1129–1150.

Whitley LS. 1967. The resistance of Tubificid worms to three common pollutants. <u>Hydrobiologia</u> 32: 193-205.

Wiederholm T, Wiederholm AM, Milbrink G. 1987. Bulk sediment bioassays with five species of fresh-water oligochaetes. <u>Water Air Soil Poll</u> 36: 131-154.

Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R. 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale $TiO_{(2)}$ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. Chemosphere 76: 1356-1365.

Wiesner MR, Lowry GV, Alvarez P, Dionysidou D, Biswas P. 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. <u>Environ Sci Technol</u> 40:4337-4345.

Wise JP, Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongan AF, Walter RB, Thompson WD, Ng AK, Aboueissa AM, Mitani H, Spalding MJ, Mason MD. 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. <u>Aquat Toxicol</u> 97: 34-41.

Wood TS, Shelley ML. 1999. A dynamic model of bioavailability of metals in constructed wetlend sediments. <u>Ecol Eng</u> 12: 231-252.

Wu YA, Zhou QF, Li HC, Liu W, Wang T, Jiang GB. 2010. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. <u>Aquat Toxicol</u> 100: 160-167.

Wurl O, Obbard JP. 2004. A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms. <u>Mar Pollut Bull</u> 48:1016-30.

${\mathcal X}$

Xia TA, Zhao Y, Sager T, George S, Pokhrel S, Li N, Schoenfeld D, Meng HA, Lin SJ, Wang X, Wang MY, Ji ZX, Zink JI, Madler L, Castranova V, Lin S, Nel AE. 2011. Decreased dissolution of ZnO by Iron doping yields nanoparticles with reduced toxicity in the rodent lung and zebrafish embryos. <u>Acs Nano</u> 5: 1223-1235

Xiong DW, Fang T, Yu LP, Sima XF, Zhu WT. 2011. Effects of nano-scale TiO(2), ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. Sci Total Environ 409: 1444-1452.

Xu M, Deng GF, Liu SS, Chen S, Cui D, Yang LM, Wang QQ. 2010. Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. <u>Metallomics</u> 2: 469-473.

Y

Yeo MK, Kang M. 2010. The effect of nano-scale Zn-doped $TiO_{(2)}$ and pure $TiO_{(2)}$ particles on *Hydra magnipapillata*. Mol Cell Toxicol 6: 9-17.

Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie SM, O'Regan RM. 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. <u>Lancet Oncol</u> 7:657–667.

Z

Zeyons O, Thill A, Chauvat F, Menguy N, Cassier-Chauvat C, Orear C, Daraspe J, Auffan M, Rose J, Spalla O. 2009. Direct and indirect CeO₍₂₎ nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and Synechocystis. <u>Nanotoxicology</u> 3: 284-295.

Zhang WX, Elliott DW. 2006. Applications of iron nanoparticles for groundwater remediation. <u>Remediation</u> 16:7–21.

Zhao CM, Wang WX. 2010. Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. Environ Sci Techno 44: 7699-7704.

Zhao X, Striolo A, Cummings PT. 2005. C₆₀ binds to and deforms nucleotides. <u>Biophys</u> J 89:3856–3862.

Zhiyi R, Haowen Y. 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. Ecotoxicol Environ Safe 58: 96-103.

Zhu XS, Chang Y, Chen YS. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₍₂₎ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. <u>Chemosphere</u> 78: V-215.

Zuykov M, Pelletier E, Demers S. 2011. Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. <u>Mar Environ Res</u> 71: 17-21.

CHAPITRE VI

ANNEXES

Paramétrés physico-chimiques de la colonne d'eau des différentes unités expérimentales utilisées durant notre travail de recherche

Expérimentation de l'Article A

Température (moyenne ± écart type)

T (°C)/temps(Jrs)	Т0	Т3	Т8	T10	T13	T17	T20
Témoin sans vers	$19,4 \pm 0,1$	$21,1 \pm 0,1$	$20,7 \pm 0,1$	$19,3 \pm 0,09$	$20,03 \pm 0,2$	$19,03 \pm 0,15$	$18,8 \pm 0,15$
Témoin sans vers	$19,8 \pm 0,13$	$21,1 \pm 0,16$	$20,9 \pm 0,08$	$19,6 \pm 0,2$	$19,8 \pm 0,18$	$18,9 \pm 0,2$	$18,4 \pm 0,27$
CdS NPs sans vers	$19,8 \pm 0,17$	$21,1 \pm 0,22$	$20,9 \pm 0,19$	$19,5 \pm 0,19$	$20,1 \pm 0,26$	$19 \pm 0,3$	$18,8 \pm 0,15$
CdS NPs avec vers	$19,8 \pm 0,13$	$21,01 \pm 0,11$	$20,8 \pm 0,22$	$19,8 \pm 0,42$	$20,2 \pm 0,12$	$18,8 \pm 0,16$	$18,4 \pm 0,12$
CdS MPs avec vers	$19,9 \pm 0,16$	$20,9 \pm 0,17$	$20,8 \pm 0,2$	$19,5 \pm 0,27$	$20,2 \pm 0,18$	$18,7 \pm 0,47$	$18,7 \pm 0,2$
CdCl ₂ avec vers	$21,2 \pm 0,11$	$22,03 \pm 0,23$	$22,06 \pm 0,15$	$18,4 \pm 0,36$	$19,8 \pm 0,26$	$22,03 \pm 0,4$	$22,5 \pm 0,35$

pH (moyenne \pm écart type)

pH /temps(Jrs)	Т0	Т3	Т8	T10	T13	T17	T20
Témoin sans vers	$7,59 \pm 0,23$	$7,91 \pm 0,03$	$7,82 \pm 0,03$	$7,89 \pm 0,01$	$7,87 \pm 0,02$	$7,84 \pm 0,02$	$7,85 \pm 0,04$
Témoin sans vers	$7,69 \pm 0,01$	$7,\!80 \pm 0,\!06$	$7,81 \pm 0,02$	$7,81 \pm 0,04$	$7,79 \pm 0,03$	$7,72 \pm 0,1$	$7,61 \pm 0,12$
CdS NPs sans vers	$7,69 \pm 0,01$	$7,89 \pm 0,02$	$7,77 \pm 0,03$	$7,78 \pm 0,07$	$7,83 \pm 0,07$	$7,87 \pm 0,06$	$7,78 \pm 0,12$
CdS NPs avec vers	$7,65 \pm 0,04$	$7,83 \pm 0,08$	$7,83 \pm 0,06$	$7,94 \pm 0,39$	$7,79 \pm 0,03$	$7,74 \pm 0,04$	$7,44 \pm 0,27$
CdS MPs avec vers	$7,57 \pm 0,05$	$7,81 \pm 0,06$	$7,72 \pm 0,07$	$7,46 \pm 0,23$	$7,75 \pm 0,05$	$7,69 \pm 0,11$	$7,29 \pm 0,14$
CdCl ₂ avec vers	$7,16 \pm 0,1$	$7,43 \pm 0,13$	$7,69 \pm 0,04$	7,68 ± 0,13	$7,59 \pm 0,15$	7,58 ± 0,19	$7,47 \pm 0,26$

Conductivité (moyenne \pm écart type)

Cond							
(µs/cm) /temps(Jrs)	10	13	18	T10	T13	T17	120
Témoin sans vers	346±10	1481 ± 184	1554 ± 102	1506 ± 116	1486 ± 32	1581 ± 107	1715 ± 237
Témoin sans vers	349 ± 18	1322 ± 153	1414 ± 154	1606 ± 72	1242 ± 71	1447 ± 153	1493 ± 146
CdS NPs sans vers	361 ± 14	1399 ± 160	1599 ± 192	1657 ± 153	1607 ± 337	1741 ± 386	1363 ± 124
CdS NPs avec vers	354 ± 15	1523 ± 200	1553 ± 170	1505 ± 148	1422 ± 272	1581 ± 367	1514 ± 258
CdS MPs avec vers	360 ± 23	1493 ± 142	1540 ± 201	1578 ± 275	1251 ± 159	1350 ± 136	1415 ± 145
CdCl ₂ avec vers	392 ± 22	1108 ± 47	1632 ± 109	1487 ± 206	1235 ± 91	1484 ± 122	1531 ± 115

Expérimentation de l'Article B

T (°C)/temps(Jrs)	Т0	Т3	Τ7	T10	T13	T17	T20
Témoin	$20,1 \pm 0,1$	19,68 ±0,08	$21 \pm 0,07$	$20,36 \pm 0,21$	$21,8 \pm 0,1$	$19,6 \pm 0,2$	$21,44 \pm 0,09$
55 μg/g AuNPS	$20,12 \pm 0,16$	$19,66 \pm 0,13$	$20,98 \pm 0,08$	$20,3 \pm 0,18$	$21,74 \pm 0,09$	19,6 ±0,15	$21,44 \pm 0,05$
16 µg/g AuNPs	$20,22 \pm 0,22$	$19,74 \pm 0,05$	$21,02 \pm 0,08$	$20,36 \pm 0,11$	$21,82 \pm 0,13$	$19,68 \pm 0,1$	$21,44 \pm 0,05$
55 μg/g KAuCl ₄	$20,08 \pm 0,26$	$19,68 \pm 0,08$	$20,98 \pm 0,08$	$20,2 \pm 0,2$	$21,74 \pm 0,08$	19,62 ± 0,13	$21,52 \pm 0,08$
16 μg/g KAuCl ₄	$20,14 \pm 0,18$	$19,\!68 \pm 0,\!08$	$21,04 \pm 0,05$	$20,32 \pm 0,13$	$21,8 \pm 0,07$	19,66 ± 0,11	$21,46 \pm 0,08$

Température (moyenne ± écart type)

pH (moyenne ± écart type)

pH / temps(Jrs)	Т0	Т3	Τ7	T10	T13	T17	T20
Témoin	$8,06 \pm 0,03$	$8,11 \pm 0,03$	$8,\!19\pm0,\!05$	$8,15 \pm 0,04$	8,16 ± 0,09	$7,\!98 \pm 0,\!09$	$7,82 \pm 0,23$
55 μg/g AuNPS	$8,11 \pm 0,07$	$8,18 \pm 0,07$	$8,1 \pm 0,26$	$8,06 \pm 0,29$	$8,21 \pm 0,12$	$8,07 \pm 0,15$	$8,15 \pm 0,18$
16 μg/g AuNPs	$8,08 \pm 0,05$	$8,06 \pm 0,26$	$8,23 \pm 0,06$	$8,04 \pm 0,18$	$8,09 \pm 0,14$	$8,08 \pm 0,14$	$8,14 \pm 0,12$
55 μg/g KAuCl ₄	$8,12 \pm 0,07$	$8,12 \pm 0,09$	$8,27 \pm 0,06$	$8,16 \pm 0,07$	$8,17 \pm 0,16$	$8,15 \pm 0,14$	$8,17 \pm 0,10$
16 μg/g KAuCl ₄	8,11 ± 0,03	$8,\!19\pm0,\!06$	$8,08 \pm 0,35$	$8,09 \pm 0,23$	$8,17 \pm 0,15$	$8,12 \pm 0,09$	8,11 ± 0,18

Conductivité (moyenne \pm écart type)

Cond (µs/cm) /							
temps(Jrs)	T0	T3	Τ7	T10	T13	T17	T20
Témoin	$480,6 \pm 3,04$	$516,8 \pm 5,06$	$575,2 \pm 8,31$	$604,6 \pm 8,17$	643 ± 11	$657,8 \pm 26,2$	$648,4 \pm 4,1$
55 μg/g AuNPS	$484,2 \pm 4,4$	$517,4 \pm 6,8$	$579,8 \pm 20,1$	$609,4 \pm 27,4$	$638,8 \pm 37,4$	$641,4 \pm 26,3$	$649,6 \pm 23,1$
16 µg/g AuNPs	$486,6 \pm 6,06$	$526 \pm 6,8$	$584,6 \pm 15,4$	$614 \pm 22,9$	$640,4 \pm 32,6$	$646,2 \pm 18,2$	$659 \pm 13,3$
55 μg/g KAuCl ₄	$484,8 \pm 16,9$	$528,8 \pm 5,9$	$587,2 \pm 2,04$	$619,6 \pm 4,1$	$653,6 \pm 15,7$	$657,6 \pm 8,8$	$664,2 \pm 14,09$
16 μg/g KAuCl ₄	494 ± 6	$529,8 \pm 7,9$	$590,6 \pm 11,7$	$621,2 \pm 12,5$	$656,4 \pm 22,7$	$657,4 \pm 16,1$	$666,8 \pm 14,7$

Expérimentation de l'Article C

Température (moyenne \pm écart type)

T (°C)/temps(Jrs)	Т0	Т3	Τ7	T10	T13	T17	T20
Témoin sans animaux							
	$22,9 \pm 0,14$	$21,8 \pm 0,35$	$21,8 \pm 0,57$	$21,7 \pm 0,57$	$22,6 \pm 0,42$	$22,6 \pm 0,33$	$21,9 \pm 0,10$
Témoin avec vers		21.0.1.0.1.5					
	$23,2 \pm 0,06$	$21,9 \pm 0,17$	$22,2 \pm 0,13$	$21, 1 \pm 0, 43$	$23,8 \pm 0,54$	$23,9 \pm 0,27$	$23,2 \pm 0,06$
Témoin avec vers et	22.06 ± 0.11	21.0 ± 0.25	22.14 ± 0.07		22 (8 + 0.07	21.7 ± 0.25	22.7 ± 0.5
poisson	$23,06 \pm 0,11$	$21,8 \pm 0,25$	$22,14 \pm 0,07$	$22,8 \pm 0,32$	$23,68 \pm 0,07$	$21,7 \pm 0,25$	$22,7\pm0,56$
14 μg/g AuNPS	22 ± 0.15	21.9 ± 0.11	22.1 ± 0.06	22.6 ± 0.55	22.07 ± 0.7	21.25 ± 0.6	22.27 ± 0.82
14	23 ± 0.13	$21,8 \pm 0,11$	$22,1 \pm 0,00$	$22,0 \pm 0,33$	$23,07 \pm 0,7$	$21,33 \pm 0,0$	$22,27 \pm 0,82$
14 µg/g Aunps avec	23 ± 0.06	21.5 ± 0.11	22.06 ± 0.04	22.7 ± 0.72	21.9 ± 0.89	21.79 ± 0.41	22.09 ± 0.81
$14 \mu q/q A \mu NDS avec$	$25 \pm 0,00$	$21,3 \pm 0,11$	22,00 ± 0,04	22,7 ± 0,72	21,9 ± 0,89	$21,79 \pm 0,41$	22,09 ± 0,01
vers et poisson	23.24 ± 0.16	21.7 ± 0.38	22.36 ± 0.23	21.87 ± 0.69	22.65 ± 0.76	23.01 ± 0.85	22.07 ± 0.55
		,, 0,00		-1,07 0,09		20,01 0,00	,0, 0,00
1 · µ8/8 · · · · · · · 4	$21,8 \pm 0,06$	$21,4 \pm 0,04$	$20,8 \pm 0,06$	$21,3 \pm 0,9$	$20,8 \pm 0,03$	$20,7 \pm 0,04$	$19,9 \pm 0,08$
14 μg/g KAuCl ₄ avec							
vers	$21,8 \pm 0,06$	$21,5 \pm 0,06$	$20,6 \pm 0,08$	$21,3 \pm 0,04$	$20,9 \pm 0,06$	$20,8 \pm 0,08$	$20,03 \pm 0,04$
14 μg/g KAuCl ₄ avec							
vers et poisson	$21,84 \pm 0,06$	$21,5 \pm 0,08$	$20,8 \pm 0,04$	$21,4 \pm 0,08$	$20,92 \pm 0,14$	$20,92 \pm 0,13$	$20,1 \pm 0,08$
56 μg/g AuNPs					• • • • • • •		
	$23,2 \pm 0,26$	$21,96 \pm 0,42$	$22,3 \pm 0,2$	$22,67 \pm 0,57$	$21,87 \pm 0,69$	$22,65 \pm 0,43$	$22,47 \pm 0,33$
56 μg/g AuNPs avec	22.06 + 0.04	21.7 . 0.24	22.06 . 0.04	21.0 + 0.46	00 (1) 0 01	22.07 . 0.(1	21.07 . 0.00
vers	$22,96 \pm 0,04$	$21, 1 \pm 0, 24$	$22,06 \pm 0,04$	$21,9 \pm 0,46$	$22,61 \pm 0,81$	$22,07 \pm 0,61$	$21,87 \pm 0,08$
56 μg/g AuNPs avec	22.2 ± 0.21	22.09 ± 0.22	22.24 ± 0.16	22.2 ± 0.54	22.15 ± 0.61	22.21 ± 0.04	22.00 ± 0.67
vers et poisson	$23,2 \pm 0,21$	$22,08 \pm 0,33$	$22,24 \pm 0,10$	$22,5 \pm 0,34$	$25,15 \pm 0,01$	$23,31 \pm 0,04$	22,09 ± 0,07
$50 \ \mu g/g \ KAUCI_4$	22.06 ± 0.04	21.7 ± 0.22	21.1 ± 0.06	21.6 ± 0.06	21 ± 0.06	20.9 ± 0.24	20.1 ± 0.08
56 ug/g K AuC1 avec	22,00 ± 0,04	21,7 ± 0,22	$21,1 \pm 0,00$	$21,0 \pm 0,00$	$21 \pm 0,00$	20,7 ± 0,24	$20,1 \pm 0,00$
vers	21.8 ± 0.1	21.5 ± 0.06	20.8 ± 0.06	21.56 ± 0.28	20.7 ± 0.04	20.7 ± 0.08	20 ± 0.2
56 µg/g KAuCl₄ avec	, ,	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	, -,	, , , ,	, .,.	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	- 7
vers et poisson	$21,8 \pm 0,11$	$21,5 \pm 0,06$	$20,7 \pm 0,13$	$21,4 \pm 0,03$	$20,9 \pm 0,06$	$20,9 \pm 0,11$	$20,14 \pm 0,16$

pH (moyenne ± écart type)

pH / temps(Jrs)	Т0	Т3	Τ7	T10	T13	T17	T20
Témoin sans animaux	8.10 ± 0.24	8 23 + 0.00	8.26 ± 0.07	8.35 ± 0.07	8.27 ± 0.47	8.21 ± 0.02	8.33 ± 0.51
Témoin avec vers	0,19±0,24	8,23 ± 0,09	8,20 ± 0,07	8,55 ± 0,07	8,27 ± 0,47	8,21 ± 0,02	8,33 ± 0,31
Temom avec vers	8,33 ± 0,02	$8,23 \pm 0,02$	$8,27 \pm 0,05$	$8,17 \pm 0,05$	$8,22 \pm 0,09$	$8,44 \pm 0,03$	$8,41 \pm 0,01$
Témoin avec vers et							
poisson	$8,08 \pm 0,06$	$8,01 \pm 0,09$	$8,07 \pm 0,14$	$8,09 \pm 0,1$	$8,16 \pm 0,12$	$8,33 \pm 0,11$	$8,13 \pm 0,07$
14 μg/g AuNPS	$8,33 \pm 0.03$	$8,26 \pm 0.09$	$8,35 \pm 0.07$	$8,4 \pm 0.05$	$8,46 \pm 0.03$	8.51 ± 0.03	$8,24 \pm 0.09$
14 µg/g AuNPs avec	, ,	, ,	, ,	, , ,	, , ,	, ,	, , ,
vers	$8,19 \pm 0,17$	$8,18 \pm 0,07$	$8,31 \pm 0,05$	$8,23 \pm 0,03$	$8,44 \pm 0,71$	$8,35 \pm 0,05$	$8,45 \pm 0,17$
14 μg/g AuNPS avec	8.06 + 0.06	7.96 ± 0.11	7.93 ± 0.08	8 01 + 0 1	8 17 + 0 51	8.08 ± 0.17	8.79 ± 0.04
$14 \mu g/g K A \mu Cl.$	0,00 ± 0,00	7,70 ± 0,11	7,75 ± 0,00	0,01 ± 0,1	0,17 ± 0,51	0,00 ± 0,17	0,77 ± 0,04
14 μg/g KAuCi4	8,21 ± 0,11	8,41 ± 0,21	$8,33 \pm 0,07$	$8,4 \pm 0,06$	$8,45 \pm 0,09$	8,46 ± 0,08	$8,53 \pm 0,08$
14 µg/g KAuCl ₄ avec							
vers	$8,04 \pm 0,09$	$8,17 \pm 0,06$	$8,24 \pm 0,07$	$8,33 \pm 0,14$	$8,20 \pm 0,05$	$8,1 \pm 0,05$	$8,27 \pm 0,13$
$14 \ \mu g/g \ KAuCl_4 avec$ vers et poisson	$7,83 \pm 0,5$	$8,14 \pm 0,01$	$8,03 \pm 0,13$	$7,94 \pm 0,17$	$7,8 \pm 0,29$	$7,9 \pm 0,3$	$7,97 \pm 0,13$
56 μg/g AuNPs	0.10 + 0.05	0.00 + 0.04	0.00 + 0.05		0.16 + 0.00	0.51 + 0.12	0.02 + 0.05
	8,10 ± 0,05	$8,28 \pm 0,04$	$8,22 \pm 0,05$	$8,33 \pm 0,06$	$8,16 \pm 0,09$	$8,51 \pm 0,13$	$8,23 \pm 0,05$
56 µg/g AuNPs avec	$8,27 \pm 0,07$	$8,22 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,01$	$8,17 \pm 0.03$	$8,21 \pm 0,04$	$8,23 \pm 0,12$	$8,41 \pm 0,9$
56 µg/g AuNPs avec				, , ,	, , , ,	, í í	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
vers et poisson	$7,96 \pm 0,16$	$8,04 \pm 0,12$	$8,08 \pm 0,1$	$8,05 \pm 0,17$	$8,14 \pm 0,61$	$8,78 \pm 0,07$	$8,12 \pm 0,11$
56 μg/g KAuCl ₄							
	$8,39 \pm 0,11$	$8,18 \pm 0,9$	$8,3 \pm 0,06$	$8,4 \pm 0,03$	$8,35 \pm 0,05$	$8,33 \pm 0,05$	$8,35 \pm 0,06$
56 μg/g KAuCl ₄ avec		0.01 . 0.10		0.4.0.01	0.05 . 0.01		0.10 . 0.00
vers	$7,91 \pm 0,07$	$8,01 \pm 0,18$	$8,28 \pm 0,07$	$8,4 \pm 0,01$	$8,35 \pm 0,01$	$8,22 \pm 0,04$	$8,12 \pm 0,09$
56 μg/g KAuCl ₄ avec vers et poisson	$7,86 \pm 0,07$	8,08 ± 0,12	8,01 ± 0,07	7,81 ± 0,01	7,78 ± 0,11	$7,77 \pm 0,08$	8,01 ± 0,14

Conductivité (moyenne \pm écart type)

Cond (µs/cm) /							
temps(Jrs)	T0	T3	T7	T10	T13	T17	T20
Témoin sans animaux	601 ± 133	710 ± 176	897 ± 183	960 ± 187	1031 ± 237	1138 ± 433	1328 ± 412
Témoin avec vers	650 ± 129	925 ± 247	1341 ± 433	1145 ± 121	1400 ± 345	1294 ± 311	1475 ± 450
Témoin avec vers et poisson	958 ± 217	1211 ± 126	1271 ± 156	1291 ± 154	1495 ± 276	1511 ± 377	1400 ± 366
14 μg/g AuNPS	568 ± 115	764 ± 145	881±155	964 ± 67	1100 ± 250	1241 ± 125	1367 ± 341
14 μg/g AuNPs avec vers	558 ± 115	986 ± 118	1144 ± 131	1145 ± 84	1245 ± 131	1348 ± 251	1253 ± 164
14 μg/g AuNPS avec vers et poisson	867 ± 26	1114 ± 60	1213 ± 104	1235 ± 123	1363 ± 176	1387 ± 231	1431 ± 166
14 μg/g KAuCl ₄	550 ± 106	733 ± 188	901 ± 54	937 ± 49	999 ± 18	1031 ± 25	1081 ± 25
14 μg/g KAuCl ₄ avec vers	446 ± 59	597 ± 120	820 ± 68	862 ± 67	906 ± 68	954 ± 76	1000 ± 84
14 μg/g KAuCl ₄ avec vers et poisson	720 ± 125	931 ± 174	1025 ± 188	1070 ± 187	1096 ± 180	1126 ± 180	1170 ± 176
56 μg/g AuNPs	567 ± 100	744 ± 132	968 ± 185	1040 ± 144	1185 ± 210	1154 ± 107	1112 ± 184
56 μg/g AuNPs avec vers	560 ± 92	804 ± 178	1139 ± 69	1178 ± 71	1192 ± 41	1229 ± 103	1284 ± 107
56 μg/g AuNPs avec vers et poisson	864 ± 63	1063 ± 79	1132 ± 69	1150 ± 75	1201 ± 98	1265 ± 110	1307 ± 133
56 μg/g KAuCl ₄	486 ± 143	573 ± 136	811 ± 136	877 ± 134	941 ± 109	1071 ± 21	1070 ± 52
56 μg/g KAuCl ₄ avec vers	527 ± 97	849 ± 225	981 ± 171	1019 ± 168	1021 ± 141	1104 ± 176	1142 ± 177
56 μg/g KAuCl ₄ avec vers et poisson	617 ± 20	838 ± 116	929 ± 133	977 ± 138	1017 ± 168	1026 ± 144	1066 ± 147



Conclusion:

To conclude, the Skikda bay metallic pollution could be mimicked in microcosms and showed that animals are likely facing harmful life conditions in their natural habitat. The effects of the metal mixture were observed with the highest concentration after 8 days of exposure, revealing that animal's life is very soon affected in microcosms whereas in their natural habitat animals are facing the pollution for months long. Thus, the real impact might well be worst than that observed in microcosms. **Prospects**: It would be interesting to study the effect of this pollution *in situ* to control it and allow a rapid improvement of this marine ecosystem.



Genotoxic impact of cadmium sulfide nano and microparticles on tubificidae worms exposed through the sediment - Effects on their bioturbation activity.

Amina DEDEH ⁽¹⁾, Aurélie CIUTAT ⁽¹⁾, Mona TREGUER-DELAPIERRE ⁽²⁾ & Jean-Paul BOURDINEAUD ⁽¹⁾ ⁽¹⁾ BORDEAUX UNIVERSITY, CNRS, UMR EPOC 5805, ARCACHON MARINE STATION, France ⁽²⁾ BORDEAUX UNIVERSITY, CNRS, UPR 9048, Institute of Chemistry of Condensed Matter of Bordeaux, France E-mail: a.dedeh@epoc.u-bordeaux1.fr

Introduction

Recent research has led to the elaboration and commercialization of hundreds of products containing nanoparticles. Scientists and industrialists found a promising opportunity in the nanoscience to improve the quality and the performance of their products. The sediment is a privileged site for the accumulation of pollutants including nanoparticles, and is considered as a potential endogenous source of contamination, likely to cause adverse effects on living organisms. In this study, we investigated effects of different forms of cadmium on the aquatic tubificidae worm using microcosms made up of a mixed biotope consisting of water column and contaminated sediment with 600 ng/g of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles (8nm), CdS microparticles (1-10 microns), or ionic cadmium (CdCl₂) during 20 days.



Worms' bioturbation activity led to a sedimentary reworking and a release of cadmium in dissolved form specially observed with the ionic form. This bioturbation is able to play a significant role within the biogeochemical cycle of the metal in contaminated aquatic systems. The nanoparticular form decreased the bioturbation activity suggesting an impact on muscle bioenergetics or on nerve cells function.

Prospects: It would be interesting to emphasize and deepen the toxicity tests on synthesized nanoparticular and micronic-sized products before being launched on the market.

DNA Alterations Triggered by Environmentally Relevant Polymetallic Concentrations in Marine Clams *Ruditapes philippinarum* and Polychaete Worms *Hediste diversicolor*

Amina Dedeh · Aurélie Ciutat · Damien Tran · Jean-Paul Bourdineaud

Received: 9 December 2013/Accepted: 2 June 2014 © Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract We exposed marine clams (Ruditapes philippinarum) and aquatic worms (Hediste diversicolor) to environmentally relevant concentrations of two metal mixtures each containing three divalent metals [(C1 in µg/ L) cadmium (Cd) 1, mercury (Hg) 0.1, and lead (Pb) 4] and [C2 in µg/L) Cd 17, Hg 1.1, and Pb 55]. Animals collected in the Arcachon Bay were exposed for 8 days in microcosms made up of a mixed biotope consisting of a water column and natural marine sediment both taken up from the Arcachon Bay. Bioaccumulation analysis showed a significant increase of Cd, Hg, and Pb in clams, particularly at C2 concentration in the water column reaching, in soft body, $2.3 \pm 0.3 \,\mu g$ Cd/g, $0.7 \pm 0.2 \,\mu g$ Hg/g, and 45 μg Pb/g dry weight (dw). DNA alterations and upregulation of the cox1 mitochondrial gene were also observed in clam gill after exposure to the metal blend. For worms exposed to the C2 metal blend, DNA alterations and significant increase of Cd and Hg concentrations were observed reaching 0.5 \pm 0.1 µg Cd/g and 2 \pm 0.6 µg Hg/g dw.

Among the many contaminants released into Skikda Bay in Algeria, due to the industrial nature of the oil refineries adjacent to the city, are metals. These create significant

A. Dedeh · A. Ciutat · D. Tran · J.-P. Bourdineaud (⊠) CNRS, UMR EPOC 5805, University of Bordeaux, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France e-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

A. Dedeh e-mail: a.dedeh@epoc.u-bordeaux1.fr

A. Ciutat e-mail: a.ciutat@epoc.u-bordeaux1.fr

D. Tran e-mail: d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr marine pollution (Kehal et al. 2004; Nafissa et al. 2005) that may affect the aquatic environment through their potential toxicity to various ecosystem inhabitants, including humans, animals, and plants.

Metals may accumulate in aquatic species, such as bivalves, at concentrations several times greater than concentrations in water and sediment due to the ability of these animals to filter large quantities of particles, including contaminants, from seawater, sediment, or food. Consequently, clams Ruditapes philippinarum, commonly known as Manila clams, are used as sentinel organisms in monitoring programs assessing anthropogenic pressure such as metal pollution (Ramos-Gómez et al. 2011; Roméo and Gnassia-Barelli 1997; Smaoui-Damak et al. 2009; Wang et al. 2012). Polychaetes comprise an important proportion of the total biomass of deposit-feeding aquatic benthic invertebrates and are key species of the benthic community in coastal and estuarine sediments. The sediment-dwelling ragworm, Hediste diversicolor, is known to play a crucial role in the fate of chemicals in estuarine areas as a consequence of its relative tolerance and its influence on metal speciation through bioturbation, particle mixing, and irrigation (Banta and Andersen 2003; Berthet et al. 2003; Mouneyrac et al. 2003). H. diversicolor is thus an appropriate test organism for examining the fate and effects of metal in sediment systems. Its range extends from the Baltic Sea and North Sea southward to the Azores and Mediterranean Sea.

Metal genotoxicity has been investigated in bivalve species using various methodologies such as the comet assay, micronucleus assay, 8-oxoguanosine quantification, and random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology in clam species *R. decussatus* (Jebali et al. 2007) and *R. philippinarum* (Sacchi et al. 2013) and in mussel species *Mytilus galloprovincialis* (Bolognesi et al.

1999) and M. edulis (Emmanouil et al. 2007; Pruski and Dixon 2002). A drawback of these in situ studies is that they cannot link genotoxic outcomes with precisely identified pollutants especially when a natural environment is polluted with several heavy metals and hydrocarbons (Jebali et al. 2006; Sacchi et al. 2013). Micronucleus assay detected the onset of genotoxicity in M. galloprovincialis gill cells at 40 µg/L of divalent copper chloride and 32 µg/L of mercury chloride, but it showed no effect at a Cd chloride concentration as high as 184 µg/L (Bolognesi et al. 1999). Comet assay showed DNA damage in digestive gland of M. edulis after 10 days of exposure to 200 µg/L Cd and 10 µg/L hexavalent chromium (Cr) corresponding to accumulated concentrations of 39 \pm 11 µg Cd/g wet tissue and 2.7 \pm 2.9 µg Cr/g wet tissue (Emmanouil et al. 2007). In contrast, comet assay showed no effect of Cd in the same organism exposed to 200 µg/L for 4 weeks (Pruski and Dixon 2002). Thus, some discrepancies are linked to the genotoxic effects of Cd in mussel species.

In the present study, we assessed the genotoxic potential of polymetallic blends each containing three divalent metals (cadmium [Cd], lead [Pb], and mercury [Hg]). The aim was to assess the impact of environmentally relevant contamination, such as those encountered in the Skikda Bay, on two marine organisms, marine clams (R. philippinarum) and aquatic worms (H. diversicolor), to two metal mixtures. Animals collected in the Arcachon Bay were exposed for 8 days in microcosms made up of a mixed biotope consisting of a water column and natural marine sediment both taken up from the Arcachon Bay. Metal concentrations corresponded to the minimal and maximal observed in situ in Skikda Bay (Kehal et al. 2004). Metal accumulation was investigated in both animals, worms and clams (soft body and gill), whereas DNA alterations and gene expression modification were performed in clam gill only. Gill was chosen owing to its direct contact with the water: It constitutes the main target organ for metal uptake and accumulation and therefore is more susceptible to present gene expression modifications and DNA alterations.

Materials and Methods

The experiment was performed in the laboratory in fall 2010 using glass aquaria of $12 \times 12 \times 24$ cm containing a bottom layer of 7 cm of sediment and filled with 2 L of seawater (Arcachon bay, France). Water temperature was 16 ± 0.9 °C, salinity 33.5 ± 0.6 ‰, and pH 7.65 ± 0.8 . The experimental units (EUs) were permanently aerated by air bubbling in the superficial layers of the water column to produce an oxygen-saturated environment and exposed to a

12 to 12-h light-to-dark regime. The inside aquaria walls were lined with plastic to avoid metal adsorption and contamination. The sediment used was collected in eastern Arcachon bay in Graveyron (N 44° 42' 21", W 0° 57' 12", France) and was homogenized and sieved through a 2.5mm mesh. Background metals concentrations were 0.52 ± 0.007 , 0.095 ± 0.07 , and $1.85 \pm 0.20 \ \mu g/g$ (dw) (mean \pm SD) for Cd, Hg, and Pb, respectively.

We used two species: a bivalve (*R. philippinarum*) collected in fall 2010 at the entry to Arcachon bay, the Banc d'Arguin (N 44° 39' 50", W 1° 9' 51", France) [30.6 \pm 2.7 mm shell length (mean \pm SD)] and a polychaete worm (*H. diversicolor*) collected in fall 2010 from the natural sediment at Graveyron [57.0 \pm 3.4 mm length (mean \pm SD)]. It was essential to use the same sediment (that of Arcachon bay) as not to disrupt the natural style of life of the animals.

The animals were introduced into the EUs at least 1 week after sediment and water settling to allow physicochemical stabilization and acclimated for 24 h before metal addition. The experimental conditions were as follows: EUs with clams only, EUs with worms only, and EUs without animals. To mimic the contamination levels in Skikda Bay, the water column was contaminated for 8 days with two metal mixtures containing Cd, Hg, and Pb chlorides. The contamination levels were as follows: a control condition Co, a first nominal contamination level [(C1 in µg/L) Cd 1, Hg 0.1, and Pb 4] and a second nominal contamination level [(C2 in µg/L) Cd 17, Hg 1.1, and Pb 55]. C1 and C2 mimic the lowest and the highest metal concentrations observed in Skikda Bay, respectively (Kehal et al. 2004). Water analyses were impossible to perform for Cd and Pb because it was necessary to dilute the seawater samples to avoid the Zeeman quenching effect due to sodium chloride. After a 15-fold dilution of water samples, and because Cd and Pb concentrations were low, it appeared that metal concentrations were lower than the threshold of the Solaar spectrophotometer (0.1 µg Cd/L and 20 µg Pb/L). Indeed, to assay Cd and Pb in water samples, it was necessary to obtain salinity below or equal to 2.2 % in water sample (original salinity was 33 %). Therefore, water contamination was based on two additions of solutions containing CdCl2 and PbCl₂ at times 0 and 48 h. At time 0, 200 µL (C₁) or 3.4 mL (C₂) of a 10 mg/L CdCl₂ solution and 0.8 µL (C₁) or 11 µL (C2) of a 10 g/L PbCl2 solution were added to aquaria to give the desired C1 and C2 contamination levels. At time 48 h, double the time 0 volumes were added, thereby doubling the contamination levels.

Hg contamination was based on daily additions of a 150 mg/L HgCl₂ solution. Each day Hg concentration was analyzed, and the amount of HgCl₂ (ultrapure HgCl₂, Merck, Darmstadt, Germany) added was adjusted to compensate for the decrease in metal concentration during the 24-h cycles. Water additions were performed carefully every day to compensate for losses due to evaporation of water. No daily change of water compartments was performed so as not to resuspend sediment particles and cause water column contamination.

After 8 days of exposure, worms and clams were removed from microcosms and dissected. Soft body and gills were collected from each clam and small body sections from each worm for metal quantification, genotoxicity, and gene expression assessments. All samples were conserved at -80 °C until analyses.

Tissues were digested in 1-3 mL of nitric acid (depending on dry-tissue weight) at 100 °C for 3 h. The liquid underwent 6-fold dilution with ultrapure water (MiliQ, Bedford, MA, USA). Cd and Pb concentrations were determined by electrothermic atomic absorption spectrophotometry (AAS) with Zeeman correction using a graphite furnace (M6 Solaar AA spectrometer; Thermoptec, Mulgrave, Australia). Quantification of Hg for water and dried tissues was performed by flameless AAS (AMA 254; Altec, Prague, Czech Republic) with an estimated detection limit of 0.01 µg Hg/L. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by analyzing standard biological reference materials (Tort-2 Lobster Hepatopancreas and Dolt-4 Dogfish Liver from the National Research Council of Canada, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges [(Tort-2 in µg/g) Cd 26.7 ± 0.6, Pb 0.35 ± 0.13 , and Hg 0.27 ± 0.06 ; (Dolt-4 in µg/g) Cd 24.3 ± 0.8 , Pb 0.16 \pm 0.04, and Hg 2.58 \pm 0.22].

Genotoxic effects of metal mixtures were assessed using a RAPD-based methodology (Cambier et al. 2010; Geffroy et al. 2012; Orieux et al. 2011). Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen clam and worm tissues with a scalpel. For each condition, 1n clams and 10 worms were sampled. Crushed tissues were digested overnight at 37 °C with DNA extraction buffer at 7 mL per gram of tissue made up with 10 mM Tris pH 8, 100 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 8), 0.5 % sodium dodecyl sulfate, and 100 µg/mL proteinase K (Promega, Madison, WI, USA). After digestion, 2.5 mL saturated NaCl (6 M) was added and followed by centrifugation. RNase (10 mg/mL) was added to the supernatant at 20 µg/mL, and after 15 min of incubation at 37 °C, the DNA was precipitated with 2 volumes of 100 % absolute ethanol and removed by spooling. The DNA was rinsed with 70 % ethanol, dried, and resuspended in TE buffer (10 mM Tris pH 8, 0.1 mM EDTA).

Selected primers for RAPD-polymerase chain reaction (PCR) were obtained from Sigma-Proligo (St.Louis, MO, USA) and were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3') for clam DNA and OPB7 and OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3') for worm DNA. Real-time RAPD-PCRs were performed with the Lightcycler apparatus (Roche, Basel, Switzerland) as described (Lerebours et al. 2013). For each clam, using OPB7, OPB11, and ribosomal 28S probes (forward 5'GCTGCTCCATAAGTCG-3' and reverse 5'-TGAACTATGTCTGAGTAGGG-3'), the difference— $\Delta = Ct(28S)$ —Ct(OPB7 or OPB11—reflects the difference of hybridization efficiencies between the RAPD probe and 28S probe. It can be calculated from 2^{A+1}, which corresponds to the ratio of the number of hybridization sites of the OPB7 or OPB11 probe relative to the number of copies of the 28S gene. The same calculation was performed for worm genomic DNA using OPB7, OPA9, and ribosomal 16S probes (forward 5'-GTCCGCATTGGCC-TACC-3' and reverse 5'-GTTCGGTTGGGGGCGAC-3').

Melting-temperature curve analysis was performed using LightCycler Software 3.5 (Roche). For a given RAPD-PCR capillary tube, the melting temperature (*Tm*) of each PCR product peak was obtained to establish a frequency distribution of peak appearance at equal *Tm* for a set of ten different temperature intervals ranging from 78 to 89 °C. The comparison of distributions between two different exposure conditions indicates temperature intervals for which the frequency of PCR products for a known *Tm* differed.

After 8 days, clams were dissected and sampled tissues (gill) kept frozen in RNA-later (Qiagen, Limburg, Netherlands) at -80 °C until used. The expression of five genes was analyzed using five clams for each condition. Samples were crushed, and total RNA was extracted using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. However, to eliminate the maximum of lipids and proteins, we added a step of phenol chloroform-isoamylic alcohol (25:24:1 ratio) extraction. At the end of this process, 30 µL containing total RNA were collected. Firststrand cDNA was synthesized from 14 µL of total RNA using the Affinity ScriptMulti Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed in a thermocycler (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. All primer pairs were designed with the Lightcycler probe designer software (forward and reverse primer, respectively): cox1 = GTACCCTCCGTTGTCGT CA and CCTGTTACTCCTAAACACCAAGC; cytb = TTGATAGAGACGGGGGATGT and ATACCACTCAGGCT GGA; cat = CTGAGGCTACAGACAGATG and GTTGC CCTGGGCGATG; sod = GATAATGTTGATCATGCTGGACC and GTCTACATCAGCGTGAACGCAA; and 16S RNA = AGAAGACCCTGTCGAG and TTACGGCTGT TATCCCT. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to β-actin gene expression. The choice of the β-actin gene (forward and reverse primers were CGCACTTCCTCACGCCATCAT and GCAGCCGTCTCCATTTCTTGT, respectively) as a
reference was relevant because its expression did not vary on exposure to different metal blend concentrations since the mean Ct remained constant under different conditions (C_0 25.92 ± 1.0, C_1 24.81 ± 3.2, and C 24.53 ± 2.8).

Results

Cd, Pb, and Hg accumulations were quantified in soft body and gill for clam and in parts of whole body for worm. Results in soft body of clam showed a significant accumulation of the three metals, particularly at the highest concentration (C2) with 5.5-, 3.5-, and 20-fold increases compared with controls, respectively (2.3 \pm 0.3 µg Cd/g, $0.7 \pm 0.2 \ \mu g$ Hg/g, and 45 μg Pb/g dw) (Fig. 1a through 1c). In gill, there were insignificant increases in Cd but significant accumulation of Hg with 7.5- and 25-fold increases compared with controls at lower and higher exposures, respectively (0.6 \pm 0.2 and 2 \pm 0.4 µg Hg/g dw) (Fig. 1b), and in Pb with 2.7- and 14-fold increases compared with controls at lower and higher exposures, respectively (1.63 \pm 0.07 and $8.6 \pm 0.4 \ \mu g \ Pb/g \ dw$) (Fig. 1c). In worm tissue, no differential accumulation was observed at the lower metal exposure (Fig. 1a through 1c). At greater exposure, Pb accumulation showed an insignificant increasing trend, and there were significant Cd and Hg accumulations with 5.5- and 10-fold increases compared with controls, respectively $(0.5 \pm 0.1 \ \mu g \ Cd/g \ and \ 2 \pm 0.6 \ \mu g \ Hg/g \ dw).$

RAPD-PCR on genomic DNA extracted from gills of 10 individual clams showed a significant 10-fold decrease of OPB7 probe hybridization sites in clam DNA at C₂ exposure (Table 1) indicating metal-induced modifications in DNA composition. When comparing the frequency distribution of the OPB7-obtained PCR product *T*m among the temperature intervals, distribution increased in C₂-contaminated clam genomic DNA compared with controls at 83 °C to 84 °C: Only DNA from 5 of 11 control clams versus DNA from 10 of 11 C₂-contaminated clams presented a melting peak in this interval (p < 0.05) (Table 2).

For exposed worms, there was a 2.5-fold increase in the number of OPA9 probe hybridization sites in genomic DNA after C₁ exposure (Table 1). Differences in the distribution frequency of PCR product *T*m were observed. The OPB7 probe distinguished C₂-exposed DNA from both C₁-exposed and control DNA for the temperature intervals 80–81 °C and 81–82 °C, and the OPA9 probe distinguished C₁- and C₂exposed worms from control animals for the temperature intervals 88 to 89 °C and 85 to 86 °C, respectively (Table 2).

Relative gene expression in gill from exposed clams was compared with that from control clams. There was a



Fig. 1 Metal bioaccumulation in soft body and gill of clams and worms. a Cd, b Hg, and c Pb concentrations in ($\mu g/g$ dw) as mean \pm SE (n = 3). *Statistically significant values compared with control (C₀) as assessed by Mann–Whitney U test, p < 0.05

Table 1 Relative number of hybridization sites per genome unit of RAPD probes on genomic DNA from control and contaminated clams and worms

Experimental conditions	Clams		Worms	
Metallic blend	OPB7	OPB11	OPB7	OPA9
Co	0.02 ± 0.007	$(2.1 \pm 0.5) 10^{-4}$	3.3 ± 0.9	0.04 ± 0.008
Ci	0.02 ± 0.005	$(39 \pm 10) 10^{-4}$	4.3 ± 1.1	$0.1 \pm 0.01*$
C2	$0.002 \pm 0.0006*$	$(0.36 \pm 0.09) 10^{-4}$	4.5 ± 2.4	0.03 ± 0.01

Results are mean \pm SEM (n = 11 for clams and n = 10 for worms). The relative number of hybridization sites of a RAPD probe is defined as the ratio of the total hybridization sites of the RAPD probe over 16S (for clams) or 28S (for worms) ribosomal gene copies number

* Significant differences compared with unexposed controls as assessed by Mann-Whitney U test, p < 0.05

Table 2 Frequency according to temperature intervals (C^o) to which belong the T_m values of PCR products obtained with probes on genomic DNAs from clams and worms

Animal	Co	Ci	C2	
Clams (°C)	OPB7			
83-84	0.45	0.5	0.91ª	
Worms (°C)	OPB7			
80-81	0.5	0.7	0.1 ^a	
81-82	0	0.2	0.7*	
	OPA9			
85-86	0.4	0.7	0 ^a	
88-89	0	0.8ª	0.2	

^a Metal blend concentration for which the frequency of occurrences of peaks belonging to the indicated temperature intervals discriminates significantly contaminated genomic DNA from controls (n = 11 for clams and 10 for worms) as assessed by Mann–Whitney U test, p < 0.05

significant 50-fold induction of *cax1* gene expression in C₂exposed animals. The expression of *cytb* and mitochondrial ribosomal 16S RNA genes were upregulated 10 and 20 times, respectively (Table 3).

Discussion

The present work showed that exposure of *R. philippina*rum and *H. diversicolor* to metal blends led to the accumulation of Cd, Pb, and Hg and triggered genotoxic effects on both animals. We performed combined exposures because single exposures to metals have already been described for R. philippinarum and H. diversicolor. When R. philippinarum was exposed to 15 µg/L of CdCl2, 400 ng/g (dw, dry weight) of Cd was quantified in gills after 7 days (Paul-Pont et al. 2010). Exposure of R. philippinarum to 700 µg/L of PbCl2 during 7 days led to accumulation of Pb reaching 170 and 160 µg/g (dw) in soft body and gill, respectively (Blasco and Puppo 1999). In R. philippinarum collected from natural sites containing 0.65 ng/L of total Hg (0.35 ng/L of total dissolved Hg), body burden of Hg reached 47 ng/g dw 16.6 ng/g MeHg dw) (Pan and Wang 2011). Several studies assessed metal (Cd, Pb, and Hg) bioaccumulation in H. diversicolor. When H. diversicolor was exposed to 10 µM of CdCl2, 4.5 µg Cd/g was recorded in this worm after 7 days (Lianzhen et al. 2012). In H. diversicolor collected from Restronguet estuary sediment containing 336 µg/g of Pb dw, Pb body burden reached 89 µg/g dw (Rainbow et al. 2011). In worms collected from Mondego estuary sediment containing 5.3 µg/g of Hg dw, Hg reached 0.1 µg/g (wet weight) (Cardoso et al. 2009). It should be stressed that the metal burden of the marine sediment we collected in Arcachon is far lower than the previously described metal concentrations with 180 times less Pb than in Restronguet estuary and 56 times less Hg than in Chegado estuary. In the present study, differences of Cd and Hg accumulations were observed between clam soft body and gill because gill accumulated two times more Hg than soft body mainly at greater concentration. However, soft body accumulated

Table 3 Relative expression of selected genes in gill from control and contaminated clams after 8 days of metal exposure

Blend	coxl	cytb	sod	cat	168 RNA
Co	4.7 ± 1.3	$(8 \pm 5) \times 10^{-2}$	2.3 ± 1.4	0.2 ± 0.1	0.002 ± 0.001
C1	15.3 ± 6.8	$(81 \pm 52) \times 10^{-2}$	13.6 ± 8.5	0.5 ± 0.1	0.005 ± 0.004
C ₂	$237 \pm 125*$	$(650 \pm 509) \times 10^{-2}$	20.1 ± 12.9	0.2 ± 0.05	$0.04 \pm 0.01*$

Differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in gill clam in the indicated condition compared with that of control clams. Clam exposure was performed in presence of worms

* Statistically significant differential expression (mean \pm SEM, n = 5) as assessed by Mann–Whitney U test, p < 0.05

5-fold more Pb than gill. This difference could be due to the ability of clams to segregate Pb by forming granules as a way of detoxification. This has been shown in the earthworm Aporrectodea caliginosa collected from a nonpolluted soil containing 35 mg/kg dw of Pb. More than two-thirds of Pb accumulated in A. caliginosa was mainly found in the granular fraction, in which Pb was bound to cysteine residues coming from the degradation of metallothioneins (Vijver et al. 2006). Exposure of the freshwater bivalve Hyridella australis to Pb-spiked sediment also showed a difference of Pb accumulation between tissues due to granules formation. Labial palps accumulated 2.6fold more Pb than gill reaching 13 µg Pb/g dw after exposure for 28 days to sediment spiked with 419 µg Pb/g. The tissue accumulating the most Pb was hepatopancreas, and 75 % of this metal was sequestered into the granule fraction (Marasinghe Wadige et al. 2014). A reversed pattem of accumulation has been described in that clam species exposed for 7 days to much greater Pb concentrations (350 µg/L), which led to a 2.5 increased burden of Pb in gills compared with soft body (Blasco and Puppo 1999). At greater concentrations of Pb (700 µg/L), the difference vanished. For Cd and Cu, there were no differences in accumulated metal between soft body and gils at 200 or 600 µg Cd/L and 10 or 20 µg copper (Cu)/L (Blasco and Puppo 1999). These discrepancies are likely due to the high metal concentration used in that study compared with the present work.

In the present study, worms accumulated 5 times less Cd and 4.5 times less Pb than clams, whereas worms accumulated 3 times more Hg than clam soft body. This could be due to the animals' lifestyles and exposure route. In fact, R. philippinarum and H. diversicolor are different in terms of habitat, behavior, and feeding. H. diversicolor lives buried in sediment and displays a bioturbation activity called "biodiffusion" and as such regularly irrigates its burrow with polluted water (Nielsen et al. 1995; Scaps 2002). R. philippinarum is a deposit filter feeding that lives buried partially in the sediment and filters the water compartment. Accumulation results obtained in H. diversicolor are similar to those observed in tubificidae worms exposed to Cd from the overlying water column (20 µg Cd/L) with an observed burden of 12 µg Cd/g dw after 21 days (Ciutat et al. 2005b). This efficient bioaccumulation was shown to result from bioturbation, thus increasing the transfer of Cd from the water column to the sediment with calculated rates after 21 days of 616 \pm 46 and 237 \pm 44 ng Cd/cm²/d in the presence and absence of worms, respectively (Ciutat et al. 2005a). Sediment can also be the predominant source of Cd accumulated by polychaete worms (Kalman et al. 2010).

Our results showed deoxyribonucleic acid, DNA alterations caused by metal blends. In fact, genotoxicity was correlated with metals burden in animals. In the present work, using quantitative RAPD we looked at the creation or elimination of hybridization sites of probes on genomic DNAs of contaminated organisms compared with controls along with modifications of PCR products' melting temperature, Tm profiles, which are effective parameters in detecting small changes in DNA sequences (Cambier et al. 2010; Lerebours et al. 2013). Indeed OPB7, OBP11, and OPA9 probes highlighted DNA alterations in R. philippinarum and H. diversicolor caused by metal contamination. It should be noted that clams and worms were collected in situ so they were genetically different. This genetic diversity is reflected by the fact that the frequency of PCR products for each melting temperature class is for many of the classes different from 1 and 0 (situation expected in the case of a clonal species). Metal genotoxicity has been shown in Scrobicularia plana and the polychaete H. diversicolor exposed to 10 µg/L of ionic Cu for 21 days (Buffet et al. 2013), and H. diversicolor exposed to a sediment spiked with 50 mg/kg of ionic silver (Ag) for 10 days showed accumulation of $10 \pm 5 \ \mu g$ Ag/g dw (Cong et al. 2011). In the present study, the concentrations of metal resulting in DNA damage were in the same range (a few micrograms per gram of dry weight). DNA damage was shown in worms by the increase of OPA9 probe hybridization sites after exposure to the C1 polymetallic blend but not the C2 blend. This is reminiscent of the detection of genotoxicity in M. galloprovincialis gill cells after exposure to 40 but not 80 µg/L of divalent Cu chloride (Bolognesi et al. 1999). Comet assay showed DNA damage in digestive gland of M. edulis after 10 days of exposure to 200 µg/L of Cd and 10 µg/L of hexavalent Cr corresponding to accumul ated concentrations of $39 \pm 11 \ \mu g$ Cd/g wet tissue and $2.7 \pm 2.9 \ \mu g$ Cr/g wet tissue (Emmanouil et al. 2007). In contrast, comet assay showed no effect of Cd in the same organism exposed to 200 µg/L for 4 weeks (Pruski and Dixon 2002).

However, because the detected number of hybridization sites is a balance between created and lost sites, the absence of difference between control and exposed animals does not necessarily indicate the absence of DNA alterations. Indeed, the analysis of the frequency of PCR products showed significant differences for C₂-exposed worms compared with controls.

Because CoxI is a subunit 1 of cytochrome c oxidase, which performs the critical function of transferring electrons from cytochrome c to oxygen and hence contributing to adenosine triphosphate generation during respiration (Malatesta et al. 1995), mitochondrial respiration was likely impacted in C₂-exposed animals. Overexpression of the coxI gene has been shown in a pyrethroid insecticideresistant strain of *Blatella germanica* (German cockroach) (Pridgeon and Liu 2003), in *Danio rerio* (zebrafish) fed diets contaminated by methyl Hg (Gonzalez et al. 2005), and in freshwater and marine bivalves exposed to Cd (Achard-Joris et al. 2006). Because CoxI is considered as the rate-limiting step for mitochondrial respiration (Villani and Attardi 2000), *cox1* gene overexpression could be a compensatory mechanism to restore decreased mitochondrial activity and efficiently consume oxygen, thus limiting Cd-induced damage in the cell. The proposal of such an adaptive mechanism is strengthened by the parallel overexpression of the *cytb* gene encoding the main subunit of respiratory chain complex III. Last, the overexpression of the 16S ribosomal RNA gene indicates that the number of mitochondria increased, which fits well with a compensatory response.

To conclude, animals exposed in the laboratory to environmentally relevant polymetallic concentrations displayed DNA alterations and modified patterns of gene expression. The effects of the metal mixture were observed at the greatest concentration after 8 days of exposure, thus showing a rapid effect on animal molecular biology. In their natural habitat, animals are facing these levels of metal pollution for many months at a time; thus, the real impact might well be worse than observed in these microcosms.

References

- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP (2006) Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals 19:237–244
- Banta G, Andersen O (2003) Bioturbation and the fate of sediment pollutants experimental case studies of selected *infauna* species. Vie Milieu 53:233–248
- Berthet B, Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthelot Y, Le Hen A et al (2003) Accumulation and soluble binding of cadmium, copper, and zinc in the polychaete *Hediste diversi*color from coastal sites with different trace metal bioavailabilities. Arch Environ Contam Toxicol 45:468–478
- Blasco J, Puppo J (1999) Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). Comp Biochem Physiol C 122:253–263
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. Environ Mol Mutagen 33:287–292
- Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A et al (2013) A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia* plana, Hediste diversicolor). Environ Sci Technol 47:1620–1628
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP (2010) Cadmiuminduced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicol Environ Saf 73:312–319
- Cardoso PG, Lillebø AI, Pereira E, Duarte AC, Pardal MA (2009) Different mercury bioaccumulation kinetics by two macrobenthic species: The bivalve Scrobicularia plana and the polychaete Hediste diversicolor. Mar Environ Res 68:12–18
- Ciutat A, Anschutz P, Gerino M, Boudou A (2005a) Effects of bioturbation on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments. Environ Toxicol Chem 24:1048–1058

- Ciutat A, Gerino M, Mesmer-Dudons N, Anschutz P, Boudou A (2005b) Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. Ecotoxicol Environ Saf 60:237–246
- Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE (2011) Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron and ionic-Ag in the polychaete *Nereis diversicolor*. Aquat Toxicol 105:403–411
- Emmanouil C, Sheehan TMT, Chipman JK (2007) Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). Aquat Toxicol 82:27–35
- Geffroy B, Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP (2012) Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6:144–160
- Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (Danio rerio). Environ Sci Technol 39:3972–3980
- Jebali J, Banni M, de Almeida EAD, Boussetta H (2007) Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. Environ Monit Assess 124:195–200
- Kalman J, Smith BD, Riba I, Blasco J, Rainbow PS (2010) Biodynamic modelling of the accumulation of Ag, Cd and Zn by the deposit-feeding polychaete Nereis diversicolor: interpopulation variability and a generalised predictive model. Mar Environ Res 69:363–373
- Kehal M, Mennour A, Reinert L, Fuzellier H (2004) Heavy metals in water of the Skikda bay. Environ Technol 25:1059–1065
- Lerebours A, Cambier S, Hislop L, Adam-Guillermin C, Bourdineaud JP (2013) Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen 755:55–60
- Lianzhen L, Xiaoli L, Liping Y, Linbao Z, Jianmin Z, Huifeng W (2012) Uptake pathways and subcellular fractionation of Cd in the polychaete Nereis diversicolor. Ecotoxicology 21:104–110
- Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M (1995) Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. Biophys Chem 54:1–33
- Marasinghe Wadige CP, Taylor AM, Maher WA, Ubrihien RP, Krikowa F (2014) Effects of lead-spiked sediments on freshwater bivalve, *Hyridella australis*: linking organism metal exposure-dose-response. Aquat Toxicol 149:83–93
- Mouneyrac C, Mastain O, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Beaunier P, Jeantet AY et al (2003) Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. Mar Biol 143:731–744
- Nafissa B, Bouzerna N, Chettibi H (2005) Assessment of the petrochemical industry pollution on the Skikda bay, Algeria. Int J Environ Res Public Health 2:463–468
- Nielsen AM, Eriksen NT, Lonsmann Iversen JJ, Riisgard HU (1995) Feeding, growth and respiration in the polychaetes Nereis diversicolor (facultative filter-feeder) and Nereis virens (omnivorous): a comparative study. Mar Ecol Prog Ser 125:149–158
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J et al (2011) Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol Environ Saf 74:974–983
- Pan K, Wang WX (2011) Mercury accumulation in marine bivalves: influences of biodynamics and feeding niche. Environ Pollut 159:2500–2506
- Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C et al (2010) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve

Ruditapes philippinarum in European populations. Environ Pollut 158:3401-3410

- Pridgeon JW, Liu N (2003) Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). Insect Biochem Mol Biol 33:1043–1048
- Pruski AM, Dixon DR (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. Aquat Toxicol 57:127–137
- Rainbow PS, Kriefman S, Smith BD, Luoma SN (2011) Have the bioavailabilities of trace metals to a suite of biomonitors changed over three decades in SW England estuaries historically affected by mining? Sci Total Environ 409:1589–1602
- Ramos-Gómez J, Coz A, Viguri JR, Luque A, Martín-Díaz ML, Ángel DelValls TA (2011) Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. Environ Pollut 159:1914–1922
- Roméo M, Grassia-Barelli M (1997) Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam Ruditapes decussatus. Comp Biochem Phys C 118:33–37
- Sacchi A, Mouneyrac C, Bolognesi C, Sciutto A, Roggieri P, Fusi M et al (2013) Biomonitoring study of an estuarine coastal

ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using Ruditapes philippinarum (Mollusca: Bivalvia). Environ Pollut 177:82-89

- Scaps P (2002) A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida: Polychaeta). Hydrobiologia 470:203–218
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2009) Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). Comp Biochem Phys C 139:181–188
- Vijver MG, van Gestel CA, van Straalen NM, Lanno RP, Peijnenburg WJ (2006) Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). Environ Toxicol Chem 25:807–814
- Villani G, Attardi G (2000) In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. Free Radic Biol Med 29:202-210
- Wang Z, Yan C, Vulpe CD, Yan Y, Chi Q (2012) Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. Mar Pollut Bull 64:90–98

IMPACT D'UN SÉDIMENT DOPÉ AUX NANOPARTICULES D'OR OU DE SULFURE DE CADMIUM SUR UN INVERTEBRÉ ET UN POISSON D'EAU DOUCE

RESUME. Le but de cette thèse était de déterminer l'impact de deux types de nanoparticules métalliques (sulfure de cadmium - CdS - et or - Au) sur deux organismes aquatiques modèles (vers tubifex et poisson zèbre Danio rerio). L'approche a consisté à doper le sédiment de la Garonne avec les deux types de nanoparticules et caractériser l'effet de cette contamination sur les deux organismes en utilisant plusieurs marqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (réponses biochimiques, activité de neurotransmission, génotoxicité, expression génétique et activité de bioturbation). Les effets ont été évalués après exposition aux sédiments contaminés dans des systèmes expérimentaux de types microcosmes durant une vingtaine de jours. Dans un certain nombre de cas, ce travail a révélé un effet des nanoparticules qui n'était pas dû au métal mais aux propriétés nanoparticulaires. En effet, dans le cas des nanoparticules de CdS, nous avons observé des altérations du génome ainsi que la modification de l'activité de bioturbation des vers tubifex en réponse à la contamination aux nanoparticules mais pas à celle de la forme ionique. Dans ce travail nous avons pu observer le relargage des nanoparticules d'or depuis le sédiment vers la colonne d'eau, et sa biodisponibilité potentielle pour les poissons. Ces nanoparticules provoquaient des altérations de l'ADN chez les deux organismes, la modification de l'expression de certains gènes et l'augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase chez le poisson zèbre. Les résultats de bioturbation n'ont pas montré d'effets des nanoparticules d'or sur le mouvement des vers.

MOTS CLES. Nanoparticules métalliques, sédiment, *Tubifex tubifex, Danio rerio*, génotoxicité, bioturbation.

IMPACT OF GOLD AND CADMIUM SULPHIDE SPIKED IN SEDIMENT ON VERTEBRATE AND FRESHWATER FISH

ABSTRACT. The aim of this thesis was to determine the impact of two types of metal nanoparticles (cadmium sulphide - CdS - and gold - Au) on two aquatic models (tubifex worms and zebrafish *Danio rerio*). The approach has been to dope the Garonne sediment with the two types of nanoparticles and characterize the effect of this contamination on the two animals using multiple markers at different levels of biological organization (biochemical responses, neurotransmission activity, genotoxicity, gene expression and bioturbation activity). The effects were evaluated after exposure to contaminated sediment in experimental microcosms systems for twenty days. In a number of cases this work revealed an effect of the nanoparticles that was not due to metal but to the nanoparticulate properties. Indeed, in the case of CdS nanoparticles, we observed alterations in the genome as well as the modification of the bioturbation activity of worms tubifex in response to the contamination of nanoparticles from the sediment into the water column, and its potential bioavailability to fish. These nanoparticles were causing DNA damage in both organisms, modifying the expression of certain genes and increased acetylcholinesterase activity in zebrafish. Bioturbation results showed no effects of gold nanoparticles on the movement of worms.

KEY WORDS. Metallic nanoparticles, sediment, *Tubifex tubifex*, *Danio rerio*, génotoxicity, bioturbation.

CNRS UMR EPOC 5805, Station marine d'ARCACHON, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France