



HAL
open science

Nanocontamination d'organismes aquatiques par des particules inorganiques : transfert trophique et impacts toxiques

Fanny Perrier

► **To cite this version:**

Fanny Perrier. Nanocontamination d'organismes aquatiques par des particules inorganiques : transfert trophique et impacts toxiques. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0959 . tel-01739724

HAL Id: tel-01739724

<https://theses.hal.science/tel-01739724v1>

Submitted on 21 Mar 2018

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
SPÉCIALITÉ GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par FANNY PERRIER

**Nanocontamination d'organismes aquatiques par des particules inorganiques :
transfert trophique et impacts toxiques**

Sous la direction de : Olivier SIMON
Co-encadrement : Agnès FEURTET-MAZEL et Magalie BAUDRIMONT

Soutenue le 21 décembre 2017

Membres du jury :

Mme Valérie BOLLIET, *Professeure, Université de Pau et des Pays de l'Adour* Présidente
Mme Catherine MOUNEYRAC, *Professeure, Université Catholique de l'Ouest* Rapportrice
M. Alain GEFFARD, *Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne* Rapporteur
M. Eric PINELLI, *Professeur, Université de Toulouse* Rapporteur
M. Olivier SIMON, *Chargé de recherche, IRSN* Directeur de thèse
Mme Agnès FEURTET-MAZEL, *Maître de conférences, Université de Bordeaux* . Co-encadrante de thèse
Mme Magalie BAUDRIMONT, *Professeure, Université de Bordeaux* Co-encadrante de thèse

**Nanocontamination
d'organismes aquatiques
par des particules inorganiques :
transfert trophique et impacts toxiques**

FANNY PERRIER

2017

RÉSUMÉ

En raison d'une utilisation croissante et massive, les nanoparticules manufacturées apparaissent comme de potentiels contaminants émergents pour l'environnement, incluant notamment les écosystèmes aquatiques. Alors que le transfert trophique semble constituer une voie d'exposition majeure pour les organismes, une connaissance lacunaire dans la littérature scientifique persiste, résultant pour partie des difficultés expérimentales inhérentes à ce type d'exposition. Pour ce travail en conditions contrôlées de laboratoire, les nanoparticules d'or (sphériques, 10 nm, fonctionnalisées aux PEG-amines), stables en solution, ont été choisies pour l'étude du transfert trophique et des impacts toxiques sur des organismes aquatiques. Ce *continuum* trophique considère la base des réseaux trophiques (biofilms naturels, algues), des niveaux intermédiaires (poissons brouteurs, bivalves suspensivores), jusqu'aux organismes de haut de chaînes trophiques, avec l'anguille européenne. Avec des expositions réalisées à de relatives faibles doses, ce travail tend à la représentativité environnementale. Des approches méthodologiques intégratives des niveaux subcellulaire à tissulaire (RT-qPCR, séquençage haut-débit, histologie) ont permis d'évaluer les impacts toxiques.

Les résultats indiquent une importante capacité de rétention des nanoparticules par les biofilms naturels. À la suite d'une exposition de 21 jours, les dosages d'or révèlent un transfert des biofilms aux poissons brouteurs, avec une distribution de l'or dans tous les organes. De plus, ce transfert est associé à une réponse inflammatoire au regard des lésions histologiques observés dans les foies, rates et muscles des poissons exposés. Une chaîne alimentaire « naturelle » à trois maillons trophiques, impliquant algues - bivalves - anguilles européennes, atteste d'un transfert significatif jusqu'au poisson prédateur. Enfin, l'analyse du transcriptome, par une approche de séquençage haut-débit, des foies et cerveaux d'anguilles exposées aux nanoparticules par nourriture enrichie, a permis de mettre en évidence une réponse conjointe à ces deux organes dans des processus biologiques associés au système immunitaire et sa régulation, dont des récepteurs NOD-like impliqués dans l'inflammasome.

L'ensemble des résultats expérimentaux interpellent quant aux effets délétères à long-terme qu'engendreraient les nanoparticules sur les écosystèmes aquatiques, illustrant par ailleurs la propension de ces contaminants à être transférés dans les chaînes trophiques.

Mots clés : Nanoparticules d'or, expositions chroniques, transfert trophique, écosystème aquatique, algues - biofilms naturels, bivalve - poisson brouteur, poisson prédateur, histologie, transcriptomique, séquençage haut-débit.

ABSTRACT

Due to an increasing and massive use, engineered nanoparticles are raising as potential emerging contaminants in the environment, including aquatic ecosystems. While trophic transfer appears to constitute a major exposure route for organisms, scientific literature has difficulties to respond to the questions raised to explore the range of the interactions existing between nanoparticles and living organisms at different scales from the trophic interactions to the cellular impacts. This problem is partly due to experimental difficulties inherent to this exposure type. For this work performed in controlled laboratory conditions, spherical gold nanoparticles (10 nm, coated with PEG-amines, positively charged) were chosen to study the trophic transfer and toxic effects on aquatic organisms. Trophic chains concerned several trophic levels (up to three) with a variety of species considered : the basis of the trophic web with natural biofilms or microalgae, intermediate levels with grazing fish or suspensivorous bivalves, and up to top food chain organisms, with the European eel, a carnivorous fish. With relatively low doses for exposures, this work tends to represent environmental conditions. Integrative methodological approaches from subcellular to tissue levels (RT-qPCR, RNA-sequencing, histology) were performed in order to assess toxic impacts.

The results indicate a high retention capacity of nanoparticles by natural biofilms. Following a 21-day exposure, gold quantifications reveal a transfer from biofilms to grazing fish, with a gold distribution in all organs. Moreover, this transfer is associated with an inflammatory response according to the histological lesions observed in the liver, spleen and muscle of exposed fish. A longer food chain, with three trophic levels involving microalgae - bivalves - European eels, is set up to give a better representation of the complexity of trophic interactions in the aquatic environment. It shows a significant transfer to the predatory fish. Transcriptomic analyses, using the RNA-sequencing approach, for the liver and the brain of exposed eels by nanoparticles' enriched food, highlight a joint response for these two organs in the biological processes associated with the immune system and its regulation, including NOD-like receptors involved in inflammasome.

All the experimental results suggest long-term harmful effects that nanoparticles would generate in aquatic ecosystems, emphasizing the ability of these contaminants to be transferred throughout trophic chains.

KEYWORDS : Gold nanoparticles, chronic exposure, trophic transfer, aquatic ecosystem, algae - natural biofilms, bivalve - grazer fish, predatory fish, histology, transcriptomic, high throughput sequencing.

REMERCIEMENTS

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire EPOC, et plus particulièrement au personnel de la Station Marine d'Arcachon pour leur accueil.

Merci à Olivier SIMON, Agnès FEURTET-MAZEL et Magalie BAUDRIMONT pour m'avoir confié ce projet et accordé une très grande autonomie pour ce travail de thèse. Trois années passées à vos côtés que je ne saurais oublier de sitôt.

Merci aux membres du jury : Catherine MOUNEYRAC, Alain GEFFARD et Eric PINELLI pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, Valérie BOLLINET pour l'évaluation de cette thèse.

Merci à l'ensemble de l'équipe d'Écotoxicologie Aquatique pour son accueil et pour l'animation quotidienne du laboratoire.

Merci à Alexia, pour m'avoir fait confiance en me permettant d'enseigner à l'université pendant 2 ans.

Merci à Fabien, pour nos discussions scientifiques, pour son aide et pour son sens de la négociation.

Merci à Anthony, pour son aide dans le traitement des données de séquençage.

Merci à l'équipe « dissection anguilles » pour sa participation à ces journées chargées (et pas franchement agréables...!) : Fabien, Pierre-Yves, Nathalie, Maria et Anthony.

Merci à Bruno. Parce que nous en avons fait des kilomètres ensemble, des parties de pêche, des poses de cages par dizaines... et par tous les temps. Je te remercie pour ton aide, notamment dans la mise en place des dispositifs expérimentaux.

Merci à Cerise et Pierre-Yves pour leurs formations aux outils de bio-

logie moléculaire et de chimie des métaux. Merci à Patrice, pour avoir trouvé, dans l'urgence, une machine fonctionnelle pour les analyses de qPCR.

Merci à Nathalie, pour la préparation des échantillons de microscopie, pour les séances animées de MET. Souvenirs aussi de notre virée à Aix-en-Provence avec ses longs moments d'attente sous les pins, mélodieusement bercés par le chant strident des paons, et le suspense lié à la recherche de nos échantillons chez nos hôtes...

Merci à Sabrina Lacomme, pour avoir pris le temps de réfléchir avec nous au solutionnement des analyses EDX. Et l'occasion aussi de remercier l'ensemble de l'équipe du BIC de Bordeaux - pôle microscopie électronique pour son accueil.

Merci à Stéphane MORNET et à Noélia pour la synthèse rapide d'une grande quantité de nanoparticules d'or.

Merci à Oleg POKROVSKY et Frédéric CANDAUDAP pour leur accueil au GET de Toulouse et pour l'accès à l'HR-ICP-MS.

Merci à Christian, Henri, Jacques et Kévin pour l'aménagement de la salle d'expérience.

Merci au pêcheur, pour nous avoir fourni rapidement des anguilles de qualité lorsque nous en avons besoin.

Merci à Alison et Mohcine pour leur gentillesse respective.

Merci à Jean-Paul pour sa singularité, sa sympathie et le partage de son immense savoir.

Merci à toi, Flo! Merci pour ton soutien, ta gentillesse et aussi pour ton aide. Tu as toujours répondu présente pour me donner un coup de main, alors merci. Tu ne recules jamais devant la difficulté, et je veux te témoigner ici de mon très grand respect et de mon affection.

Un grand merci à mes proches voisines et voisins de bureau, pour

m'avoir permis de travailler dans la joie et la bonne humeur : Maria, Laura, Mickaël et Damien.

Maria, dès mon arrivée, tu t'es montrée bienveillante à mon égard, tu as toujours retroussé tes manches pour m'aider. Je pense notamment à ce qui s'apparentait plus à un atelier de cuisine qu'à de la science. Tu te souviens de toutes ces heures passées à lever les 3 kg de filets de vive... J'ai passé de très bons moments à tes côtés, et je te remercie vivement pour continuer à me soutenir, même au-delà de l'Atlantique.

Mickaël, merci pour ton aide concernant la logique de la biologie moléculaire notamment. Je te remercie pour avoir toujours été là quand j'avais besoin.

Damien, je te remercie pour nos intéressantes discussions littéraires, musicales, cinématographiques et radiophoniques, pour le partage motivé de ton point de vue, et pour ton sens de la formule. Merci aussi pour ton altruisme, ton aide et le prêt de matériel divers.

Laura, je te remercie pour ta très grande gentillesse et ton apaisante présence. De Barcelone à Luxey, j'ai toujours passé de très agréables moments à tes côtés. Merci pour ton très précieux soutien et pour avoir rendu ces années un peu plus humaines.

Merci à toutes celles et à tous ceux qui m'ont témoigné d'un soutien motivé. Merci tout particulièrement à Mabel, Sarah, Alyssa, Nathalie et Félix.

Je remercie chaleureusement tous mes proches pour vos encouragements, votre bienveillance et vos soutiens, qui n'ont jamais tari malgré les 800 km qui nous séparent depuis maintenant 5 ans. Un très grand merci à mes Jurassiens, à Mémé Berthe et Pépé, à Mamie Cath et Parrain Kiki. Merci à mon petit frère Gabin. Et surtout, merci à vous, Maman et Papa.

COMMUNICATIONS

« **From natural biofilm to grazer fish : a first step for gold nanoparticles trophic transfer** » (poster) at the 10th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials (ICEENN - September 2015 - Vienna, Austria).

« **Nanoparticles, a risk for the environment through their transfer along an aquatic food chain?** » (poster) at the 26th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe - May 2016 - Nantes, France).

« **Microscopic approach reveals tissue alterations induced by nanoparticles in fish** » (poster) at the 16th European Microscopy Congress (EMC - August 2016 - Lyon, France).

« **Nanoparticles as technological innovations : Stairway to Heaven or Sympathy for the Devil?** » (oral) at the 30th European Society for Comparative Physiology and Biochemistry Congress (ESCPB Congress - September 2016 - Barcelona, Spain).

INTRODUCTION

La révolution nanométrique est en marche depuis plus d'une vingtaine d'années. L'Homme s'est approprié le contrôle et le réarrangement volontaire de la matière, aux niveaux atomique et moléculaire, dans une gamme de tailles allant de 1 à 100 nm, afin de créer des « nanomatériaux ». À cette échelle de taille, celle du nanomètre, des propriétés spécifiques de la matière émergent alors qu'elles ne sont retrouvées pour aucune autre forme. De fait, la transposition des nanosciences en technologies présage des avancées majeures, et des retombées économiques tout autant attrayantes, pour les acteurs du secteur (Roco et al. 2011). En élargissant le champ des possibles, ces nanotechnologies s'invitent dans un large spectre d'applications, balayant de nombreux domaines, de la médecine à l'aérospatiale, en passant par l'industrie de l'agroalimentaire, de l'énergie et du textile, *etc.* (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016). Ainsi, un rapport du Sénat français, publié en 2009, évaluait à environ 2000, le nombre de nanoparticules manufacturées d'ores et déjà commercialisées, présentes dans plus de 700 produits de consommation courante (BRAYE et al. 2009).

Il y a maintenant une dizaine d'années, des premiers travaux scientifiques ont montré la possibilité d'un relargage des nanomatériaux manufacturés dans l'environnement, notamment dans les eaux de ruissellement (KAEGI et al. 2008 ; KAEGI et al. 2010). Néanmoins les verrous analytiques actuels limitent considérablement les connaissances en termes de concentrations réellement présentes dans l'environnement. Par conséquent, les niveaux de contaminations des écosystèmes engendrés par le relargage de ces nanomatériaux demeurent, pour l'heure, encore difficilement évaluable.

Alors que l'écosystème se définit comme un ensemble dynamique composé de biocénoses, en interrelations entre elles-mêmes et avec leur biotope, les relations trophiques constituent de fait l'une des interactions majeures entre les organismes à cette échelle. Par ailleurs, il n'est plus à démontrer que les interactions trophiques sont en mesure de contribuer aux

transferts des contaminants anthropiques dans les écosystèmes. À l'heure actuelle, au regard de la diversité des nanomatériaux manufacturés, relativement peu d'études renseignent le transfert trophique de ceux-ci (ANSES 2014; TANGAA et al. 2016) alors que (1) il s'apparente comme l'une des voies majeures de contamination des organismes aquatiques (FERRY et al. 2009; HOLBROOK et al. 2008; WANG et al. 2016), et que (2) il tend à intégrer la complexité environnementale (BOUR et al. 2015a). Ainsi, à défaut d'études *in situ* pour les raisons sus-mentionnées, la réalisation de chaînes trophiques en conditions contrôlées permet d'appréhender la complexité environnementale et de tendre à l'évaluation des risques liés à l'exposition aux nanomatériaux pour les écosystèmes.

Par ailleurs, les propriétés particulières des nanomatériaux nécessitent une évaluation singulière de leur toxicité pour les organismes exposés. Il est par conséquent nécessaire de renseigner les impacts biologiques selon des approches affranchies de jugements *a priori*, afin d'identifier la spécificité des nano-expositions. La toxicologie présente une avancée considérable en ce sens, avec notamment des approches intégrant l'ensemble de la réponse du transcriptome (CHO et al. 2009; ZHANG et al. 2017), essentiellement renseignée pour des expositions aiguës chez des rongeurs ou des cultures cellulaires. En écotoxicologie, l'approche classique, et non moins indispensable, des « biomarqueurs » est majoritairement utilisée pour évaluer la réponse des organismes aux nanomatériaux (ATES et al. 2014; DEDEH et al. 2014; GOMES et al. 2012; PHAM et al. 2012; RENAULT et al. 2008; TEDESCO et al. 2008). Ainsi, il convient aussi d'appliquer les approches sans *a priori* pour les expositions environnementales, conjointement aux approches classiquement pratiquées, pour renseigner de manière intégrative la toxicité des nanomatériaux.

Dans ce contexte, le présent travail a été réalisé dans le cadre du projet ANR CITTOXIC-NANO (2014 - 2018, Multiscale approaches to characterize Cellular Interaction, Trophic transfer and TOXIC impacts of metallic NPs in aquatic organisms). Ce projet interdisciplinaire a pour objectif d'étudier le comportement, l'internalisation, les impacts toxiques et le transfert trophique de nanoparticules métalliques fonctionnalisées, intégrant une large gamme de niveaux organisationnels, de la cellule à aux écosystèmes aquatiques.

Parmi la diversité des nanomatériaux manufacturés, les nanoparticules

d'or sphériques (10 nm) ont été choisies comme contaminant modèle pour ce travail. Elles présentent en effet de nombreux atouts, telle qu'une absence de toxicité reconnue de l'élément considéré comme chimiquement inerte, ainsi qu'une grande stabilité en solution (COBLEY et al. 2011 ; DANIEL et ASTRUC 2004). Les nanoparticules d'or sont ici enrobées au polyéthylène glycol (PEG), permettant d'accroître la stabilité des particules et de les rendre « biocompatibles » (GU et al. 2009). Enfin, les macromolécules de PEG sont fonctionnalisées avec des groupements amines, générant une charge positive à la surface des particules à pH neutre.

Ce travail présente en outre la particularité d'intégrer de nombreux modèles biologiques, dont la majorité n'a pour l'heure fait l'objet d'aucune étude dans le cadre de l'exposition aux nanomatériaux. Ces expérimentations considèrent en effet la base des réseaux trophiques avec des biofilms naturels de rivière et des algues planctoniques, des niveaux intermédiaires impliquant des poissons brouteurs et des bivalves, jusqu'aux organismes de haut de chaînes trophiques, avec l'anguille européenne.

Ainsi, en s'intéressant aux expositions par la voie trophique d'organismes aquatiques, ce travail vise à renseigner la capacité de transfert, d'une part, et les impacts associés, d'autre part, de nanoparticules d'or. Les différents questionnements soulevés s'articulent comme suit :

- En considérant la base des réseaux trophiques, dans quelle mesure un transfert trophique de nanoparticules d'or entre des biofilms naturels de rivière et des poissons brouteurs est-il observé ? Quel organotropisme et quels effets histologiques peuvent être mis en évidence chez ce consommateur primaire ?
- Par une approche sans *a priori*, quelles sont les réponses biologiques à l'échelle moléculaire observées chez un poisson prédateur, l'anguille européenne, à la suite d'une exposition trophique par nourriture enrichie aux nanoparticules d'or ?
- En considérant des expositions subchroniques et dans le cadre d'une chaîne alimentaire à trois maillons trophiques (algues - bivalves - anguilles), dans quelle mesure les nanoparticules d'or sont-elles transférées jusqu'au prédateur ? Quelles sont les réponses molé-

lares associées à cette exposition « naturelle » chez le prédateur ?

Le manuscrit se subdivise ainsi en 6 chapitres. Le premier est consacré à un état de l'art sur la problématique « *nano* » dans sa globalité. Dans le second chapitre, la démarche scientifique et les bases méthodologiques sont explicitées. Les expérimentations de transfert trophique des nanoparticules d'or, selon des chaînes à deux et trois maillons développées dans le cadre de ce travail, sont présentées dans les chapitres 3, 4 et 5, faisant chacun l'objet d'une publication. Enfin, le dernier chapitre met en lumière l'ensemble des résultats obtenus soulignant les interrogations nouvelles amenées par ce travail.

Table des matières

1	État de l'art	1
1.1	À l'ère du préfixe « <i>nano</i> »	1
1.1.1	Définitions et concepts	1
1.1.2	Avènement des nanosciences, un bref historique	8
1.1.3	De la théorie aux applications : les nanotechnologies au quotidien	10
1.2	Vers une contamination diffuse de l'environnement?	12
1.2.1	Sources et scénarios de contaminations des écosys- tèmes	13
1.2.2	Voies d'exposition et de transfert pour les organismes	18
1.2.3	Prise en compte progressive de la complexité envi- ronnementale	23
1.3	« Nanotoxicologie » ou la toxicologie des particules	25
1.3.1	The Dark Side of « <i>Nanos</i> »	25
1.3.2	Prémices des découvertes de la toxicité des particules	26
1.3.3	Focus sur l'échelle cellulaire : étude des voies d'entrée	28
1.3.4	Biodistribution et organotropisme	30
1.3.5	Effets toxiques	33
1.4	Progrès technologiques <i>versus</i> principe de précaution	42
1.4.1	Limitations scientifiques	43
1.4.2	Vide juridique persistant	44
1.5	En conclusion	46
2	Démarche scientifique et bases méthodologiques	47
2.1	Nanoparticules d'or comme contaminant modèle	47
2.1.1	Utilisation des nanoparticules d'or	48
2.1.2	Une synthèse maîtrisée et reproductible	49
2.1.3	Propriétés physico-chimiques	50

TABLE DES MATIÈRES

2.1.4	Effets nano(<i>éco</i>)toxicologiques recensés	53
2.2	Expositions trophiques	56
2.2.1	Une voie majeure aux connaissances lacunaires . . .	56
2.2.2	Sélections biologiques	57
2.2.3	Des expérimentations conduites à doses relativement faibles	64
2.2.4	Mise en œuvre expérimentale	65
2.3	Analyses et traitement des données	69
2.3.1	Bioaccumulation	71
2.3.2	Observations histologiques	71
2.3.3	Séquençage de l'ARN à haut-débit, une analyse d'impacts sans <i>a priori</i>	74
2.3.4	Expression génique sélective, RT-qPCR	76
3	Du biofilm naturel au poisson brouteur	79
3.1	Introduction	79
3.2	ARTICLE : Gold nanoparticles trophic transfer from natural biofilm to grazer fish	80
3.3	Conclusion	110
4	Transfert et réponses transcriptomiques sans <i>a priori</i> d'un poisson prédateur à l'exposition trophique	113
4.1	Introduction	113
4.2	ARTICLE : Transcriptomic profiling responses in liver and brain tissues of European eels <i>Anguilla anguilla</i> after a gold nanoparticles trophic exposure	114
4.3	Conclusion	149
5	Étude expérimentale d'une chaîne alimentaire à trois maillons	151
5.1	Introduction	151
5.2	ARTICLE : Gold nanoparticles transfer throughout a three level trophic chain leads to transcriptomic responses in the top predator, <i>Anguilla anguilla</i>	152
5.3	Conclusion	182
6	Discussion générale et perspectives	185
6.1	Évaluation du transfert trophique	186
6.1.1	Producteurs primaires	187

TABLE DES MATIÈRES

6.1.2	Consommateurs primaires	188
6.1.3	<i>Continuum</i> trophique jusqu'à l'anguille	189
6.1.4	Transferts à l'anguille au regard des modalités d'ex- position	190
6.2	Évaluation des réponses induites	192
6.2.1	À l'échelle tissulaire, chez le consommateur primaire	192
6.2.2	À l'échelle transcriptionnelle, chez le consommateur secondaire	193
6.3	Limitations analytiques et conceptuelles	196
6.3.1	Caractérisation des nanoparticules dans les matrices complexes	196
6.3.2	L'insoluble question de l'origine des réponses biolo- giques observées	198
6.3.3	Représentativité(s) environnementale(s)?	199
6.4	Perspectives de recherche	199
7	Bibliographie	203

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1

État de l'art

1.1 À l'ère du préfixe « *nano* »

1.1.1 Définitions et concepts

La définition des « nanomatériaux » a évolué, pour gagner en précision, depuis le milieu des années 90. À la suite d'une consultation des autorités compétentes, l'Union Européenne a défini en 2011 les « **nanomatériaux** » comme « *des matériaux naturels, accidentels ou fabriqués, contenant des particules dispersées, agrégées ou agglomérées, et où, pour 50% ou plus des particules, dans une ou plusieurs dimensions, la taille est comprise entre 1 et 100 nm* » (COMMISSION 2011a). La figure 1.1 illustre le positionnement des nanoparticules sur une échelle de taille.

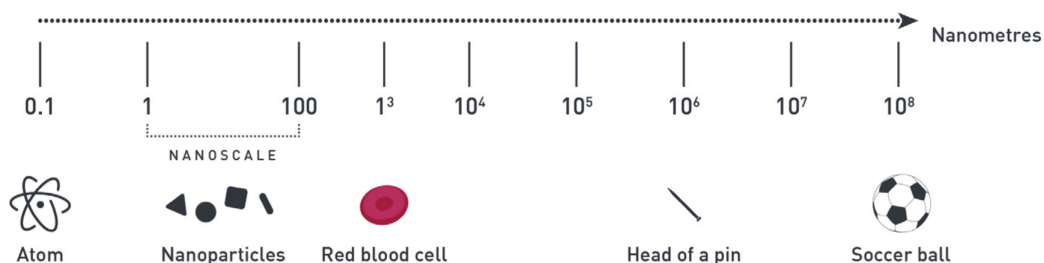


FIGURE 1.1 – Taille relative de différents objets à la nanoéchelle (CARNOVALE et al. 2016).

Dans le cadre de cet état de l'art, l'effort de synthèse s'est principalement concentré sur les nanomatériaux fabriqués intentionnellement par l'Homme. L'intérêt porté aux nanomatériaux tient aux propriétés particulières conférées à la matière par l'échelle nanoparticulaire. En effet, ces propriétés spécifiques peuvent s'expliquer par deux concepts clés que sont (1) le rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ et (2) le confinement quantique.

(1) Le rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ ($\frac{S}{V}$) correspond à l'aire surfacique d'un objet divisée par le volume de celui-ci. Pour les objets symétriques, telle qu'une particule sphérique, ce rapport est inversement proportionnel au rayon alors que, pour un cube, il est inversement proportionnel à ses côtés. La particularité du nanomatériau tient en l'augmentation du rapport $\frac{S}{V}$ alors que sa taille diminue, ayant pour conséquence un nombre croissant d'atomes en surface (figure 1.2). WITSCHGER et FABRIÈS (2005) proposent une simulation du rapport $\frac{S}{V}$ et de la fraction de molécules en surface considérant une particule sphérique de structure dense (figure 1.3). Dans le cadre de cette modélisation, une particule de diamètre 20 nm présente environ 15% de molécules en surface et un rapport $\frac{S}{V}$ de l'ordre de $3 \times 10^8 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ (équivalent à une surface spécifique de $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ pour une masse volumique de 1 g cm^{-3}). La figure 1.3 illustre graphiquement l'augmentation exponentielle du nombre de molécules en surface dès lors que le diamètre de la particule devient inférieur à 100 nm. À noter que, lorsque le diamètre décroît de 500 nm à 5 nm, la proportion de molécules en surface passe de moins de 1% à près de 50%.

De fait, ces atomes et/ou molécules, directement exposés à l'environnement extérieur de la particule, représentent ainsi des sites de liaisons instables disponibles en surface, tendant à des particules plus actives chimiquement. C'est précisément pour cette raison que certains métaux dits nobles, tels que l'argent, l'or, le platine, *etc.*, se comportent comme des catalyseurs très puissants dans leurs formes particulières et en particulier nanoparticulaires.

(2) Le confinement quantique correspond à la limitation, dans une ou plusieurs dimensions, des déplacements des électrons (ou des trous d'un semiconducteur). En raison de la réduction de taille, les changements associés aux propriétés électroniques et optiques du matériau résultent d'un confinement des ondes électroniques. En effet, une particule de plus pe-

1.1. À L'ÈRE DU PRÉFIXE « NANO »

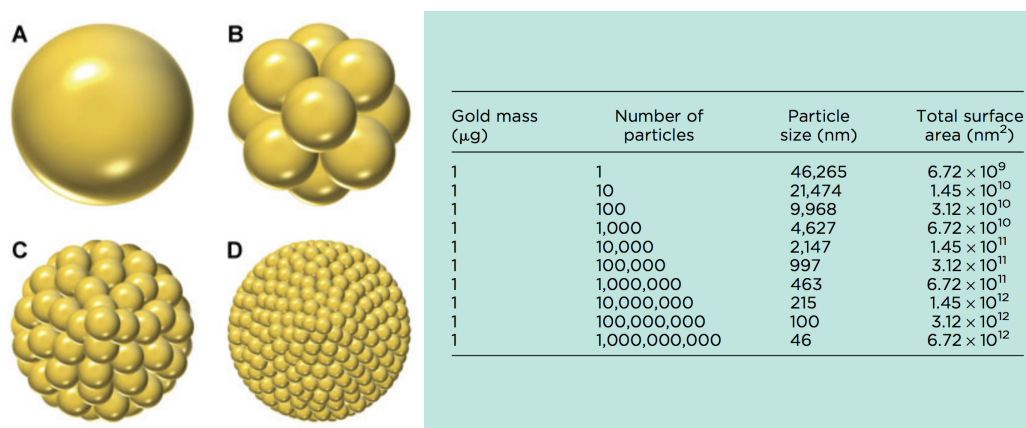


FIGURE 1.2 – Une caractéristique des nanomatériaux est l'augmentation du rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ en fonction de la diminution de leur taille. Cette figure illustre le changement des caractéristiques physiques pour des nanoparticules d'or ayant une masse constante de 1 μg. (A) 1 particule, (B) 10 particules, (C) 100 particules et (D) 1000 particules. (KLAINE et al. 2012).

Une telle diminution de taille entraîne une consolidation plus forte qui augmente l'écart de bande, modifiant ainsi la structure de bande du matériau (SENGUPTA et KUMAR 2015). Il en résulte des changements dans la mobilité des électrons, la masse effective, la constante diélectrique relative, les propriétés optiques, *etc.* Par exemple, les nanoparticules métalliques présentent des variations de couleur avec un changement de taille, photo-émettent dans l'UV, *etc.*

Ces propriétés spécifiques à chaque matériau vont pouvoir être combinées afin de produire des nanomatériaux aux propriétés souhaitées pour l'application finale. Ainsi les nanomatériaux manufacturés peuvent être des composites, c'est-à-dire constitués de plusieurs types de matériaux (CHAUDHURI et PARIA 2012). De manière générale, le nanomatériau se compose d'un **cœur** (matériau interne) et d'un **enrobage** (matériau de la couche externe). Par conséquent, une large gamme de combinaisons différentes est possible (figure 1.4), mêlant tant des matériaux organiques qu'inorganiques. Par exemple, les nanoparticules pourront avoir un cœur composé d'atome d'or et un enrobage composé de citrate ou de polyéthylène gly-

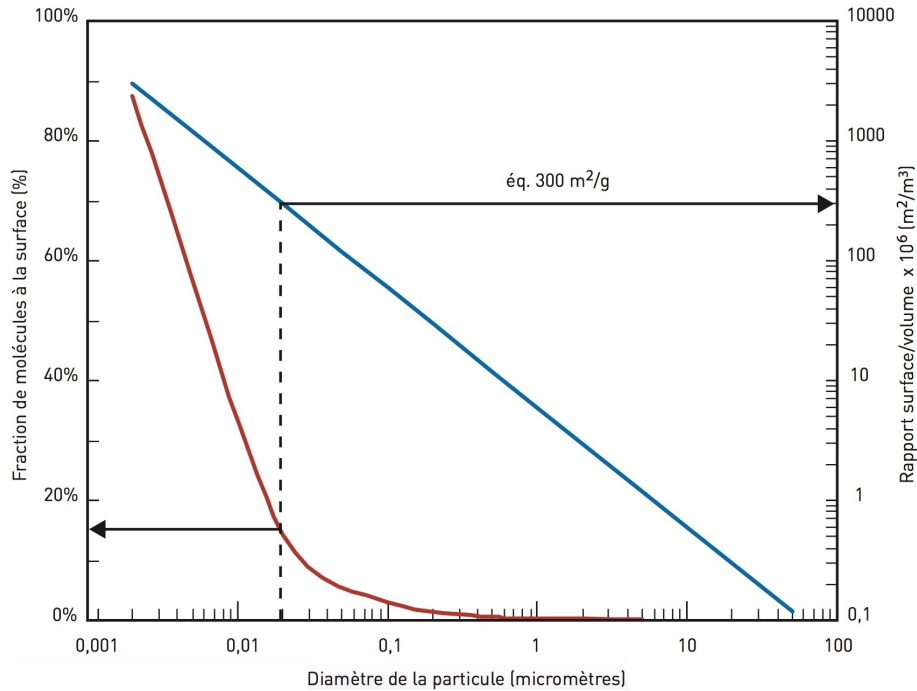


FIGURE 1.3 – Évolution du rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ (bleu) et de la fraction de molécules présentes à la surface de la particule (rouge) en fonction du diamètre. Hypothèse de calcul : particule sphérique de structure dense composée de molécules de 5 Å (WITSCHGER et FABRIÈS 2005).

col. D'autres nanoparticules seront par exemple constituées de cadmium-sélénium au cœur et de zinc-soufre pour l'enrobage.

Les nanomatériaux avec enrobage ont émergé en raison de leurs fonctionnalités et de leurs propriétés modifiées. Ces changements de surface, ainsi que le choix des constituants chimiques conditionnent les caractéristiques des nanomatériaux et dépendent des applications visées. Par exemple, à composition chimique identique, les propriétés finales du nanomatériau peuvent différer en fonction de la proportion cœur *versus* enrobage (CHAUDHURI et PARIA 2012; OLDENBURG et al. 1998). L'enrobage permet également d'apporter une stabilité ou une réactivité modifiées comparativement au cœur seul de la particule.

1.1. À L'ÈRE DU PRÉFIXE « NANO »

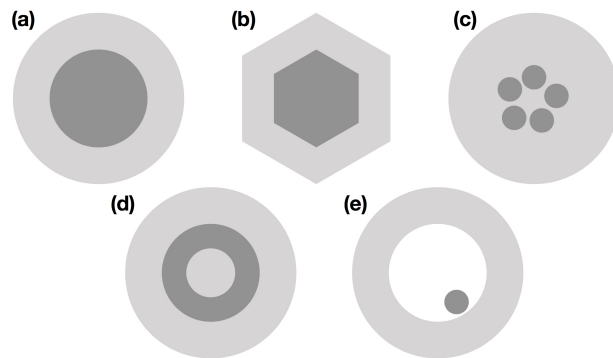


FIGURE 1.4 – Diversités potentielles de coeurs (gris foncé) et d'enrobages (gris clair) de nanoparticules : (a) sphérique, (b) hexagonale, (c) noyaux multiples enrobés d'un unique matériau, (d) nanomatryoshka, (e) noyau mobile dans un enrobage creux (CHAUDHURI et PARIA 2012).

Pour aboutir à la fabrication des nanomatériaux souhaités, la **synthèse** intentionnelle peut se diviser en deux catégories qui font références à la manière de procéder : « top-down » et « bottom-up ». L'approche « top-down » (*i.e.* descendante) utilise des méthodes par lesquelles le façonnage des matériaux s'effectue par l'extérieur. Les techniques les plus courantes sont les techniques lithographiques (par UV, faisceaux électroniques ou ioniques, *etc.*), le traitement au rayon laser et les techniques mécaniques (usinage, meulage et polissage (CHAUDHURI et PARIA 2012 ; JANG et al. 2009 ; JIANG et al. 2001 ; SALARI et al. 2009). L'approche « bottom-up » (*i.e.* ascendante) use quant à elle des propriétés chimiques des atomes et molécules pour les amener à s'assembler spontanément (CHAUDHURI et PARIA 2012). Les techniques ascendantes majoritaires sont la synthèse chimique, le dépôt en phase vapeur, l'assemblage induit par laser (*i.e.* taroudage laser), le dépôt de film et la croissance, *etc.* (WANG et al. 2009 ; YOO et al. 2009). Ces deux approches présentent toutes deux des avantages et inconvénients. L'approche « bottom-up » offre la possibilité de produire des particules plus petites en taille et semble permettre un meilleur contrôle du processus de synthèse (CHAUDHURI et PARIA 2012).

Pour la synthèse des nanoparticules comprenant un cœur et un enrobage, l'approche ascendante s'avère la plus utilisée, l'importance étant d'obtenir

un enrobage uniforme.

Les nanomatériaux peuvent être classifiés en fonction de différents critères fondés sur : (i) la taille, (ii) les caractéristiques de surface, (iii) les structures cristallines, (iv) la composition chimique intrinsèque, (v) la composition chimique extrinsèque, (vi) les propriétés physiques et/ou chimiques, (vii) les applications auxquels ils sont destinés, *etc.* Par conséquent, aucune de ces classifications ne peut être considérée comme absolue (SANJAY et PANDEY 2017). Quelques familles de nanomatériaux fréquemment utilisées (figure 1.5) sont détaillées dans la liste ci-dessous :

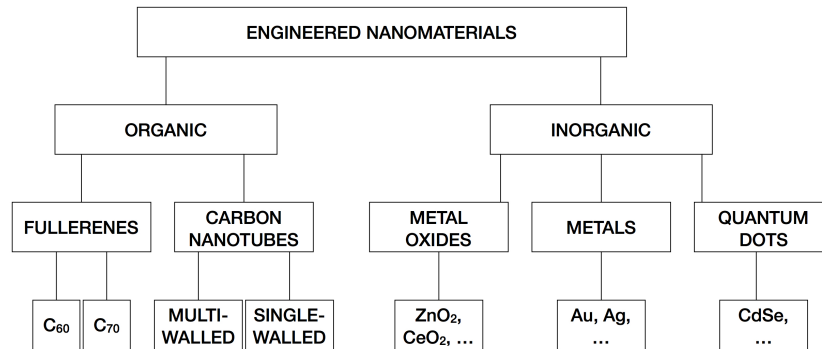


FIGURE 1.5 – Un exemple de classification des nanomatériaux en fonction des propriétés physiques et chimiques selon PERALTA-VIDEA et al. (2011).

- les quantum dots sont des semi-conducteurs confinés dans les trois dimensions spatiales, aux propriétés optoélectroniques spécifiques à l'échelle nanométrique, étroitement dépendantes de la taille et de la forme du cristal (ALIVISATOS 1996; ZHOU et COLEMAN 2016). Le semi-conducteur le plus couramment utilisé comme quantum dots est le CdSe, bien que les dérivés des groupes élémentaires II et VI (CdTe, CdS, CdHg, ZnS) et des groupes élémentaires III et V (InAs, InP, GaAs) soient également employés (BAILEY et al. 2004). L'interaction avec les photons excite les semi-conducteurs qui émettent de l'énergie détectable dans les régions UV, visibles ou infrarouges proches. Pour cette caractéristique, les quantum dots apparaissent notamment comme une nouvelle classe de sondes fluorescentes. Par

1.1. À L'ÈRE DU PRÉFIXE « NANO »

comparaison avec les fluorophores « classiques », les quantum dots ont un large spectre d'excitation, un spectre d'émission restreint, une bonne photostabilité et une longue durée de vie fluorescente (CHAN et al. 2002).

- les fullerènes correspondent à un assemblage sphérique de sous-structures hexagonales ou pentagonales d'atomes de carbone. Tout comme au sein d'un réseau de graphite, les atomes de carbone dans les fullerènes sont liés par des liaisons simples ou doubles. La courbure, induite par la structure pentagonale ou hexagonale, a pour conséquence une moindre planarité des carbones adjacents, générant des tensions et rendant ainsi les atomes plus réactifs (PRATO 1997). Les fullerènes ont une faible solubilité dans bon nombre de solvants, cette dernière pouvant être améliorée grâce à une fonctionnalisation chimique.
- les nanotubes de carbone (CNT) peuvent être imaginés comme une feuille de graphène enroulée dans une nanostructure tubulaire et peuvent être sub-classifiés en fonction du nombre d'enroulements (CNT à paroi unique ou à multi-parois). Les interactions de van der Waals au sein des CNT favorisent leur aggrégation et perturbent leur dispersion dans les solvants polaires tels que l'eau. Comme pour les fullerènes, la fonctionnalisation génère la présence de groupements fonctionnels en surface qui amélioreront les potentialités du matériau.
- les nanoparticules métalliques et oxides métalliques présentent des propriétés électroniques et optiques très spécifiques s'agissant par exemple du cuivre, d'argent, d'or, du dioxyde de titane, d'oxydes de fer, *etc.* Un exemple emblématique de cette particularité nanométrique est la coupe de Lycurgue, célèbre objet de verre datant de l'époque romaine, pour lequel il a été établi que les changements de couleur, conjoints aux modifications de la lumière ambiante, étaient dus aux nanoparticules d'or et d'argent enchâssées dans le verre (FREESTONE et al. 2007). L'interaction entre les électrons libres des nanoparticules métalliques et le champ lumineux électromagnétique permet d'expliquer ces changements de coloration du verre (ELLENBOGEN et al. 2012). Ce phénomène correspond à la résonance

plasmon de surface (KAWAMURA et al. 2013). Ce type de nanoparticules présente également des propriétés antimicrobiennes, photocatalytiques, magnétiques, *etc.* Une fonctionnalisation en surface permet également d'augmenter la stabilité. De plus, ces nanoparticules peuvent être incorporées dans la matrice d'autres matériaux, tels que des polymères et des CNT, devenant ainsi des matériaux hybrides aux caractéristiques uniques.

1.1.2 Avènement des nanosciences, un bref historique

« *There's plenty of room at the bottom* » — Richard P. Feynman, NL.

Perçu à l'origine comme une plaisanterie, le discours du chercheur RP. Feynman en 1959, lors d'une réunion de la Société Américaine de Physique, annonçait la perspective d'une manipulation de la matière atome par atome, ouvrant le champ des possibles en termes de prouesses technologiques (FEYNMAN 1959). Il étaye ainsi son propos d'exemples provocateurs mais argumentés, comme l'éventualité technique d'écrire l'ensemble des 24 volumes de l'*Encyclopædia Britannica* sur une tête d'épingle. Feynman clôture son exposé en proposant une récompense de 1000 dollars à tout chercheur qui contribuerait aux avancées scientifiques de l'infiniment petit.

L'intérêt pour la problématique est finalement relancé deux décennies plus tard lors de la publication, en 1986, d'« *Engines of Creation — The Coming Era of Nanotechnology* » par l'ingénieur Eric Drexler. La notoriété de Feynman, qui a reçu entre-temps le prix Nobel de physique (1965), sert d'appui à Drexler, dont l'ouvrage permet de révéler les nanotechnologies au grand public, aux politiques et aux industriels. Considéré comme une utopie technoscientifique à l'époque, Drexler annonce la révolution envisageable grâce au contrôle de l'agencement des atomes et promeut, par la même occasion, les nanotechnologies (DREXLER 1986). Recevant un accueil dithyrambique, cet ouvrage est considéré comme le point de départ des nanosciences, pour le grand public tout du moins.

Les travaux à l'échelle nanométrique avaient en effet déjà débuté dès les années 1970, pour le compte de la NASA, avec la mise au point de films

1.1. À L'ÈRE DU PRÉFIXE « NANO »

métalliques ultrarésistants, ayant une épaisseur de l'ordre de dizaines de nanomètres, destinés à capter l'énergie solaire (LENGLET 2014).

Bien que souvent associé à Drexler - qui l'a incontestablement popularisé -, la paternité du terme « *nanotechnology* » revient au professeur Norio Taniguchi qui l'employait dans une publication de 1974 (TANIGUCHI 1974). La multinationale américaine de l'électronique et de l'informatique IBM (International Business Machines) avait également investi dans l'invention du microscope à effet tunnel (1981), dont les améliorations techniques ont permis de manipuler les atomes individuellement, selon la conception par *bottom-up*, grâce à un champ de force quantique. Des chercheurs de la firme disposeront, en 1989, 35 atomes de xénon sur une surface de nickel pour écrire l'acronyme IBM. La photographie de cette prouesse technique fera le tour du monde et des médias. IBM, avec l'aide de nombreuses entreprises partenaires, a été l'un des fers de lance de la recherche industrielle et du développement des nanotechnologies, et est depuis, à l'origine d'un certain nombre de nano-applications (brevetées) en informatique et microélectronique.

Des efforts financiers considérables, et à l'échelle mondiale, ont permis de cristalliser l'enthousiasme des années 80 relatif aux nanotechnologies. Les importantes subventions, avec *in fine* la prévision de retombées économiques colossales, illustrent clairement les volontés étatiques de faire des « *nanos* » une priorité nationale. La Chine finance le « 'Climbing up' project » soutenant la recherche sur les nanomatériaux pour dix années successives, de 1990 à 1999 (BAI 2001). En 2000, Bill Clinton, alors président des États-Unis, initie la « National Nanotechnology Initiative » (NNI), allouant à la recherche des fonds qui augmenteront d'environ sept fois en quatre ans, atteignant ainsi un montant de 847 millions de dollars américains en 2004 (HSIAO et FONG 2004). L'Union Européenne embraye le pas dès 2004 avec la création de l'« European Strategy for Nanotechnology » et le plan « Nano Action » en 2005 avec l'objectif de consolider la recherche en ce sens (COMMISSION 2011b).

Dès lors la problématique « *nanos* » se répand dans de nombreux domaines scientifiques pour devenir multidisciplinaire (figure 1.6). Ces avancées scientifiques vont dès lors être transposées en applications diverses et variées.

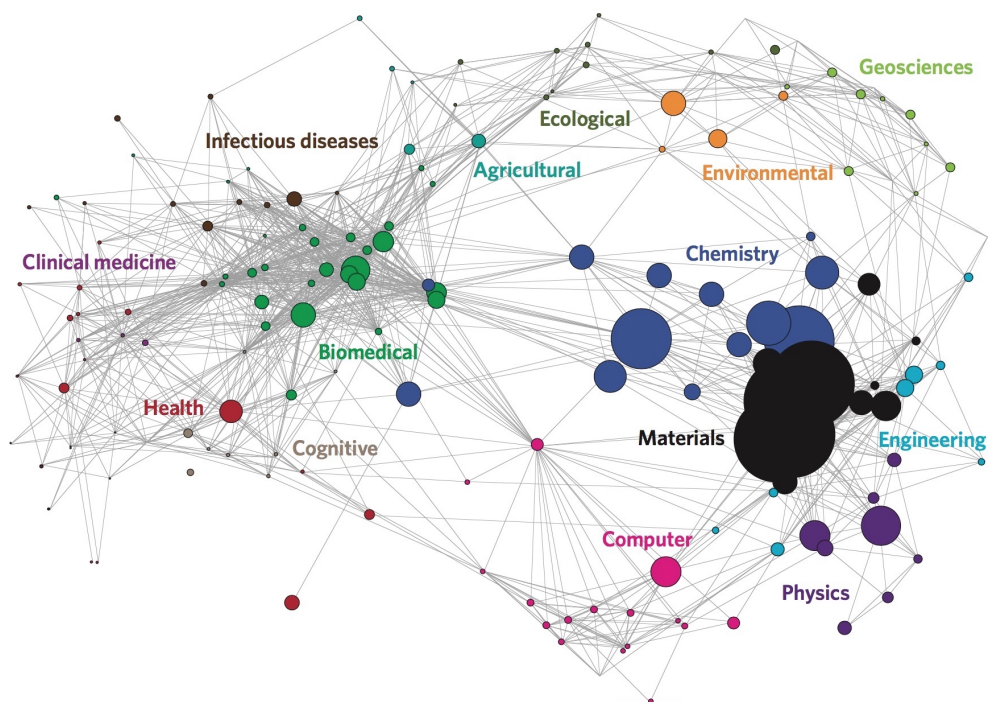


FIGURE 1.6 – Analyse bibliographique illustrant la position des nanosciences et nanotechnologies sur la carte des sciences. Chaque nœud correspond à une des 175 catégories de sujets du SCI (Science Citation Index). La taille relative de chaque nœud est proportionnelle au nombre d'articles publiés dans des revues scientifiques inhérentes à la discipline, et pour la période de janvier à juillet 2008. La coloration correspond au regroupement des catégories de sujets en macrodisciplines, obtenues à partir de modèles de citation croisée (PORTER et YOUTIE 2009).

1.1.3 De la théorie aux applications : les nanotechnologies au quotidien

Au cours des 15 à 20 dernières années, de nombreux articles, relayés dans les médias « grand public », ont diffusé la propension des nanotechnologies à impacter le quotidien de chacun. À la hauteur de leurs diversités, les applications commerciales des nanotechnologies sont extrêmement variées et balayent un large spectre de secteurs industriels telles

1.1. À L'ÈRE DU PRÉFIXE « NANO »

que l'automobile, l'aérospatiale, les biotechnologies, les cosmétiques, l'armement, l'énergie, les secteurs pharmaceutique et médical, la construction, l'agroalimentaire, les textiles, etc. À défaut d'une liste exhaustive, quelques exemples sont présentés dans cette section.

L'électronique au sens large constitue une des aires majoritaires pour l'application des nanomatériaux avec des retombées économiques très importantes. De nombreuses applications sont basées sur l'utilisation de matériaux composites ou de films nanostructurés déposés sur différents substrats (polymères, métaux, *etc.*). Il s'agit principalement de quantum dots, de CNT et de graphènes. Parmi les idées sous-jacentes, citons par exemple l'amélioration du transfert et du stockage de l'énergie dans des objets toujours plus miniaturisés (HOU et al. 2017 ; ZI et WANG 2017).

Le secteur du bâtiment est concerné avec des améliorations des ciments, de l'isolation phonique des matériaux, des revêtements anticorrosions, *etc* (HANUS et HARRIS 2013); et par exemple des vitrages de fenêtre dont l'unique action de l'eau sert de nettoyage (SENGUPTA et KUMAR 2015).

Des matériaux hautes-performances à base de nanocomposites sont à l'origine de matériaux ultra-légers, entrant dans la fabrication des voitures, des vélos ou autres engins aérospatiaux.

Une large diversité de nanomatériaux entre dans la composition des cosmétiques afin d'améliorer les performances des produits comme la transparence, la solubilité, les couleurs et la réactivité chimique. L'ensemble des cosmétiques est concerné, des crèmes toutes utilisations confondues au maquillage. À titre d'exemple, les filtres dits minéraux, à base de nanoparticules d'oxydes de zinc ou de dioxyde de titane (WRIGHT 2016), ont remplacé dans certaines crèmes solaires les filtres anti-UV issus de la chimie de synthèse (souvent pointés du doigt pour leurs effets de perturbateurs endocriniens).

Concernant la santé, certaines applications sont axées sur la distribution et l'action ciblée de médicaments (ou de rayonnements) grâce à des nanovecteurs (BOGDAN et al. 2017) dont l'objectif est de traiter des cancers, des maladies neurodégénératives, *etc.* D'autres possibilités concernent l'amélioration des performances des techniques d'imagerie (KING et al. 2017).

Le secteur paramédical fait également entrer les nanotechnologies par exemple dans la composition de pansements biocides (souvent à base d'argent), afin d'éviter le développement de bactéries indésirables sur les plaies, ou encore dans le dentifrice, afin d'utiliser les propriétés blanchissantes du dioxyde de titane.

Dans l'industrie textile, les nanomatériaux sont utilisés pour modifier les surfaces et conférer des propriétés déperlantes, antibactériennes, anti-statiques, de retardateur de flamme, une plus grande résistance, une protection aux UVs, ou encore l'amélioration de la tenue des teintures.

L'agroalimentaire fait également la part belle aux nanomatériaux pour « améliorer » la nourriture industrielle, comme additifs alimentaires (colorant, stabilisant, *etc.*), ou encore pour la « sécurité alimentaire » avec leurs pouvoirs antimicrobiens (ELEFTHERIADOU et al. 2017).

D'autres pistes d'utilisations de nanomatériaux en vue d'applications environnementales sont à l'étude pour la purification de l'air, le traitement des eaux usées et potables, ou encore la remédiation des sols et eaux souterraines (ARAUJO et al. 2015; NOWACK et al. 2013; SHIPLEY et al. 2011; WESTERHOFF et al. 2015).

Ainsi, depuis plusieurs années, les nanotechnologies sont présentes dans le quotidien de tout à chacun. Si la question de leur utilisation massive ne fait plus de doute, il convient de s'interroger quant au relargage des nanomatériaux dans l'environnement.

1.2 Vers une contamination diffuse de l'environnement?

L'étude de KAEGI et al. (2008) constitue la première démonstration du relargage de nanoparticules manufacturées dans l'environnement en conditions météorologiques naturelles. Utilisé à l'origine comme pigment blanc dans les peintures revêtant les façades extérieures, le TiO_2 sous forme nanoparticulaire se retrouve directement libéré dans les eaux pluviales, constituant ainsi une source de contamination des eaux de surfaces.

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT?

Dans la continuité de cette étude, KAEGI et al. (2010) se sont ensuite focalisés sur les nanoparticules d'argent, qui entrent également dans la composition des revêtements extérieurs. Suite à une exposition d'un an aux intempéries, environ 30% des nanoparticules d'argent, initialement contenues dans la peinture, ont été emportées par les eaux de ruissellement. Toutefois, en raison des verrous analytiques et de la multitude de nanoparticules, l'évaluation des rejets dans l'environnement demeure encore largement mal connue et repose encore essentiellement sur des estimations de flux à partir des quantités produites (TOLAYMAT et al. 2017). En effet, la principale limitation à l'heure actuelle reste l'incapacité à isoler et à quantifier les nanomatériaux manufacturés dans une matrice environnementale (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016). Néanmoins, les sources d'expositions et scénarios de contaminations des écosystèmes font l'objet de publications évoquées dans le paragraphe suivant.

1.2.1 Sources et scénarios de contaminations des écosystèmes

Au cours de ces dernières années, un nombre croissant d'études relatives au relargage des nanomatériaux manufacturés dans l'environnement a étayé la littérature. Cependant, malgré cette hausse, les scénarios d'exposition demeurent limités. En effet, seulement 20% des nanomatériaux manufacturés utilisés dans l'industrie, et 36% des produits impliqués, font l'objet d'investigation en termes de rejets, avec par ailleurs, peu de simulations réalistes (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016). Les nanomatériaux manufacturés peuvent être appliqués en surface ou être intégrés dans une matrice. Ils peuvent être relargués dans l'environnement durant tout leur cycle de vie, et ce dès l'étape de production (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016, figure 1.7).

Les compartiments environnementaux cibles incluent l'atmosphère, les sols et sédiments, les eaux de surfaces et souterraines. Le relargage dans l'environnement peut être considéré comme direct lorsque le transfert s'effectue en une unique étape, ou indirect lorsqu'il comprend plusieurs étapes. Des nanoparticules de TiO_2 , initialement contenues dans une crème solaire seront, par exemple, relarguées directement dans le milieu aquatique lors d'une baignade dans un lac ou une rivière (GONDIKAS et al.

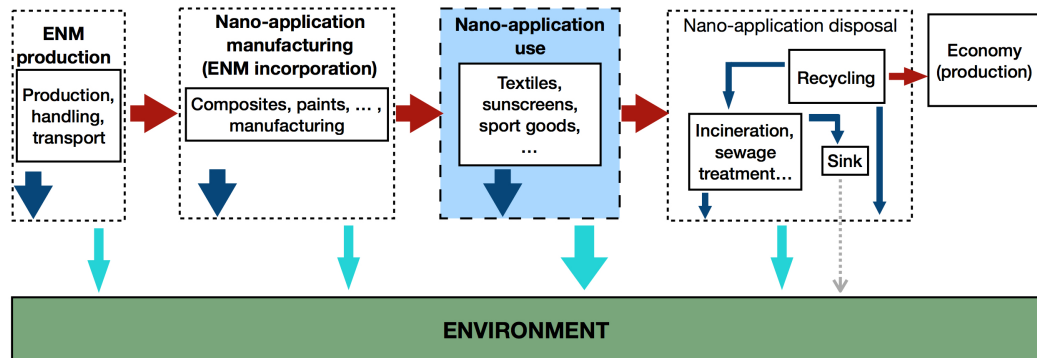


FIGURE 1.7 – Relargage des nanomatériaux manufacturés aux cours de leur cycle de vie, i.e. de la production à l'élimination. Ce diagramme souligne une libération en deux étapes : (i) pendant la manipulation des nanomatériaux (flèche bleu foncée) et, (ii) vers un transfert final dans l'environnement (flèche bleu claire). Les pointillés représentent des matériaux ou des compartiments susceptibles d'entraver le relargage final dans l'environnement. En raison de mesures de contrôle moindre, la phase d'utilisation peut représenter un potentiel de relargage plus important (pointillés espacés), à l'origine d'un transfert accru vers l'environnement (flèche bleu clair épaisse). Le flux relatif au recyclage n'est pas connecté aux boîtes de production ou de fabrication, du fait qu'il semble plus probable que les nanomatériaux manufacturés, qui entrent en recyclage, soient (1) éliminés (incinération, etc.) ou (2) alloués dans des fractions d'autres matériaux (plastiques, etc.) (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016).

2014). Alors qu'*a contrario*, dans le cadre d'une baignade en piscine, les nanoparticules de TiO_2 seront d'abord relarguées dans cette eau, atteindront ensuite les eaux usées, et *in fine* le réseau hydrographique. À noter que le relargage de nanomatériaux manufacturés peut être intentionnel ou non. Dans le cadre d'un rejet intentionnel, il s'agira par exemple de l'utilisation de nanoparticules de fer pour la remédiation des eaux souterraines (MUELLER et al. 2012). Le rejet non intentionnel survient lors de la manipulation du nanomatériau, dans le cadre d'une usure normale au cours de son cycle de vie, ou du fait que l'utilisation implique la libération d'aérosols ou des applications liquides (CABALLERO-GUZMAN et NOWACK 2016). BLASER et al. (2008) ont estimé la contribution des plastiques et textiles

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT ?

nano-fonctionnalisés dans l'exposition des écosystèmes d'eau douce aux nanoparticules d'argent. Les produits manufacturés utilisant les propriétés biocides des nanoparticules d'argent sont en constante augmentation à l'échelle mondiale. La figure 1.8 relève les différentes voies d'entrée de l'argent dans l'environnement ayant pour origine les textiles et plastiques nano-fonctionnalisés. L'utilisation de ce type de produit libère des nanoparticules et des ions argent dans les eaux usées qui seront soit traités dans une station d'épuration, soit directement déversés dans les eaux naturelles. Ainsi, en 2010, les plastiques et textiles biocides participent, selon les modélisations antérieures, comme contributeurs à plus de 15% de l'argent total rejeté dans les eaux de l'Union Européenne (BLASER et al. 2008). Il semblerait par ailleurs que la majorité de l'argent relargué dans les eaux usées soit incorporée dans les boues d'épuration répandues par la suite sur les champs agricoles avec un rejet final par lessivage ou infiltration dans les eaux de surface et/ou souterraines. La quantité d'argent, qui atteint *in fine* les eaux naturelles, dépend de la fraction d'eaux usées subissant un traitement. A noter toutefois que l'ensemble des compartiments du biotope (*i.e.* air, eau, sol) sont susceptibles de recevoir, transitoirement *a minima*, de l'argent issu de nano-produits textiles ou plastiques (figure 1.8, BLASER et al. 2008).

Le relargage et le transfert dans l'environnement sont conditionnés par les propriétés initiales du matériau et les caractéristiques physico-chimiques du milieu réceptacle.

BAALOUSHA et al. (2016) se sont focalisés plus spécifiquement sur les rejets et transferts de nanomatériaux en contexte urbain, qu'ils soient issus de nanotechnologies ou créés de manière non intentionnelle (figure 1.9). La voie de transfert par le compartiment atmosphérique apparaît comme importante, avec un transport et un devenir des nanomatériaux qui vont dépendre essentiellement de leur taille. Des particules inférieures à la centaine de nanomètres sont davantage sensibles à la diffusion résultante du mouvement brownien qu'à la décantation gravitationnelle (BAALOUSHA et al. 2016). Le temps de séjour dans l'atmosphère est d'autant plus faible que les nanoparticules s'agrègent et de fait, croissent en taille (OMSTEDT et al. 2004). La taille des nanomatériaux libérés dans l'atmosphère dépend des propriétés physico-chimiques des particules et de l'environnement ambiant. Des particules de 30 à 50 nm de diamètre ont un taux de

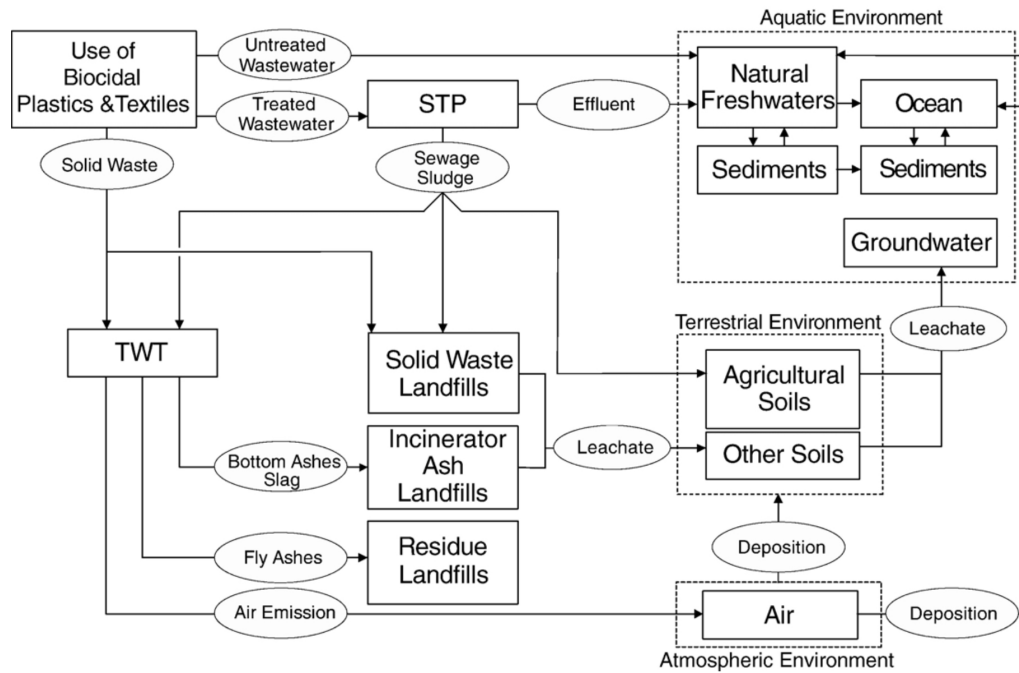


FIGURE 1.8 – Aperçu des flux d'argent initiés par les plastiques et textiles biocides. Les flèches et les lignes pointillées représentent respectivement les flux d'argent et les différents compartiments environnementaux (BLASER et al. 2008). TWT = thermal waste treatment ; STP = sewage treatment plant.

croissance moyen de 14 nm h^{-1} si l'air ambiant est chargé en particules (env. $300 \mu\text{g m}^{-3}$ PM10), et de 7 nm h^{-1} pour un air peu chargé en particules (env. $64 \mu\text{g m}^{-3}$ PM10) selon NIE et al. (2014).

Ce mélange hétérogène, complexe et évolutif, est susceptible d'être éliminé de l'atmosphère par un dépôt sec ou humide. GUNAWARDENA et al. (2013) ont démontré qu'un dépôt humide contient davantage de particules de petites tailles comparativement au dépôt sec. Ce phénomène est attribué à la capacité des pluies à éliminer les particules de plus petites tailles, moins soumises à la gravité en raison des forces de flottaison et de résistance (GUNAWARDENA et al. 2013).

Des quantités importantes de nanomatériaux sont donc susceptibles d'être déposées sur les nombreuses surfaces imperméables des environnements

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT ?

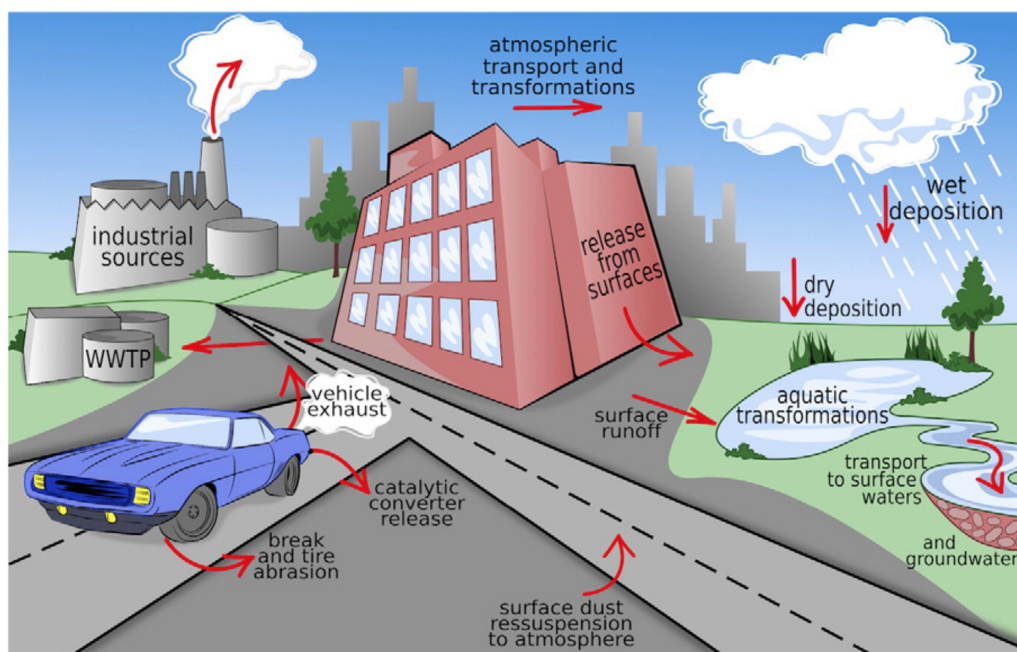


FIGURE 1.9 – Sources et transferts potentiels dans l'environnement des nanomatériaux à usage extérieur (BAALOUSHA et al. 2016). WWTP = waste water treatment plants.

urbains avant d'être de nouveau en suspension dans l'atmosphère pour un temps plus ou moins long, ou emportées avec les eaux de pluie. L'ensemble de ces compartiments de transit conduit à l'arrivée des nanomatériaux dans les sols et cours d'eau, auxquels ils s'ajouteront à la mixture hétérogène et complexe des nanomatériaux déjà présents (et d'autres contaminants).

Lorsque les nanomatériaux et leurs agrégats sont mélangés avec l'eau de pluie, ceux-ci deviennent assujettis aux transformations physico-chimiques rencontrées dans les systèmes aquatiques (LOWRY et al. 2012b, PEIJNENBURG et al. 2015). Relativement à la chimie de l'eau et aux propriétés des nanomatériaux, ces transformations peuvent entraîner la perte ou des modifications de la surface des nanomatériaux, une agrégation ou le phénomène inverse, la libération d'espèces ioniques, un détachement du nanomatériau de son substrat porteur, une sédimentation ou un transfert dans

le réseau hydrographique, *etc.*

Cet exemple, ayant pour origine un contexte urbain, illustre clairement la complexité du devenir des nanomatériaux dès leurs rejets dans l'environnement. Il témoigne par ailleurs de la nécessité d'admettre que, la physico-chimie dynamique et évolutive des nanomatériaux dans l'environnement, demeure éloignée de la relative simplicité des phénomènes observés lors des expérimentations de laboratoire.

1.2.2 Voies d'exposition et de transfert pour les organismes

Comme explicité dans la sous-section précédente, les nanomatériaux sont susceptibles d'être rejetés dans l'environnement durant chacune des étapes de leurs cycles de vie. De fait, l'ensemble des biocénoses est potentiellement assujettie à l'exposition aux nanomatériaux; certains organismes pouvant également servir de compartiment de transfert dans les réseaux trophiques.

Écosystèmes terrestres

Dans un écosystème terrestre (figure 1.10), les bactéries présentes dans le sol peuvent sorber ou disperser les nanomatériaux agrégés (HORST et al. 2010). Il a par ailleurs été montré que les nanomatériaux, tels que les quantum dots de CdSe, après une interaction avec les parois bactériennes, peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène, à l'origine d'un stress et d'une inhibition de croissance (10 à 125 mg L^{-1} , PRIESTER et al. 2009). À la suite d'une exposition en microcosme, des nanoparticules de TiO_2 ($> 2 \text{ mg g}^{-1}$ de sol) et de ZnO ($> 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ de sol) ont impacté la structure des communautés bactériennes (GE et al. 2011), avec notamment une influence sur les taxons associés aux processus de fixation du N_2 , à l'oxydation du CH_4 , et à la décomposition de la matière organique (GE et al. 2012).

Pour ce qui concerne les végétaux, une expérimentation en mésocosme sur le soja a montré une biodisponibilité et une distribution dans les feuilles et les graines du Zn issu de sol amendé aux nanoparticules de ZnO ($0,05$ à $0,5 \text{ g kg}^{-1}$, PRIESTER et al. 2012). Pour les nanoparticules de CeO_2 , les nodules des racines ont présenté une accumulation importante, entraînant une interférence avec la fixation de N_2 et une croissance moindre ($0,1$ à

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT?

1 mg g^{-1} , PRIESTER et al. 2012).

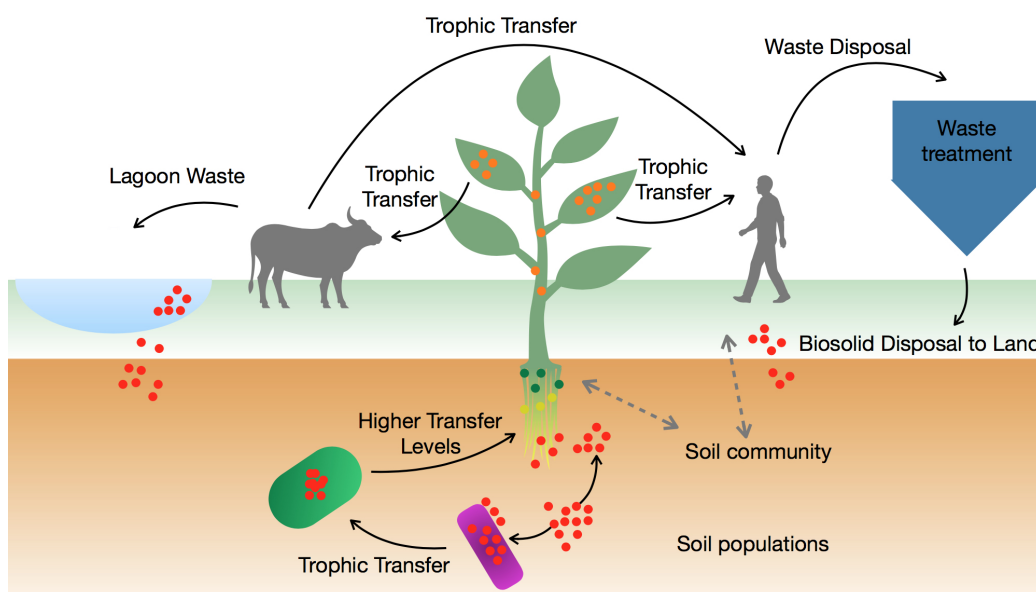


FIGURE 1.10 – Schéma conceptuel du transfert des nanomatériaux dans un écosystème terrestre (HOLDEN et al. 2012). Les nanomatériaux (points rouges) peuvent être ad/absorbés aux bactéries (violet) et aux protozoaires (vert) à partir du sol ou via le transfert trophique. Les nanomatériaux peuvent également interagir avec les racines des plantes, incluant les relations symbiotiques (points jaunes et verts des racines). Transférés aux parties aériennes des plantes, les nanomatériaux peuvent changer chimiquement (points oranges). Les nanomatériaux peuvent impacter le développement des populations et des communautés bactériennes (graphiques). Le transfert trophique (flèches noires), la bioaccumulation et la bioconcentration des nanomatériaux sont envisageables pour l'ensemble des organismes de l'écosystème terrestre. À noter également, les flux de nutriments (flèches serpentiformes) peuvent être modifiés en raison des changements des communautés microbiennes du sol et des plantes, ou indirectement si la présence des nanomatériaux induit une altération de la physicochimie du sol, et donc des flux d'eau et de nutriments.

Or, dès lors que les nanomatériaux ont été ad- ou absorbés par des

organismes et/ou microorganismes, l'hypothèse d'un transfert trophique devient une possibilité. Ainsi, UNRINE et al. (2010) ont montré la biodisponibilité pour la pédofaune des nanoparticules d'or (20 et 50 nm, 2,5 à 50 $mg\ kg^{-1}$), avec un transfert de ces dernières dans les tissus du ver détritivore *Eisenia fetida* suite à une exposition de 28 jours. Une autre expérimentation souligne la prépondérance de la biodisponibilité des nanoparticules d'or (12 nm, 200 $mg\ kg^{-1}$) pour une exposition trophique, comparativement à une exposition directe (UNRINE et al. 2012). CHAE et al. (2016) ont évalué le transfert trophique de quantum dots de CdSe pour une chaîne à trois maillons (*i.e.* une levure *Saccharomyces cerevisiae*, une collembole *Folsomia candida* et un cloporte *Armadillidium vulgare*). Les nanoparticules de CdSe ont été transférées par voie trophique de la levure au collembole puis au cloporte, avec une distribution se limitant toutefois à l'intestin dans ce dernier. Dans le cadre d'une chaîne alimentaire simplifiée, comprenant des plants de tabac et un consommateur primaire (la chenille du Sphinx du tabac, *Manduca sexta*), un transfert trophique et une bioamplification de nanoparticules d'or de différents diamètres ont été observés, avec un facteur de transfert évalué à 6.2, 11.6 et 9.6 pour des diamètres de particules de 5, 10 et 15 nm respectivement (JUDY et al. 2011). Les quantum dots peuvent transférer et se biomagnifier chez les protozoaires prédateurs (WERLIN et al. 2011). Enfin, dans le cas d'un sol ennoyé (microcosme de rizière simplifiée), le TiO_2 (1,8 $mg\ L^{-1}$), sous forme de nanoparticules ou de nanotubes, s'accumule principalement dans les biofilms, et est ensuite largement transféré aux consommateurs primaires, tels que les nématodes et les gastéropodes (YEO et NAM 2013).

Écosystèmes aquatiques

En raison d'une production et d'une utilisation croissante, le relargage, qu'il soit direct ou indirect, des nanomatériaux dans les milieux aquatiques est tout aussi préoccupant. Les écosystèmes aquatiques sont sensibles à la contamination environnementale et en constitue généralement le réceptacle final. La figure 1.11 résume les voies de transfert et potentielles interactions des nanomatériaux au sein d'un écosystème aquatique.

Plusieurs études ont montré expérimentalement des transferts entre les compartiments abiotique et biotique par le biais de la colonne d'eau. Exposé *via* la colonne d'eau, le phytoplancton sorbe les nanoparticules de CeO_2 en moins d'une heure (30 $mg\ L^{-1}$, CONWAY et al. 2014), et au

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT ?

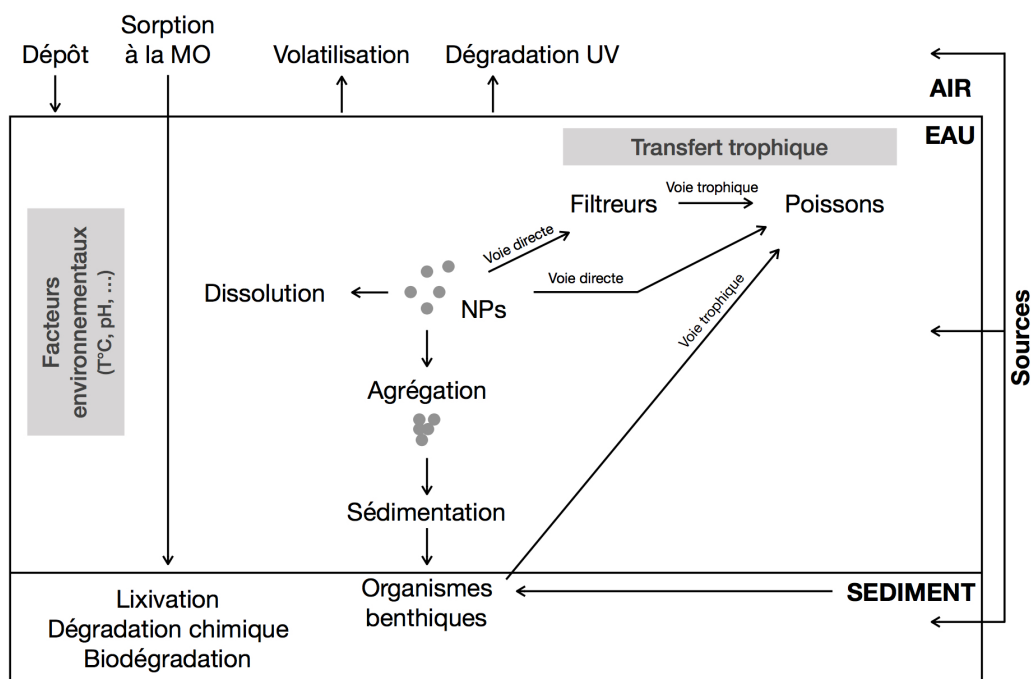


FIGURE 1.11 – Possibles voies de transfert des nanomatériaux dans les écosystèmes aquatiques (WALTERS et POOL 2016 modifié).

bout de 24 heures pour des nanoparticules d'or ($4,8$ à 48 mg L^{-1} , LARGUINHO et al. 2014; RENAULT et al. 2008). Concernant des macrophytes vasculaires immergés ou flottantes, l'absorption de nanoparticules d'or (4 et 18 nm) semble se produire par le système racinaire dès 24 heures d'exposition ($250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, GLENN et al. 2012). Suite à une exposition directe de 21 jours aux nanoparticules d'argent, le polychète *Hediste diversicolor* et le bivalve *Scrobicularia plana* ont présenté une accumulation significative à l'échelle de l'organisme (BUFFET et al. 2014). Un transfert direct au poisson (*Carassius auratus*) est également observé après 21 jours d'exposition aux nanoparticules de CuO et de ZnO (10 à $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), entraînant une bioaccumulation de Cu et de Zn dans l'intestin, le foie et les branchies (ATES et al. 2014). Toutefois, l'agrégation des nanoparticules en suspension dans la colonne d'eau semble diminuer le transfert direct en conditions expérimentales (KHAN et al. 2012). Néanmoins, les nanoparticules agrégées sont susceptibles de sédimenter, représentant ainsi un apport de contami-

nants pour les organismes benthiques. RAMSKOV et al. (2015) ont montré que les invertébrés vivants dans le sédiment bioaccumulent les nanoparticules associées à ce dernier ($100 \mu\text{g Ag g}^{-1}\text{MS}$). Par ailleurs, il a été mis en évidence que des nanoparticules d'or, ajoutées artificiellement au sédiment (16 et $55 \mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$), peuvent aussi être redistribuées vers la colonne d'eau, devenant ainsi biodisponibles pour les poissons, pour lesquels un transfert dans les branchies et le tube digestif est observé après 20 jours d'expérimentation (ДЕДЕН et al. 2014).

Dès lors qu'ils sont accumulés dans le biote, les nanomatériaux sont également susceptibles d'être ingérés par des prédateurs et, de fait, peuvent être transférés dans les réseaux trophiques. FERRY et al. (2009) ont démontré que les nanotiges d'or peuvent être transférées facilement de la colonne d'eau aux réseaux trophiques marins, à partir d'un unique apport en contaminant, dans lors d'une expérimentation en mésocosmes estuariens comprenant du sédiment, des plantes aquatiques, des biofilms, des mollusques, des crustacés et des poissons. Après douze jours, 84,4% des nanotiges d'or initialement apportés au système ont été répartis entre les différents compartiments, avec des biofilms et des palourdes qui ont concentré davantage l'or par unité de masse, attestant de la capacité des nanoparticules à entrer dans les réseaux trophiques aquatiques (FERRY et al. 2009). L'une des premières expositions d'organismes aux quantum dots carboxylés ou biotinylés, a mis en évidence le transfert trophique de nanomatériaux manufacturés, des protozoaires ciliés aux rotifères (HOLBROOK et al. 2008). Pour l'étude du transfert trophique jusqu'à un prédateur, WANG et al. (2016) ont reconstitué expérimentalement une chaîne alimentaire benthique comprenant des polychètes (*Perinereis aibuhitensis*) et des turbots juvéniles (*Scophthalmus maximus*). Les nanoparticules de TiO_2 ont été transférées du polychète au turbot, sans qu'une bioamplification n'est été observée après 20 jours d'exposition (10 à 100 mg L^{-1} , WANG et al. 2016). En outre, une caractérisation physico-chimique des nanomatériaux dans les réseaux trophiques reste impossible à l'heure actuelle. Une fois accumulée dans les organismes, des transformations sont susceptibles d'impacter les propriétés initiales (dégradation de l'enrobage, modification des charges de surface, dissolution, etc). Il n'en demeure pas moins que ces études illustrent la capacité de divers nanomatériaux à transférer dans les réseaux trophiques aquatiques, qu'ils soient d'eau douce ou marin.

1.2. VERS UNE CONTAMINATION DIFFUSE DE L'ENVIRONNEMENT ?

Pour rendre compte des transferts et des effets des nanomatériaux sur l'environnement, les études réalisées en conditions contrôlées de laboratoire intègrent petit à petit la complexité de celui-ci avec pour idée de tendre à des scénarios représentatifs.

1.2.3 Prise en compte progressive de la complexité environnementale

Dès lors que les nanomatériaux se retrouvent dans une matrice environnementale, les propriétés physico-chimiques de ceux-ci sont impactées par de multiples interactions représentées dans la figure 1.12. En effet, des facteurs environnementaux, tels que le pH, la force ionique, et la concentration en particules, influent sur le comportement des nanomatériaux (BAI et al. 2010; TIEDE et al. 2009; VON DER KAMMER et al. 2010). Outre la physico-chimie du milieu, la présence d'organismes influe également sur le comportement des nanomatériaux, citons entre autre la génération de matières organiques. Or, MAJUMDAR et al. (2016) ont montré par exemple que, la quantité de matière organique, présente dans le sol, augmente le transfert et la translocation aux parties aériennes des plantes exposées aux nanoparticules d'oxydes de cérium.

Ainsi, pour comprendre le comportement et les effets des nanomatériaux en écotoxicologie, de récents efforts ont consisté en la réalisation d'expérimentations qui se rapprochent des conditions rencontrées en milieu « naturel » et qui tendent à intégrer la complexité environnementale. Ces méthodes d'exposition diffèrent des protocoles normalisés et se subdivisent en trois types : les chaînes trophiques, les expositions multi-espèces en conditions contrôlées et les expositions réalisées en extérieur (BOUR et al. 2015a).

Rendre compte de la voie trophique est essentielle en écotoxicologie, car ce type de relations constitue l'une des interactions majeures entre les organismes d'un écosystème. Or, peu d'études se focalisent sur les expositions trophiques, et c'est pourquoi TANGAA et al. (2016) déplorent par exemple que, moins d'une vingtaine d'expérimentations, abordent la problématique du transfert trophique considérant les nanomatériaux métalliques en milieu aquatique.

L'étude de la voie trophique explore la capacité de la première espèce ex-

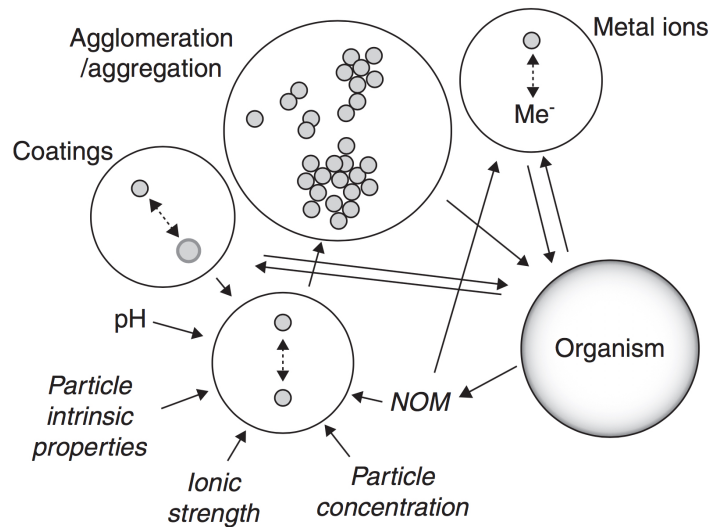


FIGURE 1.12 – Influence mutuelle de l’environnement et du biote sur les nanomatériaux (HARTMANN et al. 2012).

posée à bioaccumuler le nanomatériau ainsi que le potentiel de transfert, dans les chaînes alimentaires, de ce dernier. En se focalisant sur le transfert trophique, c’est concevoir que les nanomatériaux accumulés dans l’espèce $n-1$ sont susceptibles de subir une transformation qui conditionnera notamment le transfert vers l’espèce n . En raison d’une mise en œuvre expérimentale également complexe, la plupart des études trophiques considèrent deux niveaux trophiques terrestres (HOLBROOK et al. 2008; JUDY et al. 2011; UNRINE et al. 2012) ou aquatiques. Pour les chaînes trophiques aquatiques, les algues demeurent préférentiellement choisies comme première espèce, en raison de leur rôle fonctionnel de producteurs primaires. Ensuite, les consommateurs primaires étudiés sont par exemple des bivalves (BUFFET et al. 2014; RENAULT et al. 2008), des daphnies (BOULDIN et al. 2008; FOUQUERAY et al. 2012; McTEER et al. 2014; ZHAO et WANG 2010), des gastéropodes (CROTEAU et al. 2011), des copépodes (JARVIS et al. 2013) ou des amphipodes (JACKSON et al. 2012). Une autre étude à deux niveaux trophiques intègre des daphnies, à la base de la chaîne alimentaire, puis des poissons pour observer le transfert trophique des nanoparticules de TiO_2 (ZHU et al. 2010). Enfin, seulement quelques études s’intéressent au

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

transfert trophique en considérant une chaîne alimentaire expérimentale à trois niveaux (CEDERVALL et al. 2012; CHAE et al. 2016).

D'autres recherches se focalisent sur une exposition simultanée de plusieurs espèces, prenant en compte d'autres interactions que la voie trophique (BOUR et al. 2015a). Ce type d'études permet d'envisager l'impact sur les communautés microbiennes (FRENK et al. 2013; GE et PRIESTER 2013; NOGUEIRA et al. 2012; SHRESTHA et al. 2013), alors que d'autres dispositifs incluent plantes et animaux (FERRY et al. 2009; YEO et NAM 2013; ZHANG et al. 2012).

Pour pallier à la nécessaire mise en place de détection et de quantification des nanomatériaux *in situ* et à large échelle, quelques expérimentations ont été réalisées en milieu extérieur, intégrant de fait intempéries, rayonnements, *etc.* Ce type d'expérimentation a permis de mettre en évidence, pour la première fois, le relargage de nanoparticules de TiO₂ dans les eaux de ruissellement à partir de peinture pour façade (KAEGI et al. 2008). Des systèmes complexes sont également utilisés pour étudier le devenir des nanomatériaux dans l'environnement, avec notamment des mésocosmes pour des expérimentations long-terme sur les nanoparticules d'argent (COLMAN et al. 2013; LOWRY et al. 2012a), ou des dispositifs reproduisant les cycles de marée (BUFFET et al. 2012, 2014).

L'ensemble de ces études, et le manque de reproductibilité en termes de transfert et d'effets biologiques pour un nanomatériau donné, tendent à montrer la complexité de la problématique et illustrent la nécessité de poursuivre les expérimentations.

1.3 « Nanotoxicologie » ou la toxicologie des particules

1.3.1 The Dark Side of « Nanos »

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, ainsi que leurs fabrications « sur-mesures », imposent une appréhension spécifique de leur toxicité, prenant en compte la combinaison de différents effets : la taille, la forme, la charge, la composition chimique intrinsèque, la composition

chimique extrinsèque, etc (figure 1.13).

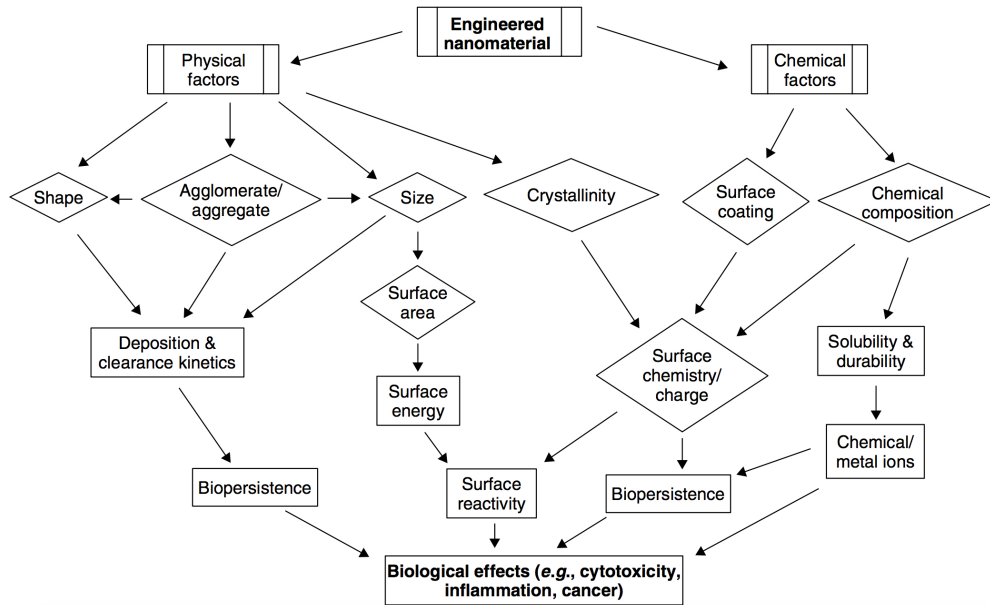


FIGURE 1.13 – Propriétés physico-chimiques des nanomatériaux conditionnant leurs effets biologiques (LAI 2012).

Ainsi, évaluer la toxicité des nanoparticules dans son ensemble relève de l'illusion, s'agissant davantage d'un vaste tout, singulier uniquement par son échelle de taille. Toutefois, ce sont leurs propriétés uniques qui interpellent la communauté scientifique avec des conséquences potentielles sur la santé humaine et de tout autre organisme exposé. En l'état actuel des connaissances, certains effets toxiques des nanomatériaux semblent récurrents et sont explicités dans cette section.

1.3.2 Prémices des découvertes de la toxicité des particules

Au fil des décennies, le lien causal entre l'exposition à divers types de « poussières » inorganiques et nombre de pathologies -humaines- a pu être mis en évidence, notamment dans le cadre d'activités professionnelles, ayant pour effet d'alarmer les autorités de santé publique au sujet de la toxicité potentielle des particules. Cette section a vocation à résumer brièvement le contexte et les faits ayant abouti aux investigations scientifiques

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

actuelles.

La préoccupation concernant la toxicologie des particules a été initialement inspirée par la mise en évidence des pathologies pulmonaires chez les travailleurs exposés à ces substances, dans les mines notamment (FLETCHER 1948). Il a nécessité plus d'un siècle pour reconnaître le lien entre l'inhalation de particules par les travailleurs et les maladies associées (HOUDY et al. 2011). Les maladies pulmonaires étaient observées dans plusieurs pays européens dès le début du XIX^{ème} siècle, période de révolution industrielle, mais l'état des connaissances et les moyens de l'époque sont à l'origine de ce temps de latence.

La problématique liée à l'amiante est le second exemple ayant contribué à cristalliser la recherche sur la toxicologie des particules. Les utilisations des fibres d'amiante ont considérablement augmenté lors de la Seconde Guerre mondiale, et les afflictions suscitées par la période ont accéléré les recherches dans le domaine (HOUDY et al. 2011). L'asbestose pulmonaire est la première conséquence recensée de l'exposition à l'amiante (HOUDY et al. 2011). Les travaux de Lynch et Smith constituent l'étude inaugurale de la relation entre le cancer du poumon et l'amiante (LYNCH et SMITH 1935; SELIKOFF 1990).

Depuis les premières études, une prise de conscience progressive a permis d'identifier que les effets délétères des « poussières » ne se limitaient pas aux travailleurs mais concernaient l'ensemble des populations. Ainsi, le terme « poussières » a été remplacé par « matières particulaires », se sub-divisant en différentes catégories. À cela s'ajoutent les nouvelles préoccupations relatives aux particules fines et ultrafines d'origine anthropique. Les travaux de Donaldson tendent à montrer que certains nanotubes de carbone sont en mesure d'induire des effets similaires aux fibres d'amiante (DONALDSON et al. 2006). Enfin, plus récemment, KOLOSNIJAJ-TABI et al. (2015) ont pu montrer la présence de nanotubes de carbone dans les poumons d'enfants parisiens présentant une sensibilisation à l'asthme.

Avec la commercialisation des nanotechnologies, la diversification des particules et la variété de sources associées démultiplient les effets toxiques et affectent l'environnement dans son ensemble. De fait, une dimension écologique de la problématique a émergé.

1.3.3 Focus sur l'échelle cellulaire : étude des voies d'entrée

La membrane plasmique est une membrane perméable et sélective qui définit la limite d'une cellule et maintient un environnement intracellulaire. Les petites molécules non polaires, comme l'O₂ ou le CO₂, diffusent facilement au travers de la bicouche phospholipidique, alors que les molécules polaires, tels que les ions, ou les nanomatériaux ne peuvent traverser par eux-mêmes la membrane plasmique (VERMA et STELLACCI 2010). Les ions et métabolites sont transportés à travers la bicouche lipidique via des canaux spécialisés ou des protéines de transport (VERMA et STELLACCI 2010). Pour ce qui concerne la plupart des macromolécules nanométriques ou autres assemblages moléculaires, l'internalisation dans les cellules se fait par endocytose de la membrane plasmique. L'endocytose se produit par des mécanismes multiples qui se divisent en deux catégories : la phagocytose ou la pinocytose (figure 1.14, CONNER et SCHMID 2003). La phagocytose est généralement limitée aux cellules spécialisées, alors que la pinocytose se produit dans toutes les cellules et se subdivise en quatre mécanismes : la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la calvéoline, et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la calvéoline. La complexité des mécanismes qui régissent l'endocytose suggère la possibilité pour les cellules de contrôler les entrées et constitue, d'un point de vue évolutif, une réponse à l'environnement (CONNER et SCHMID 2003).

En l'état actuel des connaissances, les nanomatériaux semblent pénétrer dans les cellules par la voie endocyttaire et rester confinés -dans un premier temps du moins- dans les endolysosomes (VERMA et STELLACCI 2010). Des observations en microscopie à force atomique ont montré que des nanoparticules d'or (3 nm de diamètre) ont été internalisées dans des macrophages par un mécanisme impliquant une pinocytose (SHUKLA et al. 2005). Après 24 heures, les nanoparticules semblent être confinées dans des lysosomes, disposés de manière périnucléaire (SHUKLA et al. 2005). Ce devenir endocyttaire a également été observé pour d'autres nanoparticules, à savoir des oxydes de fer (GOYA et al. 2008; MA et GU 2007; WILHELM et al. 2008) et des fullerènes (LI et al. 2008).

L'internalisation est conditionnée par de nombreux paramètres rela-

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

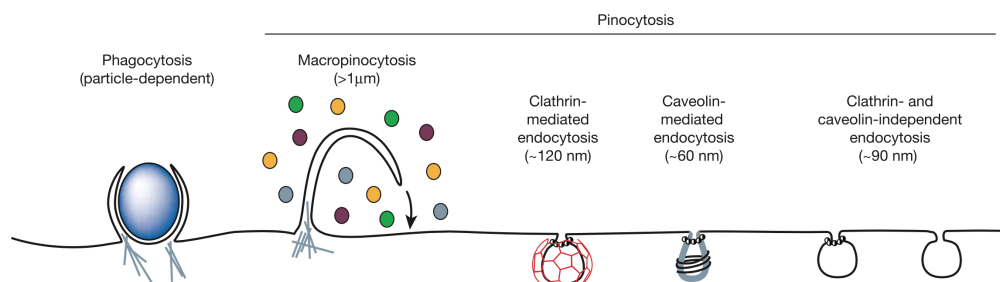


FIGURE 1.14 – Représentation schématique des différentes voies d'endocytose. Les voies endocytaires diffèrent en fonction de la taille de la vésicule, de la nature des composants transportés et du mécanisme de formation des vésicules (CONNER et SCHMID 2003).

tifs aux nanomatériaux et aux cellules. En effet, les interactions avec les cellules sont dictées par la chimie de surface, ainsi que par la forme et par la taille du nanomatériau. L'état d'agrégation de ce dernier peut réduire son taux d'entrée dans les cellules, jusqu'à 25% par exemple pour des nanoparticules d'or (ALBANESE et CHAN 2011).

Très récemment, LIU et al. (2017) se sont intéressés à caractériser l'internalisation de nanoparticules d'or. Les résultats de l'étude montrent que les nanoparticules d'or (50 nm) pénètrent par endocytose, principalement médiée par la clathrine, sous forme de particule seule. Au cours du transport intercellulaire, le long de la région périnucléaire, les nanoparticules individuelles présentes dans les premiers endosomes sont progressivement regroupées par fusion des vésicules pendant le processus de maturation (LIU et al. 2017). Lorsque ces nanoparticules entrent dans les lysosomes, elles forment principalement de grands clusters. Ce regroupement de nanoparticules est susceptible d'affecter leurs effets biologiques, y compris au niveau des interactions avec les membranes cellulaires.

Toutefois, dans certains cas, même si un ensemble de paramètres rend possible l'endocytose, l'aboutissement de celle-ci peut aussi s'avérer extrêmement complexe. Par exemple, concernant les nanotubes de carbone (ou les fibres d'amiante), il a été montré une toxicité, pour les cellules, dépendante de la longueur des nanotubes, en raison d'une internalisation

incomplète, dont résulte une « phagocytose frustrée » (BROWN et al. 2007 ; DONALDSON et al. 2010 ; POLAND et al. 2008). Il a été montré que, pour pouvoir être internalisés, les nanotubes de carbone (ou autres nanomatériaux cylindriques unidimensionnels) doivent entrer par la pointe et avec un angle spécifique en fonction du « bouchon » éventuellement présent aux extrémités (SHI et al. 2011).

Enfin, bien que la voie endocyttaire semble faire consensus pour ce qui est de l'internalisation des nanomatériaux dans les cellules, d'autres possibilités impliquant une pénétration directe au travers de la membrane biologique restent discutées (XIA et al. 2008.)

1.3.4 Biodistribution et organotropisme

Par la voie gastro-intestinale, les nanomatériaux doivent franchir une série de barrières préalablement à l'atteinte des capillaires du tissu sous-épithélial (figure 1.15). Les principales barrières sont le milieu gastrique et intestinal, la barrière de mucus, les jonctions serrées bloquant le passage intercellulaire, les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et enfin le tissu sous-épithélial (LUNDQUIST et ARTURSSON 2016).

Le franchissement de la barrière gastro-intestinale par les nanomatériaux n'est pas systématique comme le montre l'expérimentation de KHAN et al. (2014)), pour laquelle les nanoparticules d'or (enrobées au citrate, 20 nm, 600 $\mu\text{g L}^{-1}$) sont retenues dans la lumière intestinale des daphnies avec une absence d'internalisation. Des résultats similaires sont observés chez la daphnie pour des nanoparticules d'oxyde de cuivre et des nanotubes de carbone (HEINLAAN et al. 2011 ; PETERSEN et al. 2009). A l'inverse, il a été montré que les quantum dots, de CdSe et de ZnS, diversement enrobés, pénètrent au travers de la barrière intestinale des daphnies (FESWICK et al. 2013). La contamination des organismes par la voie trophique est également avérée pour d'autres modèles biologiques et divers nanomatériaux (BETTINI et al. 2017 ; HU et al. 2015 ; LADHAR et al. 2013 ; RAMSDEN et al. 2009).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré la propension des nanoparticules à pénétrer dans le système circulant par inhalation chez les rongeurs (KREYLING et al. 2014 ; SADAUSKAS et al. 2009 ; SUNG et al. 2009). Une étude

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

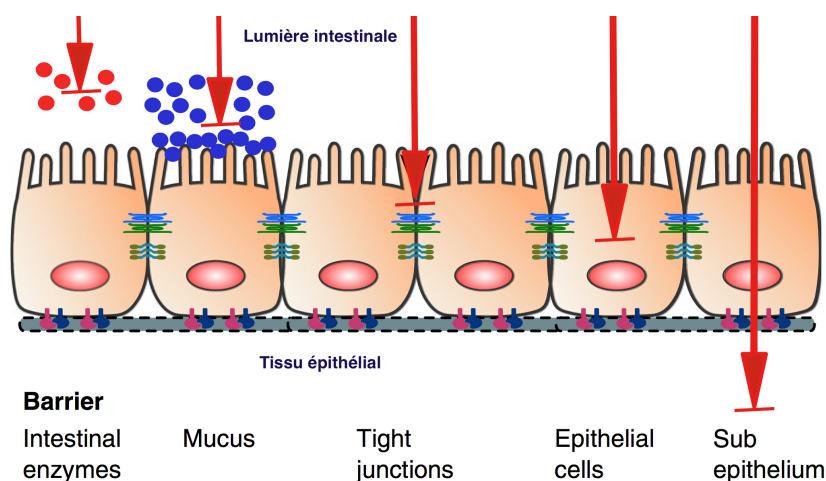


FIGURE 1.15 – Représentation schématique des entraves aux franchissements de la barrière gastro-intestinale (LUNDQUIST et ARTURSSON 2016 modifié).

réalisée chez l'homme témoigne d'un passage de nanoparticules marquées (aérosol de particules de carbone marquées au ^{99m}Tc , 5 – 10 nm) très rapide dans la circulation systémique, avec un niveau maximal atteint entre 10 et 20 minutes, qui persiste dans le temps (NEMMAR et al. 2002). Une autre étude montre que les nanoparticules d'or (enrobage PEG, 4 et 13 nm) se maintiennent au niveau le plus élevé dans le sang pendant 24 heures avant de décliner les 7 jours suivants chez des souris (CHO et al. 2010). Concernant un modèle aquatique, à la suite d'une exposition *via* la colonne d'eau, les nanoparticules sont détectées dans le sang des médakas exposés (KASHIWADA 2006), avec toutefois la difficulté, inhérente aux organismes aquatiques, à discerner la part de la voie directe et celle de la voie trophique.

La circulation sanguine assure ensuite la distribution à l'ensemble de l'organisme, qu'il s'agisse de diverses nanoparticules et vers de nombreux organes, incluant le foie, la rate, le cœur et le cerveau (HILLYER et ALBRECHT 2001 ; Ji et al. 2006 ; NEMMAR et al. 2002 ; OBERDÖRSTER et al. 2002). Par exemple, après 30 minutes, les nanotiges d'or (65 × 11 nm) injectées en intraveineuse ont été accumulées principalement dans le foie, alors que

l'enrobage au polyéthylène glycol (PEG) a entraîné une circulation prolongée dans le sang (NIDOME et al. 2006). Environ 70 – 80% de la dose d'or injectée se retrouve dans le sang et le foie des rats après 24 heures (DE JONG et al. 2008). Indépendamment de leur taille, et au regard de l'ensemble des organes étudiés, les nanoparticules d'or ont été plus largement accumulées dans le foie et la rate (DE JONG et al. 2008). Au bout de 28 jours, et à la suite d'une unique injection, le foie reste le principal organe d'accumulation bien que sa concentration en or ait largement diminuée (FRAGA et al. 2014). Concernant les nanoparticules d'or, abstraction faite de leurs tailles, la rate constitue également un organe d'accumulation majeur avec les poumons et les reins chez les modèles rongeurs (BALASUBRAMANIAN et al. 2010; FRAGA et al. 2014; SONAVANE et al. 2008). D'autres études ont attesté d'une accumulation importante dans le foie et la rate avec d'autres nanoparticules, telles que des nanoparticules de TiO_2 , d'Ag, d'Al, de Zn ou encore de Si mésoporeuse (CHO et al. 2013; FU et al. 2013; PARK et al. 2016; RECORDATI et al. 2016; TASSINARI et al. 2014; ZANDE et al. 2012).

Des études soulignent un transfert des nanomatériaux jusqu'au cerveau, mise en évidence par des bioaccumulations significatives dans cet organe (BOYES et al. 2012; CHO et al. 2013; CZAJKA et al. 2015; DE JONG et al. 2008; ELDER et al. 2006; RECORDATI et al. 2016; SONAVANE et al. 2008; WANG et al. 2007; ZANDE et al. 2012). Par exemple, il a été montré que les particules ultrafines peuvent pénétrer jusqu'au cerveau par la voie olfactive ou par inhalation (PHALEN et al. 2010). En raison de leurs tailles, les nanomatériaux peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (CHEN et al. 2010; KREUTER 1994). Bien que les mécanismes d'influx des nanomatériaux au travers de la barrière hémato-encéphalique demeurent encore mal compris, il semblerait que la transcytose constitue la voie majoritaire (FERNANDES et al. 2010), alors que seules les plus petites particules peuvent passer au travers des jonctions serrées qui constituent des pores de 4 – 6 nm (CUPAIOLI et al. 2014). Par ailleurs, CHEN et LIU (2012) suggèrent aussi que des monocytes circulants peuvent prendre des nanoparticules *via* le sang, et les faire pénétrer dans le cerveau selon le principe du cheval de Troie.

Concernant l'effet taille (nanoparticules d'or; 10, 50 et 100 nm), seules les plus petites ont été bioaccumulées dans le cerveau (DE JONG et al. 2008). La chimie de surface semble, quant à elle, en mesure de modifier le tropisme des nanomatériaux dans le cerveau (SONG et al. 2017).

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

Il semble toutefois ardu d'établir une règle générale pour expliquer et/ou prédire l'accumulation des nanoparticules dans les organismes, comme le souligne SCHLEH et al. (2012). WANG et al. (2015) montrent par exemple, qu'une simple modification d'enrobage est en mesure de modifier, en partie du moins, la biodistribution des fullerènes *in vivo*.

1.3.5 Effets toxiques

Un certain nombre d'études ont pu mettre en évidence une toxicité associée à l'exposition aux nanomatériaux, s'agissant d'une large diversité d'organismes. Les processus par lesquels s'exprime la toxicité sont multiples, et sont détaillés, pour partie, ci-après.

Stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, les nanomatériaux peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles ($\bullet HO$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que les espèces réactives de l'azote (RNS), comme l'oxyde nitrique (NO) et le peroxynitrite (ONOO) de manière directe ou indirecte (UNFRIED et al. 2007).

La chimie de surface des particules est à même de former directement des ROS (STOEGER et al. 2009), alors que les cibles cellulaires comme les enzymes NADPH-like, les mitochondries ou le calcium intracellulaire peuvent être activés pour produire des ROS de manière indirecte (BROWN et al. 2004; SINGH et al. 2007). Par ailleurs, les particules peuvent aussi générer indirectement des ROS via l'induction d'une réponse inflammatoire caractérisée notamment par le recrutement et l'activation de cellules productrices de ROS, comme les monocytes et neutrophiles (SCHINS et KNAA-PEN 2007).

Qu'il s'agisse de nanomatériaux très différents, et de modèles biologiques tout autant divergents, certains suggèrent la génération de ROS et l'induction d'un stress oxydant comme l'un des principaux mécanismes impliqués dans les manifestations toxiques entraînées par les nanoparticules (STONE et DONALDSON 2006).

Ainsi, les biomarqueurs du stress oxydant (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxidase, peroxydation lipidique) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* sont impactés, suite à une exposition de 15 jours, par les nanoparticules de CuO ($10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, GOMES et al. 2012). PAN et al. (2009) ont mesuré une augmentation des ROS intracellulaires induite par l'exposition de lignées HeLa à des nanoparticules d'or (1.4 nm), supplémentée d'une réponse au stress oxydant par les cellules, et de conclure à un dommage mitochondrial. Une exposition orale de 21 jours, aux nanoparticules de TiO₂, de ZnO ou d'Al₂O₃, génère également un stress oxydant important pour les érythrocytes des souris, comme l'attestent les niveaux accrus de ROS et l'altération de l'activité des enzymes antioxydantes (SHRIVASTAVA et al. 2014). De même, les nanoparticules de TiO₂ induisent un important stress oxydant chez deux lignées de cellules gliales (C6 et U373) en modifiant leurs états redox, associé à une peroxydation des lipides et une augmentation de l'expression génique des enzymes antioxydantes ($20 \mu\text{g cm}^{-2}$, HUERTA-GARCÍA et al. 2014).

Les nanoparticules d'argent peuvent également inhiber l'activité ATPase mitochondriale du foie des rats exposés (CHICHOVA et al. 2014). Chez les poissons *Danio rerio* exposés aux quantum dots CdS (8 et 50 nm , 100 et $40 \text{ ng jour}^{-1} \text{g}^{-1}$), un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale a pu être observé à la suite d'une exposition trophique (LADHAR et al. 2013). Des effets similaires ont été observés chez le protozoaire *Paramecium* pour une exposition aux nanoparticules de Fe₃O₄ (SARA et al. 2016).

Immunotoxicité et réponses inflammatoires

L'interaction entre les nanoparticules et les cellules du système immunitaire peut provoquer une réponse moléculaire ayant des effets toxiques (figure 1.16).

Certaines études pointent la contribution des nanoparticules aux processus inflammatoires. La réponse inflammatoire est accompagnée d'une sécrétion de molécules signaux (cytokines et chemokines) qui permettent la communication entre les cellules immunitaires et la coordination des événements moléculaires.

Des rats exposés oralement, à des doses réalistes, à l'additif alimentaire E171 (nanoparticules de TiO₂) présentent, au bout d'une semaine,

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

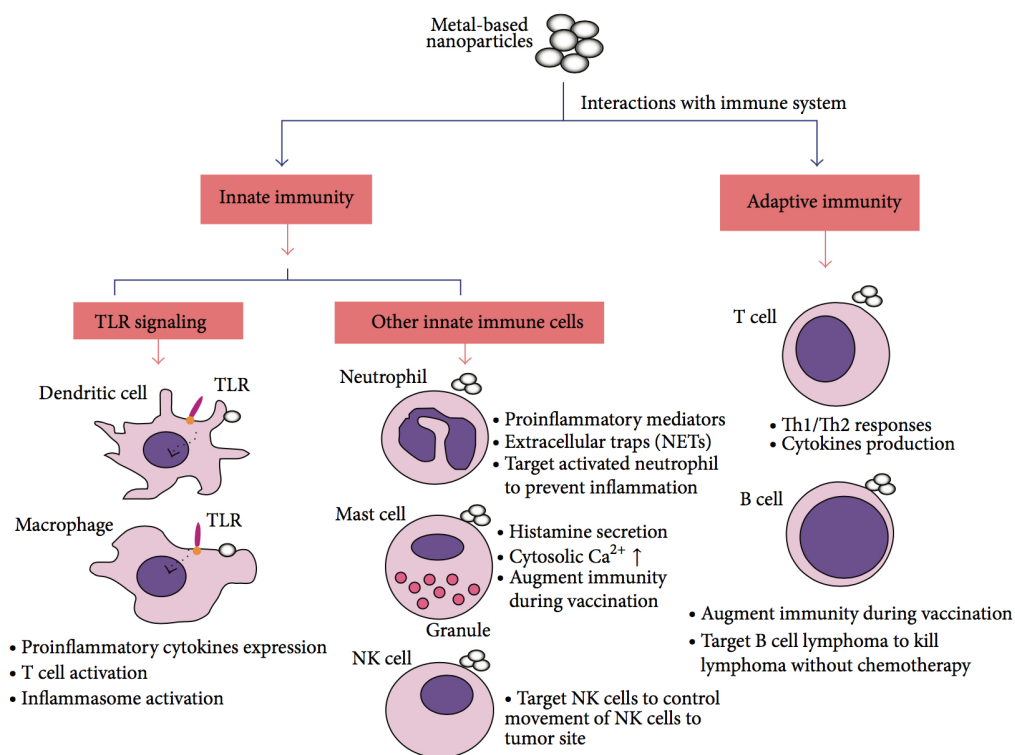


FIGURE 1.16 – Interactions possibles avec le système immunitaire dans le cas de nanoparticules métalliques (Luo et al. 2015).

une accumulation de titane dans les cellules immunitaires des plaques de Peyer, au sein desquelles la fréquence des cellules dendritiques a augmenté ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ demasse corporelle jour}^{-1}$, BETTINI et al. 2017). Un traitement de 100 jours a suffi pour promouvoir une inflammation du colon et initier des lésions préneoplasiques, tout en favorisant la croissance de foyers de cryptes aberrantes dans un modèle de carcinogénèse chimiquement induite (BETTINI et al. 2017).

Le traitement des souris avec des nanoparticules de Fe_3O_4 ($0,250$ à 1 mg kg^{-1}), par instillation intratrachéale, induit une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires IL-1, $\text{TNF-}\alpha$ et IL-6 (PARK et al. 2010). Les auteurs rapportent également une production accrue de cytokines (Th0-type, Th1-type, Th2-type), IL-2, IL-4, IL-5, $\text{TGF-}\beta$, ainsi qu'une hausse des IgE (PARK et al. 2010). CHO et al. (2009) mettent en évidence

un pattern d'expression génique typique de l'apoptose et de l'inflammation dans le foie de souris après une injection en intra-veineuse de nanoparticules d'or (4 mg kg^{-1}) enrobées avec du polyéthylène glycol (PEG). Les nanotubes de carbone monofeuillets sont également suspectés de provoquer une réponse inflammatoire (SHVEDOVA et al. 2005). Par ailleurs, les nanoparticules chargées positivement semble présenter un potentiel inflammatoire plus élevé comparativement à celles chargées négativement ou neutres (DOBROVOLSKAIA et McNEIL 2007).

Pour ce qui concerne la détermination des voies de signalisation impliquées, HONG et al. (2016) ont exposé des souris aux nanoparticules de TiO_2 pendant 90 jours ($2,5$ à 10 mg kg^{-1} de masse corporelle). L'augmentation de la dose d'exposition entraîne une diminution de la masse corporelle des souris, pendant que les dysfonctionnements hépatiques, l'infiltration des cellules inflammatoires, l'apoptose et la nécrose des hépatocytes augmentent (HONG et al. 2016). En outre, l'inflammation s'accompagne d'une augmentation de l'expression génique de Januse kinase 2 (JAK2) et de transducteurs de signaux et activateurs, mettant ainsi en évidence l'activation de voie JAK-STAT dont l'induction provoque une toxicité hépatique (HONG et al. 2016).

Par ailleurs, l'implication des récepteurs NOD-like (NLR), « senseur » intracellulaire cytosolique jouant un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation, a récemment été soulignée dans la réponse à l'exposition aux nanoparticules. Il existe de nombreuses sous-familles de NLR, chez l'homme tout du moins (KUFER et SANSONETTI 2011), dont l'assemblage en complexe constitue l'inflammasome (MARTINON et al. 2002). L'inflammasome NLRP3 (NLR pyrin domain containing 3), le mieux renseigné en l'état actuel des connaissances, est l'un des composants majeurs du système immunitaire inné, bien que les mécanismes d'activation demeurent encore largement inconnus.

Des oxydes métalliques inorganiques de taille nanométrique, tels que le SiO_2 ou le TiO_2 , activent l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (WINTER et al. 2011), de manière similaire à la silice ou aux fibres d'amiantes (DOSTERT et al. 2008). Pour les mêmes nanoparticules, BARON et al. (2015) montrent que, la libération d'adénosine extracellulaire, phénomène lié à un stress et/ou une activation, déclenche la formation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL- 1β . De même, les nanoparticules d'oxyde d'in-

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

dium-étain déclenchent l'inflammasome NLRP3, conjointement aux recrutements de neutrophiles et à la production d'IL-1 β (NAJI et al. 2016). Enfin, les nanoparticules d'argent sont également susceptibles d'activer l'inflammasome NLRP3 (MISHRA et al. 2016).

Autophagie

Constituant un processus physiologique par lequel les composants cytoplasmiques sont digérés par voie lysosomale, l'autophagie participe au maintien de l'homéostasie cellulaire à l'état basal, et peut se retrouver impactée en condition de stress (COHIGNAC et al. 2014). Certaines études suggèrent qu'une perturbation de ce processus peut, en partie au moins, expliquer la toxicité des nanomatériaux, en parallèle du stress oxydant et de la réponse inflammatoire.

Qu'il s'agisse d'une induction ou d'un blocage, une dérégulation du processus a été mise en évidence pour de nombreuses classes de nanomatériaux et divers modèles biologiques (STERN et al. 2012). Par exemple, l'ubiquitination des nanomatériaux, directement ou indirectement *via* une colocalisation avec des agrégats de protéines ubiquinées, atteste que les cellules peuvent sélectionner les nanomatériaux pour l'autophagie, comme dans le cas d'une invasion de pathogènes (STERN et al. 2012). Toutefois, l'accumulation d'autophagosomes, induite par l'exposition aux nanomatériaux, semble engendrer une cytotoxicité en conséquence d'un blocage des mécanismes de survie autophagique, conduisant *in fine* à la mort cellulaire (STERN et al. 2012).

De plus, comme précédemment explicité, les lysosomes interagissent directement avec les nanomatériaux, pour leur entrée dans les cellules notamment. L'un des effets associés au dysfonctionnement lysosomal par l'exposition aux nanomatériaux est la perméabilisation des membranes de l'organite. Or, cette perméabilité de la membrane des lysosomes est un mécanisme reconnu de mort cellulaire, qui engendre un stress oxydant médié par le fer lysosomal ou la libération de cathepsines et d'autres hydrolases lysosomales associées. De ces événements résulte la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (KROEMER et JÄÄTTELÄ 2005).

Cytotoxicité

La cytotoxicité est généralement évaluée de telle sorte que les cellules cultivées sur plaques sont exposées à des nanomatériaux en suspension dans le milieu de culture cellulaire (FRÖHLICH et FRÖHLICH 2016).

Une augmentation dose-dépendante de la cytotoxicité de nanoparticules d'or (10 et 25 nm) a été observée pour des lignées épithéliales et endothéliales humaines, en témoigne une diminution conjointe de la viabilité et de la prolifération des cellules (FREESE et al. 2012). À noter que, pour cette expérience, contrairement à la taille, une modification de l'enrobage a impacté la cytotoxicité observée (FREESE et al. 2012). De même, les cellules pulmonaires humaines BEAS-2B, exposées aux nanoparticules d'argent enrobées de citrate et de différentes tailles (10, 40 et 75 nm), présentent une viabilité moindre (GLIGA et al. 2014).

Les dosages de LDH (lactate déshydrogénase - marqueur de l'intégrité membranaire) et de WST-1 (sel de tétrazolium hydrosoluble - marqueur de l'activité métabolique) ont montré une cytotoxicité pour différentes nanoparticules (TiO₂, SiO₂, ZnO et noir de carbone) pour les cellules intestinales humaines Caco-2 (GERLOFF et al. 2009). De même, les nanoparticules d'argent affectent l'intégrité membranaire des hépatocytes de truite et modifient l'activité métabolique des cellules (FARKAS et al. 2010). Pour des cellules épithéliales intestinales, l'accumulation des nanoparticules d'or (5 µg mL⁻¹; 15, 50 et 100 nm) a initié une cytotoxicité mise en évidence par la dépolarisation des membranes mitochondriales (YAO et al. 2015).

Homéostasie et métabolisme

Des perturbations de l'homéostasie et du métabolisme ont été mises en évidence.

Guo et al. (2017) rapportent une altération fonctionnelle de la barrière intestinale suite à une exposition aux nanoparticules de TiO₂, avec notamment une augmentation de la perméabilité et une absorption de nutriments (Fe, Zn et acides gras) significativement diminuée. Suite à une exposition de 28 jours aux nanoparticules d'argent (30 mg kg⁻¹, 60 nm), les rats traités ont présenté des lésions histologiques au niveau du tractus

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

gastrointestinal, induisant un relargage de mucus de composition anormale (JEONG et al. 2010). Les cellules épithéliales sont également affectées avec une perte de microvillosités, que les auteurs associent à la réduction des capacités d'absorption pour expliquer la perte de masse significative des souris exposées aux nanoparticules d'argent (5 à 20 mg kg⁻¹ de masse corporelle, SHAHARE et al. 2013).

Les nanoparticules de polystyrène peuvent se lier à l'apolipoprotéine A-1, entraînant des effets sur le métabolisme des lipides chez le poisson en bout de chaîne trophique (CEDERVALL et al. 2012). Une exposition de 14 semaines aux nanoparticules de TiO₂ augmente significativement la concentration en glucose dans le plasma des souris exposées et provoque une résistance à l'insuline (64 et 320 mg kg⁻¹ de masse corporelle, HU et al. 2015). Chez le poisson d'eau douce, *Labeo rohita*, les nanoparticules de SiO₂ (sphérique, 80 – 100 nm) sont à l'origine d'une altération de la concentration des électrolytes sanguins, tels que le sodium, le potassium et le chlore (KRISHNA PRIYA et al. 2015). Par ailleurs, une modification de l'activité Na⁺/K⁺ ATPase a pu être observée au niveau des branchies pour des nanoparticules de SiO₂ ou d'Ag (KRISHNA PRIYA et al. 2015; OSBORNE et al. 2015).

Fonctions endocrines et reproduction

De récentes études suggèrent également de considérer les nanomatériaux comme une nouvelle classe de perturbateurs endocriniens pouvant entraîner une reprotoxicité (CAMPAGNOLO et al. 2012; EMA et al. 2010; IAVICOLI et al. 2013).

Les effets stéroïdiens des nanoparticules de carbone (*i.e.* gaz d'échappement diesel et noir de carbone) ont été mis en évidence (KOMATSU et al. 2008; LI et al. 2016a; LI et al. 2013; RAMDHAN et al. 2009; YAMAGISHI et al. 2012; YOSHIDA et al. 2008). Par exemple, certains travaux montrent que l'exposition aux gaz d'échappement diesel, riches en nanoparticules, augmente les concentrations plasmatiques de testostérone chez les rats mâles (RAMDHAN et al. 2009), et diminue la concentration de progestérone dans le sérum maternel pendant la gestation (LI et al. 2013). Par ailleurs, les nanoparticules d'or de 10 nm peuvent entrer dans les cellules de la granulosa chez le rat, transloquer dans des gouttelettes lipi-

diques, modifier la morphologie des mitochondries et moduler ensuite la production d'œstrogènes (STELZER et HUTZ 2009). Les nanoparticules de TiO_2 affectent les concentrations d'hormones stéroïdiennes sexuelles dans le sérum des souris femelles exposées (2 et 10 mg kg^{-1} , GAO et al. 2012; TASSINARI et al. 2014).

À noter également que le stress oxydatif est un inhibiteur bien connu de la production de stéroïdes sexuels pour les ovaires (MARGOLIN et al. 1990). Il est par conséquent raisonnable de postuler que les nanomatériaux peuvent avoir une incidence sur la production d'hormones stéroïdiennes en raison de la génération d'un stress oxydant. Toutefois, une modulation de l'expression des gènes stéroïdiens par les nanoparticules d'or a été mise en évidence indépendamment du stress oxydant (LARSON et al. 2014).

D'autre part, du sperme exposé aux nanoparticules d'or entraîne une immobilité de 25% des spermatozoïdes, alors qu'elle n'est que de 5% pour les non-exposés (WIWANITKIT et al. 2009). Enfin, les observations en microscopie montrent une pénétration des nanoparticules d'or dans la tête et le flagelle des spermatozoïdes (WIWANITKIT et al. 2009).

Génotoxicité

La génotoxicité est considérée comme un aspect important de la carcinogénèse. De fait, les interactions des nanomatériaux avec l'ADN doivent être appréhendées.

CARDOSO et al. (2014) ont évalué les dommages à l'ADN dans le cortex cérébral de rats adultes suite à une exposition aiguë (24h) ou chronique (28 j) aux nanoparticules d'or de 10 et 30 nm ($70 \mu\text{g kg}^{-1}$). Bien que tous les traitements aient généré des dommages à l'ADN, la fréquence la plus élevée est observée pour l'exposition chronique et ce, indépendamment de la taille des nanoparticules (CARDOSO et al. 2014). Une exposition aux nanoparticules de CdS par le sédiment ($0,52 \text{ mg kg}^{-1}$) a également entraîné des altérations de l'ADN chez le vers aquatique *Tubifex tubifex* (DEDEH et al. 2016).

Pour ce qui concerne les nanoparticules d'argent, l'exposition de lignée cellulaire de *Oryzias latipes* provoque des aberrations chromosomiques et

1.3. « NANOTOXICOLOGIE » OU LA TOXICOLOGIE DES PARTICULES

une aneuploïdie (WISE et al. 2010). Par ailleurs, une analyse transcriptomique avec une puce à ADN montre une sur-représentation de gènes associés à la réparation des dommages à l'ADN (GRIFFITT et al. 2013).

L'expérimentation de MOHAMED (2015) atteste d'une fragmentation persistante de l'ADN apoptique et des mutations dans les exons suite à l'administration de nanoparticules de TiO_2 .

Cependant, pour une même nanoparticule (CeO_2), les effets génotoxiques ne sont pas observés pour l'ensemble des organismes exposés (BOUR et al. 2015b).

Une exposition chronique aux nanoparticules d'or chez *Drosophila melanogaster* conduit à des effets génotoxiques (VECCHIO et al. 2012b) et révèle des modifications phénotypiques pour les générations suivantes, attestant de leur capacité mutagène transmissible à la descendance (VECCHIO et al. 2012a). BALANSKY et al. (2013) montrent des effets clastogènes et épigénétiques transplacentaires des nanoparticules d'or ($3,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

Neurotoxicité

Pour la neurotoxicité, les premières considérations portent sur la capacité des nanomatériaux à atteindre le système nerveux et les mécanismes toxiques sous-jacents.

Les nanoparticules métalliques (Al, Ag et Cu, $50 - 60 \text{ nm}$) peuvent altérer la fonction et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, en induisant des œdèmes cérébraux prononcés associés à une fuite de la barrière hémato-encéphalique ($2,5 \text{ à } 50 \text{ mg kg}^{-1}$, SHARMA et al. 2009). Une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est également observée dans le cas d'une exposition *in vivo* aux nanoparticules d'or de 40 nm (LI et al. 2015), et *in vitro* pour des nanoparticules d'argent de 7 nm (XU et al. 2015).

Concernant l'expression des gènes dans le cerveau de souris femelles exposées aux nanoparticules de TiO_2 (10 mg kg^{-1} de masse corporelle), ZE et al. (2014) ont révélé que l'expression de 424 gènes était modifiée, dont des gènes associés à la mémoire et à l'apprentissage, à la réparation de l'ADN, au métabolisme lipidique et protéique, à la réponse immunitaire, au métabolisme énergétique, à l'apoptose, au stress oxydatif, ainsi qu'au développement du cerveau. SHENG et al. (2009) ont constaté que les expressions des gènes associés à la mémoire et à l'apprentissage étaient

impactées chez le poisson zèbre suite à une exposition subchronique aux TiO_2 . Le cerveau des truites exposées pendant 4 semaines aux nanoparticules de TiO_2 présente une accumulation significative de titane, avec une inhibition de 50% de l'activité Na^+/K^+ ATPase et des niveaux de Cu et Zn divergents comparativement aux truites non exposées (RAMSDEN et al. 2009).

Les nanoparticules d'or (14 nm) peuvent également altérer la neurotransmission avec une augmentation de l'activité acétylcholinestérasique au niveau du cerveau des poissons *Danio rerio* (DEDEH et al. 2014). En revanche, les nanoparticules d'oxyde de fer inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase et induisent une réponse apoptotique au niveau du cerveau des poissons zèbres (200 mg kg⁻¹, DE OLIVEIRA et al. 2014).

Une expérimentation comportementale montre que les rats traités aux nanoparticules de ZnO pendant 8 semaines présentent des capacités de mémoire et d'apprentissage spatial amoindris en raison de l'altération de la plasticité synaptique (HAN et al. 2011). Enfin, les rongeurs âgés s'avèrent plus sensibles à la neurotoxicité des nanoparticules de ZnO (5,6 mg kg⁻¹, TIAN et al. 2015).

1.4 Progrès technologiques *versus* principe de précaution

Au regard de l'ensemble des données de la littérature scientifique pour les nanomatériaux, il convient d'illustrer la dualité entre ce qui s'apparente à des progrès technologiques et le principe de précaution semblant tout autant nécessaire. L'appréhension des nanotechnologies par le droit est au centre de préoccupations récentes suscitant des interrogations légitimes. L'accroissement massif de la production et de l'utilisation de nanomatériaux manufacturés au cours de ces dernières années est indéniable. Un rapport du Sénat français indiquait, en 2009, qu'« environ 2000 nanoparticules manufacturées sont d'ores et déjà commercialisées » et que leur présence est identifiée dans « plus de 700 produits de consommation » (BRAYE et al. 2009).

La situation législative actuelle sur les nanomatériaux semble résulter des

différents aspects détaillés ci-après.

1.4.1 Limitations scientifiques

Les nanoparticules naturelles sont présentes dans l'environnement depuis le début de l'histoire de la Terre, et de fait, les organismes vivants ont subsisté en leurs présences. Les nanomatériaux manufacturés présentent quant-à-eux des réactivités spécifiques et engendrent des effets biologiques expérimentalement.

Les techniques analytiques disponibles à l'heure actuelle pour quantifier les nanomatériaux dans l'environnement sont très complexes et en cours de développement, et par conséquent, ne permettent pas la réalisation d'études de terrain (GOTTSCHALK et al. 2010; TIEDE et al. 2008). En dépit d'estimations fondées à partir d'études de relargage et de modélisation, il résulte un manque d'informations sur les concentrations réellement présentes dans l'environnement. Ce à quoi s'ajoute l'incertitude du comportement et du devenir des nanomatériaux dans l'environnement, qui diffèrent *a priori* selon leurs caractéristiques initiales (PETERSEN et al. 2014), le tout régissant la toxicité et le transfert aux organismes.

En témoigne une étude bibliométrique, les expérimentations en nano-écotoxicologie sont encore très peu nombreuses, soulignant que cette discipline émergente se développe beaucoup plus lentement que la nanotoxicologie (KAHRU et IVASK 2013). Malgré cela, en considérant indépendamment chaque nanomatériau, seulement 1% des publications se réfère à la nanotoxicologie et 0.1% à la nanoécotoxicologie (KAHRU et IVASK 2013), attestant nettement d'un déséquilibre avec les autres disciplines scientifiques et des connaissances lacunaires qui en résultent. Par exemple, pour les États-Unis, CHOI et al. (2009) ont évalué entre 34 et 53 années d'études approfondies, considérant un budget raisonnable, pour tester la toxicité de l'ensemble des nanomatériaux existants au moment de leur étude; ce qui va sans dire, est largement incompatible avec la frénésie des avancées technologiques. Par ailleurs, concernant la nanoécotoxicologie, il est intéressant de souligner le manque de diversité biologique dans la réalisation des expérimentations, avec une focalisation principalement sur certains modèles biologiques comme les algues, daphnies et quelques espèces de poissons (HANDY et al. 2008; KAHRU et DUBOURGUIER 2010; NAVARRO et al. 2008; O'BRIEN et CUMMINS 2010). Dans le cadre des nanomatériaux, cer-

tains s'interrogent également sur la mise en œuvre des expérimentations et des conceptions dogmatiques inhérentes à la toxicologie (LISON et al. 2014).

L'ensemble de ces différents points contribue sans doute aux difficultés rencontrées pour l'élaboration d'un cadre législatif pour les nanomatériaux. Cela invite clairement à démultiplier les études sur le sujet afin d'approfondir les effets toxiques, et de se préoccuper davantage de l'impact sur les écosystèmes, en abordant notamment la question du transfert dans l'environnement et de doses réalistes.

1.4.2 Vide juridique persistant

Malgré un intérêt croissant pour les nanotechnologies d'une part, et pour la nano(*éco*)toxicologie d'autre part, les débats sur les aspects éthiques, politiques, réglementaires et juridiques associés demeurent encore relativement limités. Ainsi, considérant le cas australien, BOWMAN et HODGE (2006) montrent l'écart réglementaire émergeant entre les avancées des nanotechnologies et les attentes de la société en termes de garanties et de protections. Et aux auteurs de souligner, qu'au vu de la littérature sur le sujet, et comparativement aux technologies antérieures (*i.e.* biotechnologie, pharmaceutique, *etc.*), la spécificité des nanotechnologies justifie une prise en compte séparée et précoce concernant les différents aspects susmentionnés (BOWMAN et HODGE 2006).

L'action juridique requière la définition claire des termes impliqués, ce qui n'est pas le cas des « nanomatériaux », pour lesquels une unique définition est loin de faire consensus. MAYNARD (2011) souligne, que les changements de propriétés ne sont pas uniquement fonction de la taille nanométrique et que, par conséquent, une définition globale ne peut pas appréhender les spécificités de chaque nanomatériau et leurs risques potentiels. Ce contre quoi, STAMM (2011) argumente de la nécessité d'une définition, en tant que classe de matériaux, plutôt que de considérer leurs degrés de dangerosité. Ces deux articles montrent la controverse que suscite la régulation des nanomatériaux.

Pour l'heure, la réglementation européenne REACH (acronyme de « Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals ») re-

1.4. PROGRÈS TECHNOLOGIQUES VERSUS PRINCIPE DE PRÉCAUTION

connaît les propriétés spécifiques des nanomatériaux, sans pour autant requérir d'une disposition particulière pour ceux-ci (EUROPEAN-COMMISSION 2008). En effet, comme toutes les substances chimiques dont la production dépasse une tonne par an, les nanomatériaux sont soumis à enregistrement. En pratique, la production industrielle semble fréquemment inférieure au seuil établi par le règlement (VERGÈS 2010); et n'étant pas classés dans les substances « préoccupantes », la déclaration sans seuil de production pour les nanomatériaux n'est pas requise.

En France, aucune loi ne régule la mise sur le marché des nanomatériaux manufacturés, mais des mesures ont été prises pour la déclaration et l'information du public. En effet, les déclarations de fabrication, d'importation depuis l'étranger et/ou de mise sur le marché de « substances à l'état nanoparticulaire », pour des quantités supérieures à 100 g, sont obligatoires au regard des lois Grenelle de l'Environnement 1 et 2 (Loi n°2009 - 967 du 3 août 2009 - article 42, 2009 et loi n°2010 - 788 du 12 juillet 2010 - article 185, 2010).

Pour les États-Unis d'Amérique, l'agence de protection environnementale (US EPA) et celle des produits alimentaires et médicamenteux (US FDA) considèrent la nouveauté des nanomatériaux au regard de leurs « identités moléculaires », c'est-à-dire que, si le nanomatériau s'apparente à un produit existant, il tombe sous la réglementation en vigueur de son équivalent non-nano (US-EPA 2008).

Enfin, un exemple intéressant et récent illustre le non-avancement législatif en dépit de résultats scientifiques, le tout suscitant des craintes chez les consommateurs. Il concerne l'étude de BETTINI et al. (2017) qui met en évidence les effets génotoxiques et inflammatoires au niveau intestinal des rats exposés oralement aux nanoparticules de TiO_2 (pigment E171 en Europe). En 2016, l'efsa (European Food Safety Authority), sur la base des données de la littérature, avait conclu que les expositions - des consommateurs - au E171 n'étaient pas de nature à entraîner un risque sanitaire. La publication de BETTINI et al. (2017) relance le débat autour du E171, et l'Anses doit (re)évaluer la situation au regard de cette étude et du précédent avis de l'efsa. Il en est conclu que l'étude de BETTINI et al. (2017) apporte de nouveaux éléments, notamment le potentiel effet promoteur cancérogène du E171, mais qu'elle n'est pas suffisante pour remettre en cause l'évaluation de l'efsa (ANSES 2017). Par ailleurs, il faut souligner que, dès 2006, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC)

a classé le TiO_2 comme substance « cancérogènes possibles chez l'Homme (2B) » par voie pulmonaire (ANSES 2017). Ainsi, cet exemple interpelle clairement quant au moment à partir duquel les autorités compétentes considèreront que les études scientifiques seront assez nombreuses pour s'accorder une évolution du cadre législatif actuel.

À noter que les questionnements relatifs à la législation des nanomatériaux concernent, pour l'heure, principalement les aspects sanitaires, là où finalement les enjeux environnementaux apparaissent comme secondaires.

1.5 En conclusion

Cette étude bibliographique a montré qu'il existait une très grande diversité de nanomatériaux et que ces derniers sont à considérer comme une classe à part entière de contaminant.

Alors que les nanomatériaux ont été inclus dans de nombreuses applications, et que l'évaluation de leur relargage repose essentiellement sur des modélisations, le devenir des nanomatériaux dans l'environnement reste mal connu. De plus, les concentrations réelles des nanomatériaux dans l'environnement ne sont pas renseignées en raison des difficultés analytiques.

Par conséquent, à défaut d'études *in situ*, les études écotoxicologiques tendent à intégrer la complexité environnementale dans le design des expériences conduites en conditions contrôlées. Néanmoins, les expérimentations restent peu nombreuses relativement à la diversité des nanomatériaux, et ce tant en milieu terrestre, qu'en milieu aquatique.

Les réponses biologiques associées à l'exposition des nanomatériaux sont essentiellement renseignées dans le cadre d'études de toxicologie impliquant des rongeurs ou des cultures cellulaires.

Chapitre 2

Démarche scientifique et bases méthodologiques

L'évaluation écotoxicologique d'un xénobiotique dans le cadre des écosystèmes requière la mise en place d'une approche intégrative de différentes échelles, de la molécule à la population et aux interactions interspécifiques. En filigrane du présent travail, le transfert trophique constitue l'articulation centrale et commune à l'ensemble des expérimentations, alors que les réponses biologiques sont évaluées par différentes approches.

Ce chapitre détaille les choix scientifiques émanants de la littérature associée, et la transposition expérimentale qui en découle. Dans un premier temps, nous revenons sur le choix du nanomatériau utilisé pour l'ensemble des expériences; dans un second temps, l'exposition trophique et les organismes sélectionnés sont détaillés. Enfin, les outils méthodologiques utilisés pour l'évaluation des transferts et des effets associés à l'exposition du nanomatériau sont brièvement décrits.

2.1 Nanoparticules d'or comme contaminant modèle

Alors que l'état de l'art (CHAPITRE 1) a considéré de manière non exhaustive toute la diversité des nanomatériaux, pour ce travail, les nanoparticules ont été sélectionnées comme contaminant modèle. Métal « noble » et précieux par excellence, l'or est très peu réactif par nature, à tel point

que des artefacts historiques ont traversé le temps sans ternir et se détériorer.

2.1.1 Utilisation des nanoparticules d'or

Alors que dans sa forme massive, les utilisations de l'or en joaillerie, en électronique, ou encore comme valeur de transaction, sont bien connues ; les applications usant des propriétés spécifiques de l'or nanoparticulaire demeurent moins vulgarisées. L'utilisation de métaux à l'état nanoparticulaire a été mise en évidence dès l'antiquité romaine, comme mentionné dans le CHAPITRE 1, avec l'exemple décoratif que constitue la coupe de Lycurgue, et a également permis une coloration intense des vitraux religieux au fil de l'histoire. Depuis quelques décennies, d'autres types d'applications impliquant l'or à la taille nanométrique fleurissent.

Les applications biomédicales des nanoparticules métalliques débutent dans les années 1970 avec l'utilisation de nanobioconjugués suite à la découverte de l'immunomarquage à l'or par FAULK et TAYLOR (1971). Les techniques traditionnelles d'imagerie restent essentielles au diagnostic et le bénéfice de l'utilisation des nanoparticules d'or s'avère être supérieure à celui des produits chimiques classiques. Par la suite, des nanostructures d'or ont été introduites dans un large éventail d'applications associées à la biologie ou cristallisent un espoir de progrès (ANTOSH et al. 2015; BOGDANOV et al. 2015; GAO et al. 2015; KATZ et WILLNER 2004; ROSI N.L. 2005; WHITESIDES 2003). Les propriétés physico-chimiques de ces nanostructures sont en effet d'un grand intérêt pour l'imagerie et les senseurs biologiques. Actuellement, de nouvelles recherches s'orientent vers la vectorisation des traitements médicamenteux (GHOSH et al. 2008; TRIPATHI et al. 2015). D'autres applications concernent les capacités de catalyse de l'or (CORTI et al. 2007), la pigmentation de divers matériaux (BLOSI et al. 2012; GAUTIER et al. 2010) ou encore pour l'amélioration technologique des cosmétiques (RAJ et al. 2012). Enfin, des usages peuvent également concerner le secteur de la construction avec, par exemple, des films d'or (inférieurs à 20 nm d'épaisseur) inclus dans le verre des fenêtres, ayant pour finalité une transmission de la lumière visible au travers du vitrage, tout en reflétant la lumière infrarouge (DREADEN et al. 2012).

2.1.2 Une synthèse maîtrisée et reproductible

Au regard de l'ensemble des nanoparticules, la synthèse des nanoparticules d'or est connue de longue date, et par conséquent les protocoles de synthèse ont été optimisés au fil du temps, permettant la maîtrise et la reproduction de la fabrication de celles-ci.

Il existe différentes façons de synthétiser des nanoparticules d'or, la plupart du temps à partir d'une solution de $\text{HAu}^{\text{III}}\text{Cl}_4$. La réduction, par le citrate, de Au^{III} à Au^0 , en solution aqueuse, a été initiée par TURKEVICH et al. (1951), et constitue une méthode toujours utilisée de nos jours.

Classiquement, le $\text{HAu}^{\text{III}}\text{Cl}_4$ porté à ébullition, est ajouté à une solution de dihydrate de citrate trisodique. Au cours de la réaction, deux étapes se distinguent, à savoir la nucléation et la croissance des particules (ZHAO et al. 2013). La première étape de la réaction de Turkevich consiste à oxyder le citrate pour aboutir à la formation de dicarboxyacétone, alors que les ions Au^{3+} sont réduits en ions Au^{1+} . Suite à cette étape, des atomes d'or Au^0 générés s'assemblent pour former des agrégats. Au cours de ce processus, le dicarboxyacétone agit comme une molécule « organisatrice » facilitant les étapes de cette réaction (KUMAR et al. 2007).

À cette réduction peut s'ajouter une étape ultérieure afin de remplacer l'enrobage au citrate par un autre ligand d'intérêt (DANIEL et ASTRUC 2004; KIMLING et al. 2006). Par ailleurs, des modifications récentes de la méthode de Turkevich permettent un meilleur contrôle de la taille des nanoparticules pour une gamme allant de 9 à 120 nm (KIMLING et al. 2006). Bien que les nanoparticules d'or peuvent être stabilisées par une certaine diversité de ligands (*i.e.* polymères, dendrimères, biomolécules, *etc.*, (DANIEL et ASTRUC 2004; ZHAO et al. 2013)), les nanoparticules d'or les plus stables ont été décrites par GIERSIG et MULVANEY (1993), et sont fonctionnalisées par des thiolates, en raison de la liaison chimique forte Au—S. La substitution moléculaire, par un ligand plus affiné, est une des méthodes permettant une modification de l'enrobage avec, par exemple, des oligonucléotides, des peptides ou des polyéthylène glycols (PEG).

Pour ce travail, la synthèse des nanoparticules d'or a été réalisée à l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux dans le cadre de

l'ANR CITTOXIC-NANO dans laquelle s'inscrit ce travail.

Brièvement, celle-ci consiste en la réduction des ions aurique en solution aqueuse avec du citrate trisodique, selon la classique méthode de Turkevich. Le sel tétrachloraurate de potassium (KAuCl_4) est dissous dans de l'eau ultrapure. La solution est ensuite portée à ébullition sous agitation magnétique. À l'atteinte du point d'ébullition de la solution, une solution de citrate trisodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) est ajoutée, l'ébullition du mélange est maintenue pendant 30 minutes. Pendant cette phase, les nanoparticules d'or croissent pour atteindre un diamètre de 10 nm.

La seconde partie du protocole consiste à modifier l'enrobage des nanoparticules, passant du citrate au polyéthylène glycol (PEG), d'après la méthode de BRISSON et MORNÉ 2013, basée sur l'échange du ligand de surface. Le poly(éthylèneglycol) bis(3-aminopropyl) est dissous dans une solution tampon de borate à pH 8. Une solution de réactif de Traut (2-iminothiolane-HCl) est ajoutée pendant une nuit. Enfin, du sodium borohydride (NaBH_4) est ajouté au même nombre de moles que le réactif de Traut et le bis(amine) des PEG pour une réaction de 10 min. Le pH est ajusté à 6,5 – 7 avant d'ajouter les nanoparticules (enrobées au citrate) précédemment synthétisées. Après une nuit d'incubation à l'obscurité, le mélange est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 70°C. L'excès de PEG est ensuite éliminé par 7 cycles de lavage par ultrafiltration.

La taille des nanoparticules est mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyses d'images à partir de photographies de microscopie électronique à transmission (TEM).

Pour l'ensemble des expérimentations de ce travail, un lot unique de nanoparticules d'or (10 nm, fonctionnalisées aux PEG-amine) a été utilisé. L'enrobage aux PEG-amine permet d'obtenir des nanoparticules chargées positivement. La description chimique des nanoparticules en solution est détaillée dans le CHAPITRE 3.

2.1.3 Propriétés physico-chimiques

Cœur or

Le premier travail scientifique sur les nanoparticules d'or, publié par FARADAY (1857), attribue la couleur rouge à la nature colloïdale de l'or. Quelques années plus tard, leur absorption dans le visible est expliquée

2.1. NANOPARTICULES D'OR COMME CONTAMINANT MODÈLE

grâce aux équations électromagnétiques de Maxwell (MIE 1908).

Les nanoparticules d'or sont synthétisables pour l'ensemble de la gamme de tailles, allant de 1 à 100 *nm*, et pour diverses formes. L'absorption de la bande plasmon peut être observée dans le visible (figure 2.1).

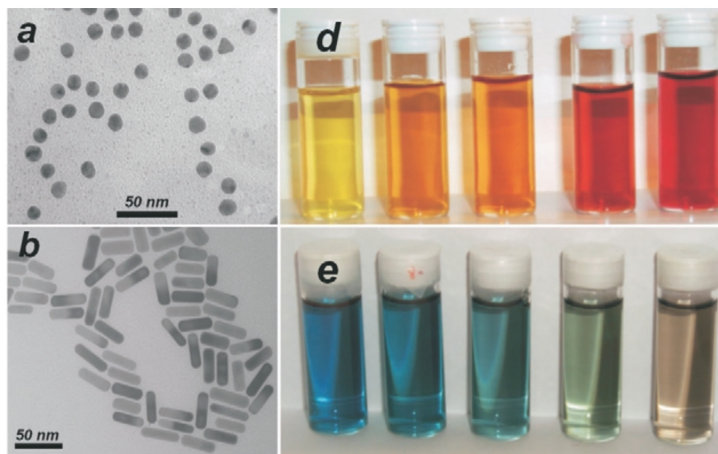


FIGURE 2.1 – Photographies de microscopie électronique à transmission pour (a) des nanosphères d'or, et (b) des nanotiges d'or. Variation d'absorption relative à la taille (d) des nanosphères d'or ou (e) des nanotiges d'or (LIZ-MARZÁN 2004).

Selon la théorie de MIE (1908), une fréquence électromagnétique induit une oscillation cohérente de résonance des électrons libres à la surface de la nanoparticule, à condition que la taille de celle-ci soit inférieure à la longueur d'onde. Ce phénomène s'appelle la résonance plasmon de surface. Pour les nanoparticules métalliques, la résonance plasmonique de surface aboutit à un champ électromagnétique renforcé, se traduisant par une oscillation des charges en surface (figure 2.2).

La résonance plasmonique de surface est observée jusqu'à 3 *nm* de diamètre minimum pour les nanoparticules d'or. En deçà de cette taille, la nanoparticule d'or ne peut plus être considérée comme un « morceau » de métal, avec une bande de conduction, mais se rapproche d'une molécule, caractérisée par des orbitales moléculaires. De fait, il est préférable d'utiliser le terme de « cluster » plutôt que de nanoparticules.

Au-delà de 3 *nm*, le champ électromagnétique renforcé en surface de la

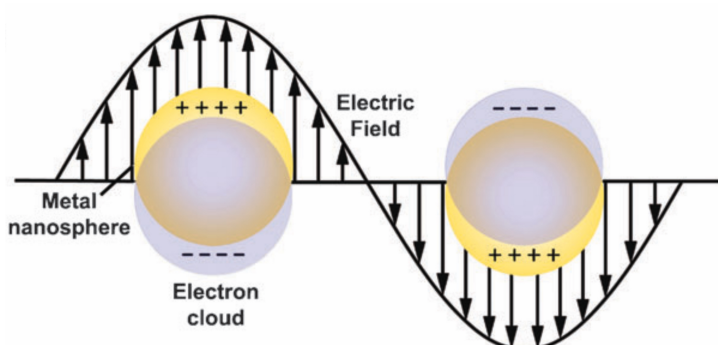


FIGURE 2.2 – Représentation schématique de l'interaction d'un rayonnement électromagnétique avec une nanosphère d'or. Le dipôle induit oscille en phase avec le champ électrique incident. (COBLEY et al. 2011).

particule génère des propriétés optiques spécifiques. De fait, les coefficients d'extinction des bandes de la résonance plasmonique de surface sont extrêmement élevés (jusqu'à $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), de plusieurs ordres de grandeurs que les colorants organiques (BOISSELIER et ASTRUC 2009). En conséquence, les nanoparticules d'or absorbent et diffusent la lumière incidente dans des proportions dépendantes de leurs tailles. Ainsi, l'absorption est majoritaire quand le diamètre est inférieur à 20 nm alors que la diffusion devient prépondérante pour une taille supérieure à 80 nm .

Enrobage

Enfin, l'enrobage supplémente et/ou modifie les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Pour ces expérimentations, le polyéthylène glycol (PEG) constitue l'enrobage des nanoparticules d'or, permettant d'accroître l'état de stabilité des nanoparticules. À noter que l'enrobage au PEG des nanoparticules d'or n'induit pas de cytotoxicité sur des lignées cellulaires humaines, permettant même d'améliorer la « biocompatibilité » des nanoparticules testées (Gu et al. 2009).

Stabilité en solution

La stabilité en solution des nanoparticules d'or peut être illustrée par comparaison avec celles d'argent. En effet, concernant les nanoparticules d'argent, la littérature indique que la toxicité peut être attribuée à la présence d'ions libres et de fractions sous-nanos dans le milieu en suspension (Hadrup et Lam, 2014), tous deux provenant de la surface des particules. Pour l'or, et contrairement à l'argent, plusieurs études soulignent la stabilité des nanoparticules en suspension (COBLEY et al. 2011 ; DANIEL et ASTRUC 2004 ; GARCÍA-NEGRETE et al. 2013 ; GONZALEZ et al. 2011), bien que des phénomènes d'agrégation et d'agglomération ne sont pas exclus en milieu marin (PAN et al. 2012). Par ailleurs, il existe également des données suggérant qu'il existe des effets spécifiques aux nanoparticules d'or. En effet, dans une étude comparative de l'or nanoparticulaire avec l'or ionique *in vitro*, DI GUGLIELMO et al. (2012) ont constaté que les nanoparticules d'or induisent un effet génotoxique alors qu'aucun effet est constaté avec les sels d'or, semblant indiquer que les nanoparticules d'or peuvent exercer des effets en raison de la nature physique et de la forme nanoparticulaire. Par conséquent, dans le cadre de l'évaluation écotoxicologique liée à la taille nanoparticulaire, les nanoparticules d'or constituent un modèle de choix.

Il convient maintenant de renseigner les réponses biologiques observées résultant de ces propriétés.

2.1.4 Effets nano(éco)toxicologiques recensés

Bien que, pour certains, les nanoparticules d'or ne sont pas toxiques et constituent de bons vecteurs pour les traitements ciblés chez l'Homme (GHOSH et al. 2008), d'autres études en (éco)toxicologie attestent d'impacts délétères sur les organismes exposés.

Toxicologie

Les études toxicologiques reposent essentiellement sur des expérimentations réalisées chez des rongeurs ou des lignées cellulaires, où les effets générées concernent majoritairement des expositions à court et/ou moyen termes.

CHAPITRE 2. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET BASES MÉTHODOLOGIQUES

À la suite de leur étude bibliographique, HADRUP et al. 2015 ont souligné que les nanoparticules d'or induisent *in vitro* une génotoxicité sur des cellules de mammifère, avec des cassures à l'ADN et des dommages chromosomiques. Néanmoins, les auteurs constatent que les études génotoxiques réalisées *in vivo* sur mammifères font globalement défaut (HADRUP et al. 2015). Toutefois, des cassures à l'ADN dans le cortex cérébral de rats adultes pour des nanoparticules d'or de 10 et 30 nm (70 mg L⁻¹, 24 heures ou 28 jours d'exposition) ont récemment été mises en évidence par CARDOSO et al. (2014).

In vivo, les nanoparticules d'or de 10 et 60 nm, fonctionnalisées aux PEG et administrées à 4000 µg kg⁻¹ pendant 28 jours, induisent chez les souris exposées une augmentation significative des niveaux d'alanine transaminase et d'aspartate transaminase dans le système circulant, indiquant l'apparition de dégâts hépatiques selon les auteurs (ZHANG et al. 2011). Par ailleurs, un recrutement de leucocytes est induit par les nanoparticules de 10 nm alors que celles de 5 et 30 nm engendrent une diminution des leucocytes et érythrocytes dans le système circulant (ZHANG et al. 2011). NOËL et al. (2016) ont montré une internalisation, par des cellules neutrophiles humaines, de nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre, alors que celles de 70 nm restent localisées au niveau de la membrane. Toutefois, quelque soit le diamètre des nanoparticules d'or, pour les doses les plus élevées (25, 50 et 100 µg mL⁻¹), un déclenchement de l'apoptose est mis en évidence par un mécanisme qui semble lié à l'activation de la caspase-4 (NOËL et al. 2016), connue pour son implication dans la mort cellulaire médiée par le stress du réticulum endoplasmique (HITOMI et al. 2004).

La capacité des nanoparticules d'or à franchir la barrière hémato-encéphalique a été montrée par SELA et al. (2015) à la suite d'une injection chez le rat. Il a également été montré, pour le cerveau de rats exposés, que les nanoparticules d'or sont capables de générer un stress oxydant, d'altérer l'activité de la glutathion-peroxydase, de diminuer significativement les concentrations des neurotransmetteurs, telles que la dopamine et la sérotonine, et d'augmenter les niveaux de caspase-3 et de protéine de choc thermique 70 (SIDDIQI et al. 2012).

D'autres part, la reprotoxicité des nanoparticules d'or n'est pas exclue,

2.1. NANOPARTICULES D'OR COMME CONTAMINANT MODÈLE

en raison de leurs modulations de la production d'œstrogènes (STELZER et HURTZ 2009) et de leurs capacités à immobiliser de manières significatives des spermatozoïdes (WIWANITKIT et al. 2009).

Écotoxicologie

La génération d'un stress oxydant, évaluée *via* des biomarqueurs (catalase, ubiquitination, carbonylation), a été mise en évidence chez des moules exposées aux nanoparticules d'or fonctionnalisées au citrate (13 nm, 750 µg Au L⁻¹) (TEDESCO et al. 2008). Toujours pour le milieu marin, à la suite d'une exposition de 16 jours à différentes tailles de nanoparticules d'or, il a également été montré la génération d'un stress oxydant avec l'induction de métallothionéines (5 et 40 nm), l'augmentation des activités de la catalase (15 et 40 nm) et de la superoxyde dismutase (40 nm), ainsi que de la glutathione S-transferase (5, 15 et 40 nm) chez le bivalve *Scrobicularia plana* (PAN et al. 2012). Néanmoins, pour cette expérience, les auteurs soulignent le fait que le milieu salin provoque l'agrégation et l'agglomération des nanoparticules devenant de tailles supérieures à 700 nm, mais n'empêchant pas pour autant l'accumulation de l'or dans les tissus des organismes exposés (PAN et al. 2012).

L'exposition par voie trophique à partir de nourriture enrichie, réalisée par GEFFROY et al. (2012), induit un impact sur l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, les processus de détoxification et d'apoptose, le métabolisme mitochondriale et le stress oxydant chez le poisson zèbre. Des effets similaires, avec une altération de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau, sont observés chez des poissons zèbres exposés aux nanoparticules d'or *via* un sédiment enrichi (DEDEH et al. 2014), sans pour autant ici être à même de discerner l'exposition direct de l'exposition trophique.

Toutefois, la fonctionnalisation, et notamment la charge, constituent également un facteur déterminant pour l'interaction entre les nanoparticules d'or et les organismes exposés. Ainsi, la littérature semble montrer que les nanoparticules d'or chargées positivement interagissent et sont à même de générer une toxicité (BAUDRIMONT et al. 2017 ; LOVERN et al. 2008 ; RENAULT et al. 2008 ; SCHAEUBLIN et al. 2011). Alors que, pour celles fonctionnalisées avec des groupements neutres ou négativement chargés, la

toxicité ne fait pas évidence (GILROY et al. 2014; GOODMAN et al. 2004; HARPER et al. 2008; VERMA et STELLACCI 2010). Mais le propos nécessite d'être nuancé en raison de résultats divergents pour des particules *a priori* relativement identiques (GOODMAN et al. 2004; SCHAEUBLIN et al. 2011).

Enfin, certaines études se sont intéressées à l'impact des nanoparticules d'or sur le comportement des organismes exposés. LOVERN et al. (2008) et LI et al. (2010) ont montré une altération du comportement natatoire des daphnies exposées aux nanoparticules d'or par l'eau, alors que par voie trophique GILROY et al. (2014) n'ont pas noté de changements comportementales. La capacité d'altération du comportement par l'exposition aux nanoparticules d'or semble donc espèce dépendante.

Abstraction faite du mode d'exposition et des doses utilisées, au regard de la littérature, les nanoparticules d'or sont en mesure d'induire une toxicité chez les organismes exposés. Il reste à déterminer les modalités d'internalisation des nanoparticules.

2.2 Expositions trophiques

2.2.1 Une voie majeure aux connaissances lacunaires

La littérature actuelle portant sur le transfert trophique des nanomatériaux dans les écosystèmes demeurent très largement incomplète et, selon des suggestions récentes, doit constituer une direction majeure pour les futures recherches (ANSES 2014; TANGAA et al. 2016). Le transfert trophique des nanomatériaux manufacturés métalliques dans les écosystèmes aquatiques est, par ailleurs, identifié comme un sujet de préoccupation, avec moins de vingt études publiées (TANGAA et al. 2016).

Alors qu'elles sont considérées comme étant « biocompatibles », et qu'elles rassurent en raison des recherches dont elles font l'objet en médecine, les nanoparticules et nanotiges d'or se sont avérées transférables aux compartiments biotiques (DEDEH et al. 2014; FERRY et al. 2009; GLENN et al. 2012).

La table 2.1 synthétise les modalités d'exposition pour les études ayant considérés le transfert trophique des nanoparticules d'or.

2.2. EXPOSITIONS TROPHIQUES

TABLE 2.1 – Récapitulatif des expérimentations conduites en écotoxicologie pour l'étude du transfert trophique des nanoparticules d'or.

	Organismes	Enrobage(s)	Forme et taille des particules	Durée(s) d'exposition	Concentration(s) d'exposition
<i>Aquatique</i>					
Baudrimont et al (2017)	Biofilm naturel → Gammare	PEG-amine	Sphérique – 10 nm	48 h et 7 jours	4,6 et 46 mg L ⁻¹
Geitner et al (2016)	Algues → Daphnie	Citrate ou HA ou PHA	-	6 h et 24 h	1 mg L ⁻¹
Gilroy et al (2014)	Algues → Daphnie	Citrate	Sphérique – 17 nm	5 jours	880 µg L ⁻¹
Larguinho et al (2014)	Algues → Moule	Citrate ou PEG	Variable	24 h et 24 h	23,6 mg L ⁻¹
Lee et al (2015)	2 espèces d'algue → Daphnie	Citrate	Sphérique – 10 nm	48 h et 24 h	510 µg L ⁻¹
Renault et al (2008)	Algues → Palourde asiatique	PEG-amine	Sphérique – 10 nm	24 h et 7 jours	4,6 et 46 mg L ⁻¹
<i>Terrestre</i>					
Judy et al (2011)	Tabac → Chenille	-	Sphérique – 5, 10 et 15 nm	7 jours	100 mg L ⁻¹
Unrine et al (2012)	Vers → Grenouille	Citrate	Sphérique – 12 nm	60 et 15 jours	200 mg kg ⁻¹ DW

Les quelques études trophiques des nanoparticules d'or, en système aquatique, ont utilisé essentiellement des organismes invertébrés, tels que les daphnies (GEITNER et al. 2016; GILROY et al. 2014; LEE et al. 2015), gammares (BAUDRIMONT et al. 2017), ou encore bivalves (LARGUINHO et al. 2014; RENAULT et al. 2008). Le constat demeure le même au regard des rares études sur les réseaux terrestres, avec l'utilisation du vers *Eisenia fetida* (UNRINE et al. 2012) ou de chenilles (JUDY et al. 2011).

Enfin, à ce jour, seulement deux études considèrent le transfert trophique de nanoparticules pour une chaîne alimentaire à trois maillons (CEDERVALL et al. 2012; CHAE et al. 2016), aucune ne se focalisant sur les nanoparticules d'or.

Ainsi, ce travail a pour objectif d'augmenter les connaissances sur les transferts trophiques des nanoparticules d'or et de renseigner les effets associés. La reconstitution de plusieurs chaînes trophiques à deux et trois niveaux, impliquant différents modèles biologiques, a été engagée (figure 2.3).

2.2.2 Sélections biologiques

Une brève description des organismes biologiques, ainsi que l'intérêt qu'ils représentent dans le cadre de ce travail, sont détaillés ci-après.

CHAPITRE 2. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET BASES MÉTHODOLOGIQUES

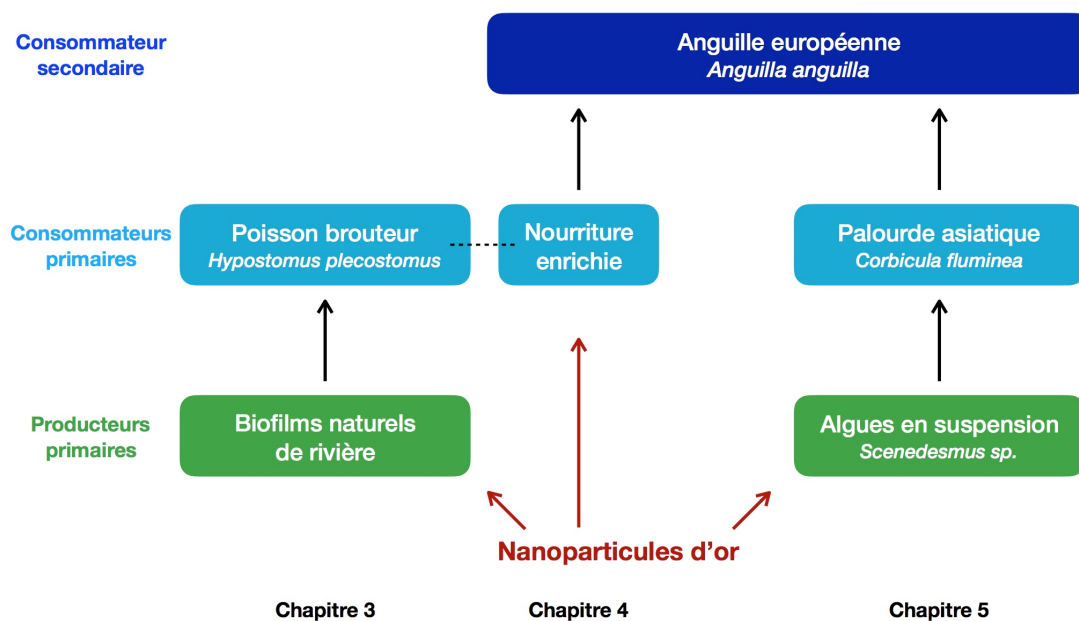


FIGURE 2.3 – Représentation schématisée des différentes chaînes trophiques réalisées dans le cadre de ce travail.

Chlorophytes, *Scenedesmus sp.*

Avec une position à la base des réseaux trophiques, les chlorophytes constituent un embranchement d'importance écologique contribuant à la production primaire des écosystèmes. Par ailleurs, les chlorophytes se distribuent à toutes les latitudes et représentent une part importante du phytoplancton (CADÉE et HEGEMAN 1974 ; LÜRLING 2003 ; PHINYO et al. 2017).

Algues unicellulaires largement utilisées pour nourrir les organismes suspensivores lors des expérimentations en eaux douces, les chlorophytes *Scenedesmus sp.* constituent un genre de choix. Ces algues se multiplient rapidement, par reproduction asexuée, permettant ainsi la mise en œuvre d'expérimentations nécessitant de grande quantité de producteurs primaires, *i.e.* expositions chroniques et études des voies trophiques, *etc.*

Ce genre a déjà fait l'objet d'études en termes de toxicité des nanoparti-

2.2. EXPOSITIONS TROPHIQUES

cules (CARDINALE et al. 2012; GARCÍA-CAMBERO et al. 2013; LI et al. 2016b; SADIQ et al. 2011), et s'avère sorber les nanoparticules à fortes doses dans le cadre d'exposition trophique (RENAULT et al. 2008).

Biofilm naturel

À l'état naturel, les microorganismes peuvent se structurer en agrégats plurispécifiques adhérant à un substrat, pour former ce qui est communément nommé « biofilm ».

Pour la majorité des biofilms, les microorganismes représentent moins de 10% en masse sèche, alors que la matrice, matériau extracellulaire, comble le reste (FLEMMING et WINGENDER 2010). Cette matrice, principalement produite par les organismes eux-mêmes, consiste en un conglomérat de biopolymères, d'où l'attribution du terme de « substances polymères extracellulaires » (EPS). L'assemblage de ces polymères forme l'échafaudage pour l'architecture tridimensionnelle du biofilm, contribue à son adhésion aux substrats et à la cohésion entre les organismes, incluant la communication entre cellules, le tout formant un microconsortium (FLEMMING et WINGENDER 2010). Toutefois, cette matrice, de composition évolutive dans le temps (WHITFIELD et al. 2015), inclut une très large gamme de biopolymères et de constituants de toutes natures, qui demeurent très difficiles à analyser, d'où l'appellation justifiée de « the dark matter of biofilms » (FLEMMING 2016).

Parmi les propriétés structurales et fonctionnelles, la matrice semble jouer un rôle majeur dans la sorption passive des ressources, comme les éléments nutritifs ou autres gaz, associés au substrat, ou plus largement, à l'environnement dans lequel le biofilm se développe (FLEMMING et al. 2016). Les sites de liaison comprennent à la fois des échangeurs anioniques et cationiques. Par conséquent, une très large gamme de substances peut être piégée et accumulée dans le biofilm, et ce même si les composés sont présents à des concentrations très faibles (FLEMMING et al. 2016). Cette puissante capacité de sorption permet d'ailleurs aux biofilms de se développer dans des environnements oligotrophes (BATTIN et al. 2016).

Seulement, la sorption par le biofilm n'est pas spécifique à un composé, ce qui signifie que non seulement les éléments nutritifs, mais aussi les sub-

stances toxiques, peuvent s'accumuler dans les biofilms, et des composés tels que l'érythromycine éthylsuccinate, l'acétaminophène (MÉTIVIER et al. 2013), des acides pharmaceutiques (DOBOR et al. 2012), les hormones stéroïdiennes et les composés nonylphénols (WRITER et al. 2011) ont été retrouvés dans des biofilms. De même, des substances non polaires, comme le benzène, le toluène et le xylène, peuvent s'accumuler dans la matrice EPS, même si elle est hautement hydrophile et ne possède pas de sites lipophiles évidents (SPÄTH et al. 1998). Par conséquent, les biofilms peuvent constituer un puits et une source de contaminants (FLEMMING et al. 2016). Or, avec une position à la base des réseaux trophiques, les biofilms sont une source d'énergie pour les organismes, et de fait, représentent une voie d'entrée pour les contaminants dans les chaînes alimentaires.

Concernant plus spécifiquement le cas des nanomatériaux aurifères, FERRY et al. (2009) ont montré que les nanotiges d'or, initialement présentes dans la colonne d'eau de mésocosmes, s'accumulent de manière importante dans les biofilms, avec 61% de la dose introduite. Enfin, à de fortes doses d'expositions des biofilms (jusqu'à 46,5 mg Au L⁻¹), un transfert d'or est avéré pour le gammare pendant 7 jours d'exposition (BAUDRIMONT et al. 2017).

Par conséquent, les biofilms apparaissent d'un intérêt particulier pour l'étude du transfert trophique des nanoparticules en raison de (1) leur capacité de sorption et de (2) leur position à la base des chaînes alimentaires.

Bivalve suspensivore, *Corbicula fluminea*

Espèce invasive des écosystèmes aquatiques européens, la palourde asiatique *Corbicula fluminea* est connue de longue date pour les études en écotoxicologie (BAUDRIMONT et al. 1997; TRAN et al. 2002). D'une écologie benthique, et en échange permanent avec la colonne d'eau pour la filtration et la prise alimentaire, cette espèce constitue un bon indicateur de la contamination métallique des milieux naturels, tout en étant relativement facilement maintenue en conditions de laboratoire.

Pour la littérature associée aux nanoparticules d'or, FERRY et al. (2009) montrent que les palourdes sont susceptibles de concentrer des quantités importantes d'or, constituant la seconde espèce du biote en termes d'accu-

2.2. EXPOSITIONS TROPHIQUES

mulation, avec quasiment 6% de l'or initialement introduite dans le mésocosme. La voie trophique est une source de contamination pouvant engendrer une toxicité chez *Corbicula fluminea* à des doses relativement élevées (RENAULT et al. 2008). Pour le milieu marin, d'autres bivalves (*Scrobicularia plana* et *Mytilus edulis*) montrent une toxicité des nanoparticules d'or (PAN et al. 2012; TEDESCO et al. 2008; TEDESCO et al. 2010a,b).

En outre, *Corbicula fluminea* a été choisi pour réaliser la chaîne trophique à trois maillons du fait que nos pré-tests ont montré que les anguilles (maillon trophique supérieur) les consomment sans réticence, et qu'il est par ailleurs nécessaire de « produire » une quantité importante d'organismes en maillon intermédiaire contaminés naturellement (cf. CHAPITRE 5).

Poisson benthique, *Hypostomus plecostomus*

Poisson benthique des eaux douces chaudes, le pléco *Hypostomus plecostomus* est un grand consommateur de périphyton. Sa bouche, en position ventrale et en forme de ventouse, qui lui vaut d'ailleurs le nom de « sucker-mouth catfish » en anglais, permet son accroche aux substrats et favorise une activité de broutage des biofilms (LUJAN et ARMBRUSTER 2012). De petite taille, il s'adapte aux conditions d'élevage en conditions contrôlées de laboratoire. Son régime alimentaire en fait un modèle de choix pour les études de transfert entre un vertébré et le biofilm.

À ce jour, cette espèce ne fait l'objet d'aucune expérimentation concernant l'étude du transfert, par voie directe ou trophique, et de la toxicité des nanoparticules. Des pré-tests, réalisés au laboratoire, ont néanmoins montré que ce modèle biologique présente un intérêt certain dans le cas de l'étude trophique à partir des biofilms (communications personnelles).

Alors que les expérimentations de transfert, et de toxicités associées, se focalisent essentiellement sur des organismes invertébrés (BAUDRIMONT et al. 2017; FERRY et al. 2009; GEITNER et al. 2016; GILROY et al. 2014; LARGUINHO et al. 2014; LEE et al. 2015; RENAULT et al. 2008), ce poisson benthique permet d'étudier le cas d'un vertébré comme second maillon trophique, dans le cas d'un transfert « naturel » initié par des biofilms.

L'anguille européenne *Anguilla anguilla*

En raison d'un cycle de vie atypique et intercontinental, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) occupe une vaste étendue géographique, et se distribue tout au long des côtes adjacentes à l'océan Atlantique, allant de l'Island au nord-ouest de l'Afrique (AVISE 2003; BERTIN 1951). Ce poisson catadrome se caractérise par deux phases de migration transatlantique, deux métamorphoses et une reproduction unique, qui achève son existence sémelpare, en Mer des Sargasses.

Un cycle de vie complexe

Portée par les courants marins de l'Atlantique, la larve leptocephale dérive jusqu'aux côtes européennes, pour une durée de migration évaluée à plus d'une vingtaine de mois (BONHOMMEAU et al. 2009; BONHOMMEAU et al. 2010; WANG et TZENG 2000).

Une première métamorphose opère, conduisant au stade civelle, siège de changements morphologiques et physiologiques importants (TESCH 2003). La civelle, transparente, est de taille plus petite que la larve, les dents régressent, l'appareil digestif moins différencié, et ne se nourrit plus à ce stade (TESCH 2003). La civelle atteint les eaux douces, à l'amont des estuaires, et adopte une nage active à contre-courant, afin de poursuivre sa remonté des cours d'eau. Progressivement, la civelle se pigmente en noir au niveau dorsal, puis en jaune au niveau ventral (DURIF 2003), qualifiée alors d'anguillette. L'anguillette se sédentarise en adoptant un mode de vie benthique, nocturne et solitaire, prémices du stade anguille jaune. C'est au stade jaune que l'anguille constitue d'importantes réserves lipidiques en vue de la migration de reproduction (TESCH 2003). Cette phase de croissance somatique s'accompagne d'une activité de prédation intense, pour un régime alimentaire essentiellement constitué de crustacés, de mollusques bivalves, de larves ou encore de poissons (TESCH 2003). À noter qu'à ce stade de développement, les anguilles sont immatures et difficilement différenciables sexuellement.

La croissance s'achève par une seconde métamorphose, poétiquement nommée « l'argenture ». L'anguille se revêt, en face dorsale, d'un noir sombre, et d'un blanc aux reflets argentés en face ventrale, la peau s'épaissit, le dia-

2.2. EXPOSITIONS TROPHIQUES

mètre des yeux s'accroît en parallèle du développement des cellules en bâtonnet, les nageoires pectorales s'allongent (TESCH 2003). L'arrêt de prise alimentaire, la régression progressive du tractus digestif et la fermeture de l'anus témoigne de la fin de l'argenture (DURIF 2003).

La seconde, et dernière, migration commence, en groupe pour une période très courte, probablement déclenchée par des facteurs environnementaux, tels que le cycle lunaire ou la pluviométrie (TESCH 2003). Les anguilles dévalent les cours d'eau, en direction de la Mer des Sargasses, pour se reproduire. La maturation de l'appareil sexuel intervient pendant la migration sous les effets supposés de la forte pression résultant d'une nage en profondeur (SÉBERT 2003), et de l'exercice natatoire (GINNEKEN et MAES 2005). Chaque individu épuise ses réserves lipidiques au cours de cette migration transatlantique, et une fois reproduite, l'anguille meurt.

Une espèce d'intérêt pour l'étude des contaminants

Depuis maintenant plus de trois décennies, les populations d'anguilles européennes subissent un dramatique déclin, en témoigne leur statut de conservation répertorié comme étant « en danger critique d'extinction ». Bien que la pêche excessive constitue probablement une cause majeure de ce déclin, cette situation semble être la résultante de différents facteurs, dont la pollution (FEUNTEUN 2002). GEERAERTS et BELPAIRE (2010) soulignent la sensibilité des anguilles aux contaminants, et leurs tendances à la bioaccumulation, en raison des spécificités écologiques et physiologiques de cette espèce (*i.e.* longue phase de croissance, régime carnivore et prédateur haut de chaîne, *etc.*). De nombreuses études attestent des niveaux de contaminations variés pour des anguilles, échantillonnées sur différents sites et pour une grande diversité de substances (BAILLON et al. 2015; BELPAIRE et GOEMANS 2007; MAES et al. 2008; PIERRON et al. 2007, 2008).

Carnivore et prédateur haut de chaîne durant le stade jaune, l'anguille constitue une espèce d'intérêt, au regard de l'étude du transfert trophique des contaminants. Alors que cette espèce a fait l'objet de plusieurs études, sur les métaux ou autres contaminants organiques (BAILLON et al. 2015; GEERAERTS et BELPAIRE 2010; PIERRON et al. 2008), aucune ne porte, à ce jour, sur le transfert et l'impact des nanoparticules. Par ailleurs, cette

espèce s'est révélée être un bon bioindicateur pour ce qui concerne les contaminants (BELPAIRE et GOEMANS 2007; BELPAIRE et al. 2008; BOER et al. 1994), sans pour autant constituer le « rat de laboratoire » par excellence. Enfin, la colonisation d'une large gamme de milieux, au cours de son cycle de vie, est susceptible de maximiser la diversité des expositions aux contaminants, et donc de fait, engendrer un éventuel contact avec des nanoparticules.

Les anguilles ont été prélevées par un pêcheur agréé au niveau du domaine de Certes (Bassin d'Arcachon), qui constitue un site peu contaminé au regard des précédentes études (BAILLON et al. 2015). Par ailleurs, ce site, géographiquement proche du laboratoire, permet une manipulation minimale de nos anguilles, qui sont acclimatées à la domestication pendant 1 mois, préalablement aux expériences.

2.2.3 Des expérimentations conduites à doses relativement faibles

La plupart des études conduites sur les nanoparticules relèvent de fortes concentrations. Citons pour exemple, l'étude du transfert trophique de nanoparticules d'or de LARGUINHO et al. (2014) dont la concentration d'exposition des algues *Dunaliella salina* était de 23,6 mg Au L⁻¹.

Pour ces expérimentations trophiques, l'exposition des maillons inférieurs (*i.e.* producteurs primaires) est réalisée à des doses relativement faibles. La valeur de référence pour baser les doses d'exposition est établie à partir de la concentration létale 50% (CL₅₀) pour des algues *Scenedemus* (RENAULT et al. 2008) et pour des nanoparticules d'or enrobées au PEG, sphériques et de 10 nm. La CL₅₀ à 24 heures d'exposition est de 48 mg Au L⁻¹. Par ailleurs, toujours pour les mêmes nanoparticules, BAUDRIMONT et al. (2017) ont utilisé deux concentrations d'exposition pour les biofilms, 4,6 et 46 mg Au L⁻¹.

Pour ce travail, les biofilms naturels ont été exposés à 480 µg Au L⁻¹ et 4,8 mg Au L⁻¹ soit des doses, respectivement, 100 et 10 fois inférieures à la CL₅₀ de RENAUULT et al. (2008). Pour les algues *Scenedemus sp.*, qui constituent le premier niveau de la chaîne trophique à trois maillons, la

concentration dans l'eau pour la condition exposée est de $480 \mu\text{g Au L}^{-1}$, soit 100 fois inférieure à la CL_{50} .

2.2.4 Mise en œuvre expérimentale

Ce paragraphe présente succinctement les modalités d'exposition et de réalisation des expérimentations, le détail plus approfondi des protocoles se trouve dans la section « *materials and methods* » des articles correspondants.

Du biofilm au poisson brouteur

Cette expérimentation fait l'objet du CHAPITRE 3 et consiste en l'exposition pendant 21 jours, de poissons *Hypostomus plecostomus* à des biofilms naturels préalablement contaminés aux nanoparticules d'or.

Les biofilms naturels ont été obtenus par une colonisation passive de lames de verre fixées à un dispositif de cages immergées d'octobre 2014 à janvier 2015 dans l'Isle (figure 2.4, A à C), un des affluents de la Dordogne ($44^{\circ}50'16''\text{N}$, $00^{\circ}34'46''\text{W}$, France).

Suite à ces 4 mois de colonisation, les cages sont rapportées au laboratoire et les lames retirées de celles-ci (figure 2.4, D), puis rangées dans un dispositif évitant le contact entre chacune d'entre-elles. Les lames sont stockées à l'obscurité, à 4°C , dans le l'eau de la rivière Isle, prélevée lors de la collecte des cages. L'expérience débute immédiatement, les lames utilisées pour nourrir les poissons brouteurs sont retirées de ce dispositif au fur et à mesure.

La contamination des biofilms s'effectue durant les 48 heures précédant l'exposition trophique des poissons. Chaque lame est placée dans 50 mL de solution de nanoparticules d'or, et dont l'ensemble est placé sous une rotation lente et continue (figure 2.4, E).

À la fin des 48 heures, les lames de biofilms fraîchement contaminées sont données à brouter aux poissons individuellement séparés (figure 2.4, F), à raison d'une lame par poisson et par jour, et ce pendant 21 jours. À la fin de l'exposition, les poissons sont sacrifiés.

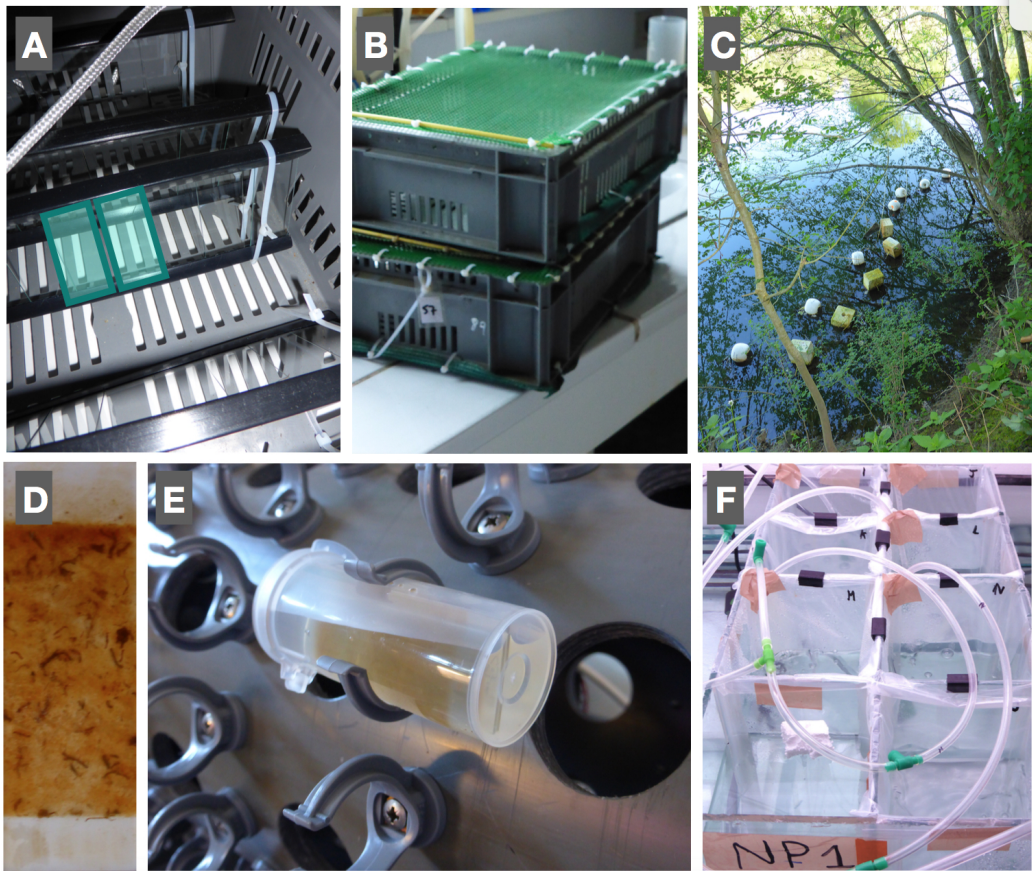


FIGURE 2.4 – Photographies des différentes étapes de l’expérimentation biofilm naturel - poissons brouteurs. (A et B) Préparation du dispositif de caging, avec l’enchâssement de lames de verre (rectangles bleus). (C) Immersion des cages dans la rivière l’Isle. (D) Lame de verre colonisée par du biofilm naturel de rivière (marron). (E) Contamination individuelle des lames de biofilm sous rotation. (F) Exposition individualisée des poissons brouteurs.

Exposition trophique par nourriture enrichie pour l’anguille

Cette expérimentation s’intéresse davantage à la toxicité des nanoparticules d’or, dans le cadre d’un transfert trophique à partir de nourriture enrichie, dont le détail se trouve dans le CHAPITRE 4.

2.2. EXPOSITIONS TROPHIQUES

Des filets de muscle de vives (famille des Trachinidae), pêchées à proximité du Bassin d’Arcachon ont été levés et broyés. La chair est ensuite contaminée artificiellement aux nanoparticules d’or et disposée dans des moules, afin de standardiser des portions individuelles pour chaque anguille. Les préparations sont congelées à -20°C . Tous les deux jours, les anguilles individuellement séparées reçoivent une portion standardisée (figure 2.5). La nourriture est donnée le soir. Le lendemain matin, les éventuels restes de nourriture sont récupérés et pesés afin d’évaluer la prise alimentaire de chaque anguille.

Par ailleurs, les bacs d’expositions des anguilles sont alimentés par un circuit ouvert afin d’éviter un enrichissement en or de l’eau. L’exposition dure 21 jours et les poissons sont sacrifiés à la fin de celle-ci.

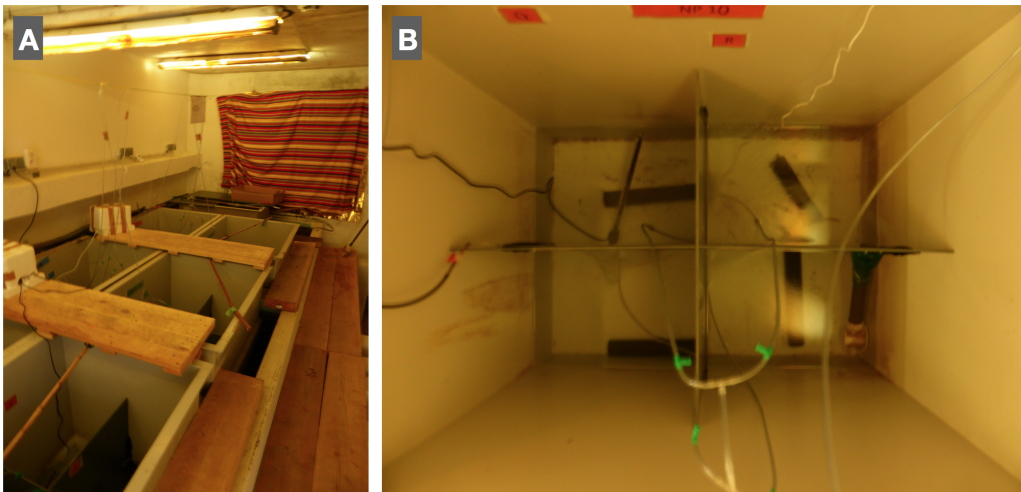


FIGURE 2.5 – Photographies du dispositif expérimental pour l’expérimentation trophique des anguilles à partir de nourriture enrichie. (A) Ensemble du dispositif. (B) Bac subdivisé en 4 compartiments permettant une individualisation physique des anguilles. Une cache est placée dans chaque compartiment.

Chaîne alimentaire « naturelle » à 3 maillons trophiques

Cette expérimentation a été incontestablement la plus difficile à mettre en place.

Ajustement de la chaîne alimentaire

Initialement, et pour être en conformité avec le projet ANR dans lequel s'inscrit cette thèse, la chaîne trophique à trois maillons continus devait comporter : biofilms naturels - poisson brouteur (*Hypostomus plecostomus*) - anguille européenne (*Anguilla anguilla*).

La première expérimentation réalisée atteste de la faisabilité du bas de la chaîne trophique, à savoir biofilms - poisson brouteur. Avant d'entreprendre l'expérimentation avec les trois maillons continus, des tests ont été réalisés afin de s'assurer que les anguilles consomment le poisson brouteur. En vain, ces tests ont été répétés ou agrémentés par des modifications, notamment tenter d'« améliorer » la nourriture pour essayer d'augmenter l'appétence.

D'autres tentatives infructueuses ont exploré les pistes des crustacés (gammare), des gastéropodes pulmonés (limnées, neritina, planorbe, ampulnaire).

À la suite de ces nombreux essais, la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*) s'est avérée être la solution. Mais par conséquent, les biofilms naturels ne pouvaient plus constituer le premier maillon de la chaîne trophique, d'où le fait qu'ils aient été remplacés par des algues en suspension.

Finalement, le *continuum* algues - corbicules - anguilles est donc la seule chaîne alimentaire réalisable pour cette expérience d'envergure.

Réalisation de la chaîne alimentaire

L'expérience est réalisée en deux phases, une contamination des corbicules par les algues (figure 2.6, A et B), puis dans un second temps, le haut de la chaîne avec le nourrissage des anguilles avec les corbicules préalablement contaminés (figure 2.6, C).

Un dispositif d'apport en continu et à circuit ouvert a été mis en place pour exposer les corbicules (figure 2.7) afin d'assurer un renouvellement

2.3. ANALYSES ET TRAITEMENT DES DONNÉES

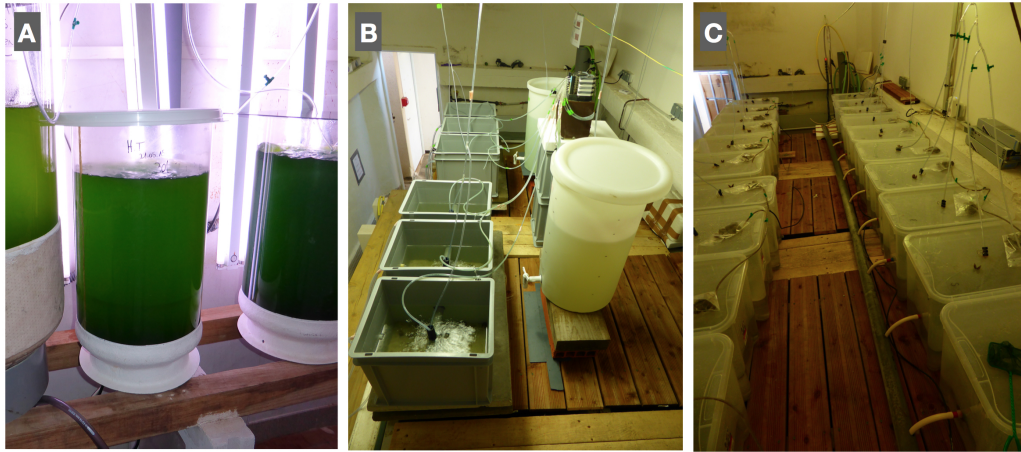


FIGURE 2.6 – Photographies des différentes étapes de l'expérimentation à trois maillons trophiques. (A) Cultures des algues *Scenedesmus* sp. (B) Réserves d'algues (à droite) alimentant les bacs d'exposition des bivalves (à gauche). (C) Exposition trophique et individualisée des anguilles dans un dispositif en circuit ouvert.

régulier du milieu, limitant la dégradation physico-chimique de celui-ci, tout en assurant la constance de la pression de contamination.

Par ailleurs, l'eau des bacs expérimentaux est aérée par un système d'airlifts, assurant une homogénéisation par mouvement de convection du milieu d'exposition des corbicules. À la fin de la phase d'exposition, les corbicules sont prélevés et congelés coquille entre-ouverte.

Dans un second temps, les anguilles sont placées individuellement dans des bacs en circuit ouvert. Pendant 21 jours, les anguilles reçoivent un corbicule préalablement contaminé. La nourriture est donnée le soir. Le lendemain matin, les coquilles de corbicule sont retirées. À la fin de l'exposition les anguilles sont sacrifiées.

2.3 Analyses et traitement des données

Dans un premier temps, ce travail s'est focalisé sur la mesure des transferts entre les différents constituants des chaînes trophiques expérimentales. La distribution et la caractérisation des nanoparticules d'or a été

CHAPITRE 2. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET BASES MÉTHODOLOGIQUES

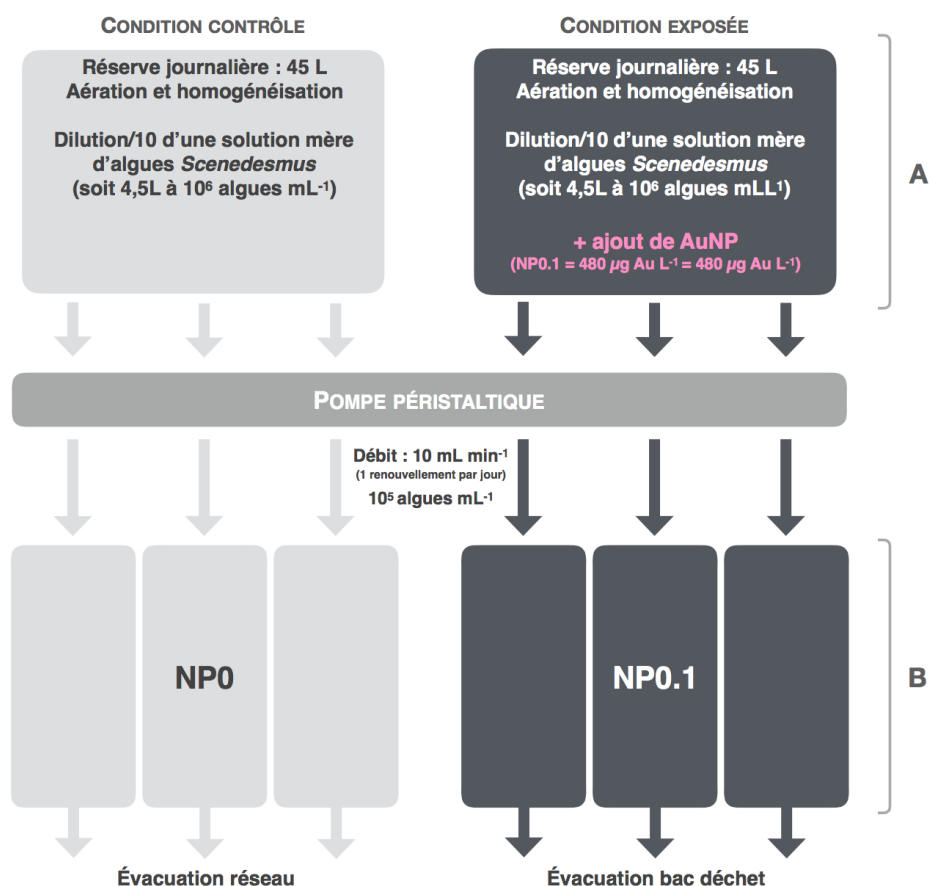


FIGURE 2.7 – Schéma du dispositif pour la phase d'exposition algues - corbicules. (A) Préparation journalière d'une réserve de 45L contenant des algues *Scenedesmus* sp. à 10^5 cellules mL^{-1} et des nanoparticules d'or pour la condition exposée. (B) Bacs de 15L contenant 500 bivalves et un substrat sableux, le milieu est également placé sous aération et homogénéisation, et renouvelé de manière journalière.

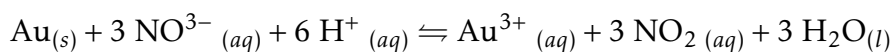
entreprise.

Cette section précise la raison d'être des outils méthodologiques employés pour les expérimentations. Le détail des différents protocoles est explicité dans le paragraphe « *materials and methods* » des articles correspondants.

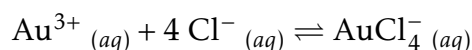
2.3.1 Bioaccumulation

La bioaccumulation des nanoparticules d'or, évaluée par la quantification de l'or dans les tissus d'intérêt, permet de (1) statuer sur l'organotropisme à l'instant t du prélèvement et de, (2) renseigner d'un éventuel transfert trophique. Le protocole d'analyse permet de mesurer l'ensemble des différentes formes de l'or dans les différentes matrices.

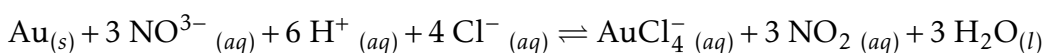
Les échantillons sont préparés comme classiquement dans le cadre du dosage des métaux (*i.e.* chauffage). À noter que, s'agissant d'or, les digestions acides sont réalisées à l'eau régale (mélange 3 pour 1 en volume d'acide chlorhydrique HCl et d'acide nitrique HNO₃, respectivement). La dissolution de l'or, nécessaire pour l'analyse, est rendu possible par l'ensemble des espèces chimiques générées par l'eau régale. En effet, l'acide nitrique est un puissant oxydant, mais ne permet pas à lui seul l'oxydation de l'or :



Il s'agit d'un équilibre de réaction, déplacé à l'inverse de la formation de l'ion aurique. Les ions chlorures, apporté par l'acide chlorhydrique, vont déplacer l'équilibre en raison de la formation d'anions chloraurates (AuCl₄⁻) :



Au final, la réaction d'oxydation de l'or pour les digestions acides est donc :



Le protocole thermique du spectromètre d'absorption atomique à four graphite (240ZAA spectrometer, Agilent Technologies) a été établi selon MEDVED et al. (2006) et SHAMSIPUR et RAMEZANI (2008).

2.3.2 Observations histologiques

Des observations histologiques en microscopie électronique à transmission (MET) ont été initiées pour (1) rendre compte des lésions tissulaires engendrées par l'exposition trophique aux nanoparticules et pour

(2) rendre compte de la localisation subcellulaire des nanoparticules par une approche EDX (Energy Dispersive X-ray).

La préparation des échantillons est réalisée comme classiquement s'agissant d'une fixation chimique des tissus. Brièvement, à la suite des dissections, les tissus sont incubés dans une solution de glutaraldéhyde, puis post-fixés au tétroxyde d'osmium (OsO_4). L'eau est ensuite substituée des échantillons par une suite de bain en solutions croissantes d'éthanol. Enfin, l'inclusion des échantillons s'effectue en résine (araldite). Des sections semi- et ultra-fines (1,5 et 0,05 μm , respectivement) sont réalisées à l'ultramicrotome muni d'un couteau en diamant. Les coupes semi-fines sont colorées au bleu AZUR II de méthylène afin d'être observées en microscopie optique pour valider la préparation des échantillons et cibler les zones d'intérêts. Les coupes ultra-fines sont déposées sur grilles Formvar[®] carbone. Les observations histologiques sont effectuées en microscopie électronique à transmission (TEM, Technai 12, Philips) en collaboration avec le Bordeaux Imaging Center (BIC).

Dans un second temps, et de manière complémentaire aux dosages d'or, une approche EDX a été initiée afin d'entreprendre des microanalyses chimiques élémentaires de manière localisée sur les coupes, ayant pour objectif de confirmer la présence d'or sous forme nanoparticulaire dans les tissus.

Des pré-tests ont été réalisés à partir des coupes préparées comme susmentionné. Or, bien que des spots denses aux électrons, de formes sphériques, et d'une taille de l'ordre de la dizaine de nanomètre, ont été observés dans des organes dont l'accumulation d'or était significative, les analyses EDX n'ont pas permis de confirmer la présence d'or de manière localisée. L'ajout d'osmium durant la fixation des échantillons s'apparentait être une possible explication pour justifier l'absence de signal aurifère. En effet, l'osmium (numéro atomique 76) est proche de l'or (numéro atomique 79) sur la table périodique de Mendeleïev. Ainsi, des interférences dans le signal, qui renseigne des couches électroniques, peuvent être suspectées.

Par conséquent, un second lot de blocs, dont la préparation est identique à l'exception de l'osmium, a été systématiquement réalisé. Seulement les analyses EDX, à partir des préparations sans osmium, ne sont pas avérées plus concluantes.

2.3. ANALYSES ET TRAITEMENT DES DONNÉES

Un simple dépôt de nanoparticules d'or sur grille génère un signal, attesté par la présence sur le spectre des trois pics d'or, correspondant aux couches K, L et M (figure 2.8). Cette analyse de dépôt atteste de la possibi-

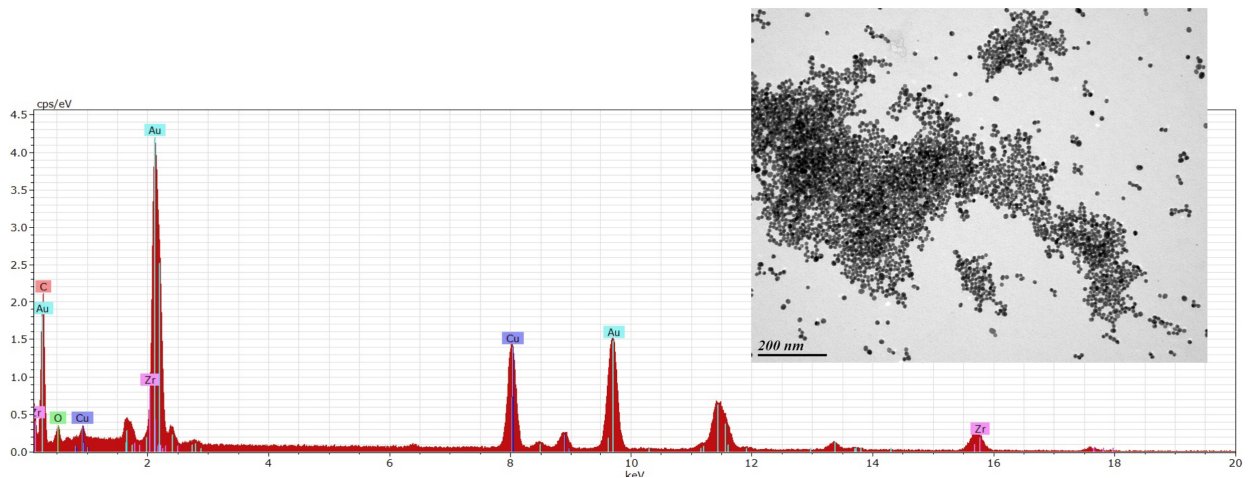


FIGURE 2.8 – Spectre EDX correspondant à un dépôt de nanoparticules d'or. La photographie en MET renseigne de la zone ciblée par le faisceau. Les trois pics d'or sont spécifiés par un rectangle turquoise en leurs sommets.

lité de réaliser une analyse élémentaire localisée. Toutefois, une telle densité de nanoparticules n'est pas retrouvée dans un échantillon biologique, ce qui pose la question des limites de détection pour ce type d'analyse, comme suggéré par DE JONG et al. (2010) dans le cas des nanoparticules isolées. Par ailleurs, ce simple dépôt exclu de fait toutes les interférences chimiques potentiellement générées pendant la fixation chimique des tissus. Par conséquent, malgré de nombreux essais, aucune analyse EDX s'est avérée fructueuse à partir des échantillons biologiques.

2.3.3 Séquençage de l'ARN à haut-débit, une analyse d'impacts sans *a priori*

La puissance et l'originalité de cette approche de séquençage haut-débit du transcriptome repose sur l'exploration de la totalité de l'expression génique à un instant *t*. Il s'agit donc d'une analyse sans *a priori*. Ainsi, alors que les « biomarqueurs » présentent un potentiel routinier en (éco)toxicologie, le séquençage s'affranchit des choix préconçus et constitue un outil remarquable pour l'étude des effets biologiques des contaminants émergents.

Le séquençage des ARNm a été réalisé avec l'utilisation de la technologie Illumina HiSeq3000, en collaboration avec la plateforme génomique de la Génomole de Toulouse/Midi-Pyrénées (INRA, Auzeville, France).

Principe analytique

Les ARN totaux sont extraits des tissus d'intérêt et envoyés par carbo-glace à la plateforme de collaboration pour la suite des préparations et des analyses.

Après avoir vérifié la qualité des échantillons, les ARN totaux sont purifiés pour extraire les ARNm qui sont ensuite convertis en ADNc. Les ADNc sont fragmentés (pour obtenir une longueur d'environ 150 paires de bases) et supplémentés d'adaptateurs à chaque extrémité, pour leurs fixations sur le support solide et leurs amplifications. Cette étape permet de constituer des « librairies », soit une collection d'ADNc modifié. Il y a une librairie par échantillon.

Avec la technologie Illumina, le séquençage se fait « par synthèse », c'est-à-dire par une amplification des librairies avec une alternance de cycles de dénaturation et d'hybridation. L'amplification par polymérisation du fragment d'ADNc s'effectue directement sur le support solide. Chaque base est agrémentée d'un chromophore, dont le séquenceur lit le signal au fur et à mesure de l'amplification, révélant ainsi la succession des bases de chaque fragment.

Bioinformatique d'assemblage des séquences

Une fois les séquences des fragments renseignées, celles-ci sont assemblées selon une logique de bioinformatique, ayant fait l'objet d'une collaboration avec la plateforme de bio-informatique Genotoul, Mathématiques et Informatique Appliquée (Université de Toulouse, INRA de Castanet-Tolosan).

La qualité des données issues du séquençage est analysée par outil informatique (FastQC). Les séquences sont ensuite travaillées *via* Trinity pour un assemblage dit *de novo* (GRABHERR et al. 2011). À l'inverse des approches reposant sur une reconstruction des transcrits par alignement sur un génome de référence, avec le pipeline Trinity, les transcrits sont assemblés à partir du chevauchement des séquences entre elles-mêmes. Cette méthode est tout particulièrement adaptée dans le cas où le génome de référence est partiel ou manquant (GRABHERR et al. 2011).

L'annotation des transcrits assemblés est ensuite réalisée par blast sur la base de données NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Traitement statistique des données

L'expression différentielle des gènes entre les conditions d'exposition aux nanoparticules d'or est basée sur le nombre de séquences assemblées, pour un gène donné, et dont la statistique a été réalisée avec le package DESeq2 du logiciel R (version 3.3.0) (LOVE et al. 2014). Les p-values pour les gènes différentiellement exprimés sont corrigées avec la méthode de BENJAMINI et HOCHBERG (1995) afin d'éliminer les faux positifs par le calcul d'un FDR (False Discovery Rate) ayant valeur de probabilité. La documentation du package DESeq2 a été suivie pour l'élaboration du script.

En raison des tailles importantes des bases de données issues du séquençage, des outils ont été développés afin d'analyser les transcrits en tant qu'ensemble afin de leur conférer une puissance statistique, c'est le concept du « Gene Ontology ».

Le « Gene Ontology Consortium » est un projet collaboratif de bioinformatique, reposant sur plusieurs bases de données, visant à structurer la description des gènes et de leurs produits, dans le cadre d'une ontolo-

gie commune à toutes les espèces. Les gènes sont définis et associés à des classes de fonction, et les relations entre les classes sont prises en compte. Ainsi, l'outil « Gene Ontology » (GO) décrit chaque gène pour 3 aspects :

- « *Molecular Function* », soit la fonction moléculaire associée au produit du gène
- « *Cellular Component* », soit la localisation cellulaire où le produit du gène est actif
- « *Biological Process* », soit les voies et grands processus biologiques dans lesquels le produit du gène est impliqué

À partir de cette affiliation gène-GO des tests dits d'enrichissement peuvent être réalisés. Les tests d'enrichissement comparent la représentation des fonctions GO entre une référence (l'ensemble du transcriptome) et un groupe testé (les gènes différentiellement exprimés). L'idée sous-jacente consiste à rendre compte si le groupe de test est statistiquement représentatif de la référence pour ce qui concerne les GO. Si dans le groupe testé, des termes GO sont sur- ou sous-représentés par rapport à la référence, il y a alors enrichissement pour les termes GO considérés. Cette analyse correspond à un test de Fisher, réalisé avec le package topGO sur le logiciel R (version 3.3.0).

2.3.4 Expression génique sélective, RT-qPCR

Pour des raisons évidentes de simplicité de mise en œuvre et de coût réduit, la RT-qPCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) permet d'évaluer l'expression de gènes sélectionnés *a priori*, par une quantification relative des ARNm, résultants de la transcription des gènes d'intérêts.

Design des primers

Pour le présent travail, les gènes d'intérêts ont été sélectionnés *a posteriori* de l'analyse des résultats du séquençage de l'ARN effectué sur des anguilles. En effet, l'analyse bioinformatique a révélé des gènes différentiellement exprimés, et dont les séquences nucléotidiques chez l'anguille sont renseignées grâce au séquençage, permettant le design des amorces pour les RT-qPCR.

2.3. ANALYSES ET TRAITEMENT DES DONNÉES

Les séquences nucléotidiques de l'assemblage *de novo* sont blastées sur la base de données NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin d'identifier la partie codante et vérifier l'alignement.

Ensuite, à partir de la séquence nucléotidique, la plateforme en ligne Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) identifie les amorces sens et anti-sens appropriées à partir des données renseignées.

Calculs de l'expression relative

Le nombre de copies d'ADNc des gènes d'intérêts d'un échantillon est quantifié relativement au nombre de copies d'un ou plusieurs gènes de référence. Les gènes de référence, analysés par RT-qPCR en même temps que les gènes d'intérêt, présentent une stabilité statistique des Ct dans le tissu, permettant une normalisation relative.

Selon la méthode de LIVAK et SCHMITTGEN (2001), l'expression relative des gènes d'intérêt est calculée d'après la méthode du $2^{-\Delta Ct}$, où :

$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

CHAPITRE 2. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET BASES MÉTHODOLOGIQUES

Chapitre 3

Du biofilm naturel au poisson brouteur

3.1 Introduction

En raison de la matrice de biopolymères qui les caractérise, la propension des biofilms à ad/absorber de manière passive des toxiques présents dans l'eau a été soulignée pour des substances variées (DOBOR et al. 2012; FLEMMING et al. 2016; MÉTIVIER et al. 2013; WRITER et al. 2011). Par conséquent, dans l'hypothèse d'une contamination des eaux de surface par les nanoparticules, les biofilms semblent constituer un compartiment de la biosphère susceptible d'accumuler une importante part du contaminant et, qui plus est, d'engendrer son entrée dans les chaînes alimentaires (FERRY et al. 2009).

Récemment, BAUDRIMONT et al. (2017) ont pu montrer un transfert d'or des biofilms aux gammares. En effet, pour cette expérience, les biofilms ont été exposés aux nanoparticules d'or (fonctionnalisées aux PEG, 10 nm⁺) pendant 48 heures à de l'eau contenant 4,6 et 46,5 mg Au L⁻¹ (BAUDRIMONT et al. 2017). Les gammares ont ensuite été nourris, pendant 7 jours, avec les biofilms préalablement contaminés (BAUDRIMONT et al. 2017). Avec des dosages d'or réalisés sur les gammares entiers, les auteurs ont illustré un transfert entre ces deux maillons (BAUDRIMONT et al. 2017). La littérature considère le transfert des nanoparticules métalliques pour les premiers niveaux trophiques en se focalisant principalement sur des

organismes invertébrés comme consommateurs primaires (BAUDRIMONT et al. 2017; FERRY et al. 2009; GEITNER et al. 2016; GILROY et al. 2014; LARGUINHO et al. 2014; LEE et al. 2015; PAN et al. 2012; RENAULT et al. 2008). Or, les consommateurs primaires peuvent également être représentés par des vertébrés, pour lesquels très peu d'études existent.

Ainsi, la présente expérimentation se focalise sur le transfert trophique de nanoparticules d'or entre des biofilms naturels de rivière et un poisson brouteur et benthique, *Hypostomus plecostomus*.

Le protocole expérimental de cette expérience se base sur l'étude de BAUDRIMONT et al. (2017), mais deux différences notoires sont à souligner : (1) la pression de contamination est ici 10 fois plus faible dans l'eau des biofilms (0,46 et 4,65 mg Au L⁻¹) et (2), la durée d'exposition du consommateur primaire est ici allongée à 21 jours contre 7 jours dans l'étude précédente.

Pour la présente expérience, la bioaccumulation de l'or est renseignée chez le consommateur primaire en considérant 8 organes (branchies, cerveau, cœur, foie, intestin, muscle, rate, reins).

Par ailleurs, la capacité de rétention des biofilms naturels de rivière est évaluée au regard d'une gamme de concentration de nanoparticules dans l'eau et pour 48 heures d'exposition.

Enfin, des observations histologiques sont réalisées sur différents organes afin de rendre compte d'une éventuelle réponse tissulaire à l'exposition aux nanoparticules chez ce poisson.

3.2 ARTICLE : Gold nanoparticles trophic transfer from natural biofilm to grazer fish

Cet article fait l'objet d'une soumission en cours dans le journal « Environmental Toxicology and Chemistry ».

Gold nanoparticle trophic transfer from natural biofilm to grazer fish

Fanny Perrier¹, Magalie Baudrimont¹, Stéphane Mornet², Nathalie Mesmer-Dudons¹, Sabrina Lacomme³, Bruno Etcheverria¹, Olivier Simon⁴, Agnès Feurtet-Mazel¹

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

² ICMCB, 87 Avenue du Dr Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

³ University of Bordeaux, Bordeaux Imaging Center UMS 3420 CNRS – US4 INSERM, Pôle d'imagerie électronique, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

⁴ LECO, IRSN, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

Corresponding author

Magalie BAUDRIMONT

Place du Docteur Peyneau

33120 Arcachon, FRANCE

Ph. +335.56.22.39.27

magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

Abstract

Nanoparticle (NP) trophic transfer is reported as an important exposure route for organisms in aquatic ecosystems. This study focused on gold nanoparticle (AuNP, PEG-coated, 10nm diameter) transfer using an experimental benthic food chain which included two trophic levels: natural river biofilm and grazer fish *Hypostomus plecostomus*.

AuNP biofilm accumulation was assessed via water AuNP concentrations and total biofilm mass. An extended range of six AuNP concentrations in water (0; 0.0048; 0.048; 0.48; 4.8 and 48 mg Au L⁻¹) was set. A dose dependent relation between gold concentrations in water and natural river biofilm was observed after a 48-hour exposure. This pointed out the high propensity of natural biofilms to accumulate gold. Additionally, total biofilm mass appeared to influence AuNP accumulation at the highest exposure levels.

This first step enables the set-up of the transfer experiment in which grazer fish were exposed for 21 days to natural biofilms, previously contaminated by low AuNP concentrations in water (NP0.1: 0.48 and NP1: 4.8 mg Au L⁻¹). Gold was quantified in 8 fish organs, and histology was observed. Gold was transferred from biofilms to fish; bioaccumulation was organ- and exposure level-dependent. Interestingly, the brain showed significant gold accumulation at the highest exposure level (NP1). Histological observations indicated distinct inflammatory responses in fish liver, spleen and muscle. The overall results suggest the potential hazards of subchronic nanoparticle exposure in aquatic organisms.

Keywords

Gold nanoparticle, trophic transfer, toxicity, natural biofilm, fish, *Hypostomus Plecostomus*

1. Introduction

A nanometric revolution is underway, exploring the unique properties of matter with a particle size in the 1–100 nm range. Since the 1990s, substantial worldwide efforts have led to the manufacturing of many types of nanomaterials [1,2] stimulated by their improving performances and innovative applications, such as next generation medicines, superconductors and high-performance ceramics and composites [3–5]. While nanotechnology developments have increased over the last few years, knowledge regarding their impact has struggled to keep pace. The inescapable use of nanotechnology in everyday life requires careful assessment of unexpected toxicities and biological interactions, especially due to a mounting potential of environmental discharges. Nanoparticle release might occur at any point during the nanomaterial life cycle (manufacturing, storage or transportation, use, or any possible waste management activity) [6–8]. For instance, outdoor facades released nanoparticles or composite colloids which were initially contained into the paints during weathering or abrasion [9,10]. Consequently, nanoparticles might reach aquatic ecosystems due to surface runoffs of dry or wet depositions [6]. Furthermore, quantification of engineered nanomaterials in complex matrices are still challenging for analytical chemistry, and environmental concentrations are estimated according to use, regardless of transformations [8].

Only 3.3% of all « nano » publications (January 2017, Scopus analysis) were performed in environmental science, highlighting a scientific gap in understanding ecological risks related to nanotechnology use. In the few experimental studies conducted, nanoparticle induced impacts were seen in ecosystem trophic interactions. Plankton populations exposed to relatively high concentrations of silver nanoparticles presented changes in prey/predator abundances [11] indicating probable disruption in the basis of aquatic food webs. Other studies reported nanoparticle transfer through aquatic food chains up to invertebrates [12,13]. Regarding toxicity, trophic nanoparticle exposure impacts organisms. Polystyrene nanoparticles transferred via trophic webs affected lipid metabolism

and behavior of fish [14] and biochemical changes in the brain of rainbow trout followed exposure to titanium dioxide nanoparticles [15].

Among the great variety of nanoparticles, the gold ones have induced huge scientific and technological interest due to their standardized synthesis procedures, chemical stability in solution, and unique properties (*i. e.* surface plasmon resonance) [16,17]. Furthermore, gold nanoparticles (AuNP) are considered suitable for biomedical applications due to their reactivity with biological interfaces [18–21], and may be used as non-invasive radiofrequency cancer therapy [22]. Although Ferry et al. [12] showed a AuNP propensity to accumulate at the base of food webs and especially into biofilms, current studies are mainly focused on suspension algae, filter feeders and/or model organisms [23–25].

In order to increase environmental representativeness, the present experiment focused on a two-level benthic aquatic food chain including natural river biofilms and a grazer fish *Hypostomus plecostomus*. Previous studies [25,26] showed significant AuNP transfer from biofilm or algae to crustacean or bivalve, for 0.48, 4.8 and 48 mg Au L⁻¹. This experiment focused on lower concentrations (*i.e.* 0.48 and 4.8 mg Au L⁻¹) with a vertebrate model and a subchronic exposure. Experimental design included two steps. First, biofilms were exposed to an extended concentration range of AuNPs in water in order to precise the AuNP accumulation capacity of natural biofilm. Second, fish were fed with contaminated biofilms for a 21-day exposure. Gold biodistribution in 8 fish organs was quantified and three organs were selected for an overview of histological fish responses: liver as a major accumulation organ, spleen due to its immune system involvement, and muscle in order to observe responses in an *a priori* non-target organ accumulation. AuNPs were synthesized and characterized prior biological exposures. This study aimed to assess (*i*) AuNP accumulation capacity of natural biofilms, (*ii*) AuNP trophic transfer from contaminated natural biofilms to fish

during a chronic exposure and, (iii) toxic impacts for fish through histological examinations.

2. Methods

2.1. Ethics

All procedures used in this study were submitted to the Aquitaine fish-birds Ethic Committee under the tutelage of the French Ministry of Higher Education and Research.

2.2. PEG-coated gold nanoparticles: synthesis and characterization

Gold nanoparticles were prepared by gold ion reduction in sodium citrate solution according to the modified Turkevich method giving 10 nm-sized nanoparticles [25]. Potassium tetrachloroaurate (KAuCl_4 , 99.995%, Aldrich) was dissolved in ultrapure water to obtain a 63.5 mM solution of which 25 mL was added to 725 mL boiling water under magnetic stirring (400 rpm). When the solution reached boiling, 75 mL of 69 nM trisodium citrate solution was added (1.53 g, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Alfa Aesar), and boiling were continued an additional 30 minutes. Polyethylene glycol (PEG)-coated (PEGylated) AuNPs were then prepared following the Brisson and Mornet method [27] which is based on the exchange of surface ligand. Poly(ethylene glycol) bis(3-aminopropyl)terminated (Mn 1500g mol⁻¹, Aldrich) was dissolved in 150 mL of 0.2 M borate buffer solution pH at 8.0 and an equimolar aqueous solution of Traut's reagent (2-iminothiolane·HCl, Thermo Scientific) was added for an overnight reaction. Then, sodium borohydride (NaBH_4 , $\geq 98.0\%$, Aldrich) was added at the same number of moles as Traut's reagent and PEG bis(amine) for a 10-min reaction. The pH was adjusted to 6.5-7 prior to adding citrate-coating AuNPs under strong stirring. Following an overnight incubation in the dark, the solution was concentrated using a rotary evaporator at 70°C to decrease volume below 300 mL. Seven

washing cycles of ultrafiltration (100kDa cut-off Amicon membrane, Millipore) were performed in order to remove excess PEG and to reach a 50 mL final volume. The PEG-coated AuNP solution had a gold concentration of 2.15 g Au L^{-1} corresponding to 2.1×10^{17} nanoparticles L^{-1} . The absorption spectra were recorded in the range of 300–800 nm with an UV-3600 Shimadzu UV-Vis-NIR spectrophotometer using 1 cm optical path length plastic cells. AuNP size was assessed by transmission electron microscopy (TEM). A volume of 5 μL of dispersed NPs was deposited on a carbon-film covered copper grid and allowed to adsorb for 1 min. The excess liquid was then removed using Whatman filter paper. TEM micrographs were performed with a Philips CM120 microscope operating at 120 kV and captured with an Ultra scan USC1000 $2\text{k} \times 2\text{k}$ camera. NP size assessment was performed with Digital Micrograph software from Gatan.

2.3. Natural river biofilm: collection and AuNP exposure

Natural biofilms were collected in the Isle River ($44^{\circ}50'16''\text{N}$, $00^{\circ}34'46''\text{W}$, France), an uncontaminated site according to measured metal concentrations in aquatic organisms (data not shown). For 4 months (Oct. 2014 to Jan. 2015), glass slides ($76 \text{ mm} \times 26 \text{ mm}$) protected in plastic racks were immersed into the water column. After, the biofilm colonized slides were transferred to the laboratory and kept in Isle River water in the dark at 4°C until experiments began. Experimental units (one biofilm glass slide unit⁻¹) were placed on a circular rotation device (5 revolutions per minute) under a 12:12 hr light:dark cycle ($80 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ for light intensity according to Duong et al. [28]). Each experimental unit contained 40 mL of Dauta culture medium [29; modified with 10 mg Si L^{-1} ; pH adjusted to 7.7] spiked with PEG-coated AuNPs. Biofilms were exposed for 48 hours at six AuNP concentrations in order to assess AuNP accumulation for an extended concentration range: $0 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP0); $4.8 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP0.001); $48 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP0.01); $480 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP0.1); $4,800 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP1); $48,000 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP10). According to a previous study [25], the highest concentration (NP10) of

this range corresponded to the AuNP LC₅₀-24h for phytoplanktonic algae, *Scenedesmus subspicatus*.

2.4. Trophic fish exposure to AuNP contaminated biofilms

Grazer fish *Hypostomus plecostomus*, purchased from a commercial company (Exomarc, Lormont, France), were transferred to the laboratory for a two-week acclimatization period. Fifteen fish (body weight: 6.4 ± 0.3 g; standard length: 8.4 ± 0.1 cm; mean \pm SE, n=15) were individually and randomly placed in experimental units containing 3 L of dechlorinated, permanently aerated tap water. Throughout the experiment, the temperature was maintained at $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and organisms were exposed to a 12:12hr light:dark period. Each fish was fed once a day with a river biofilm glass side according to exposure levels. Control fish (NP0) were fed with uncontaminated biofilms ; NP0.1 and NP1 fish were fed with artificially contaminated NP0.1 and NP1 biofilms, respectively following procedures previously described (section 2.3). To assess nanoparticle trophic exposure of fish, gold concentrations in biofilm were measured throughout the experiment and were below the detection threshold for NP0, $543 \pm 76 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW for NP0.1 and $7,676 \pm 1,592 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW for NP1 (mean \pm SE, n=12). To reduce fish contamination by water exposure, the water of each tank was renewed once a week, and tank bottoms were cleaned twice per week to remove fish feces. Water gold concentration was punctually measured in fish tanks. At the end of the 21-day exposure, fish were sacrificed and tissues (brain, gills, heart, digestive tract, kidney, liver, muscle, spleen) were dissected. Three fish were collected for gold bioaccumulation quantification and two others for histopathological analyses. Digestive tracts were manually emptied during dissection to remove most of the food bowl. Bioconcentration factors were calculated as the ratio of gold concentration in biofilm to gold concentration in the water column. Trophic transfer rate was assessed after the 21-day exposure with the following calculation: $[(\text{gold quantity in exposed fish} - \text{gold quantity in control fish}) \div (\text{gold quantity in biofilm ingested by fish})] \times 100$.

2.5. Gold quantification

Biological samples were dried (48h at 50°C) and then digested in *aqua regia* (0.25 volume of 65% HNO₃ - Carlo Erba Reagent, Dasit Group, Italy - and 0.75 volume of 37% HCl - SCP Science, Canada) at 100°C for 3h (Fluka, Buchs, Switzerland). Biofilms were rinsed with dechlorinated water, scraped and centrifuged (5 minutes at 700 g) prior to being dried and weighed, then digested in 1 mL of *aqua regia*. Fish carcass and muscle (weighing >50 mg DW) were digested in 5 mL of *aqua regia*; gills (tissues weights between 10 and 30 mg DW) in 3 mL of *aqua regia*; digestive tracts, livers and brains (from 5 to 10 mg DW) in 1 mL of *aqua regia*; heart, spleen and kidney (weighing less than 5 mg DW) in 0.2 mL of *aqua regia*. All acid-digested samples were diluted 6-fold with ultrapure water (MilliQ, Bedford, MA, USA). Gold concentrations were expressed as $\mu\text{g Au g}^{-1}$ tissue dry weight (DW). Water samples were diluted with ultrapure acidified water (2% *aqua regia*) before gold quantification.

All gold quantifications were performed by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (240ZAA spectrometer, Agilent Technologies, USA). The detection limit was 0.1 $\mu\text{g Au L}^{-1}$. The analytical method was validated by the analysis of gold standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany), and for each sample series by checking an inter-laboratory biological reference material (gold-contaminated Asiatic clam *Corbicula fluminea*, concentration intercalibrated with six laboratories, data not shown). Gold recoveries reached $97 \pm 1\%$ (n=26).

2.6. Biological sample preparation for microscopy

Fish tissue samples were randomly collected and then prepared for TEM observations according to Baudrimont et al. [26].

2.7. Statistical analysis

For all statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant. Comparisons among groups were performed using analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions (normality and homoscedasticity of error terms). If significant effects were detected, Tukey's test ($p < 0.05$) was used to separate means. When assumptions were not met, datasets underwent Box-Cox transformations or were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test. Linear correlations were investigated using Pearson R-squared and Fisher tests. Data were processed using R3.3.0 collaborative statistical software (www.r-project.org/).

3. Results

3.1. Characterization of PEG-coated AuNPs

Spherical and PEG-coated AuNPs synthesized for this study were observed under TEM (figure 1, A-B). During the drying of the AuNP-PEG-NH₂ dispersion on the carbon grid, particles formed a dense close-packed monolayer attesting to their colloidal stability, even at high concentration. The coating of AuNPs by a layer of polyethylene glycol (PEG) (also called PEGylation) did not affect their size nor their colloidal stability compared to citrate-coated AuNPs. A histogram of 300 particle sizes (figure 1.C) showed a narrow distribution around 10 nm (± 1 nm which corresponded to the uncertainty related to TEM analysis). UV-Vis measurements (figure 1.D) confirmed TEM observations. The optical properties of dispersion of spherical gold nanoparticles were characterized by a single plasmon band at 520 nm, corresponding to the dipole resonance mode due to the collective displacement of the free conduction electron cloud under electromagnetic radiation [30]. Nanoparticle size, shape and aggregation were the main factors affecting plasmon response. Here, plasmon bands observed for both AuNP dispersions were quite similar attesting that the chemical surface

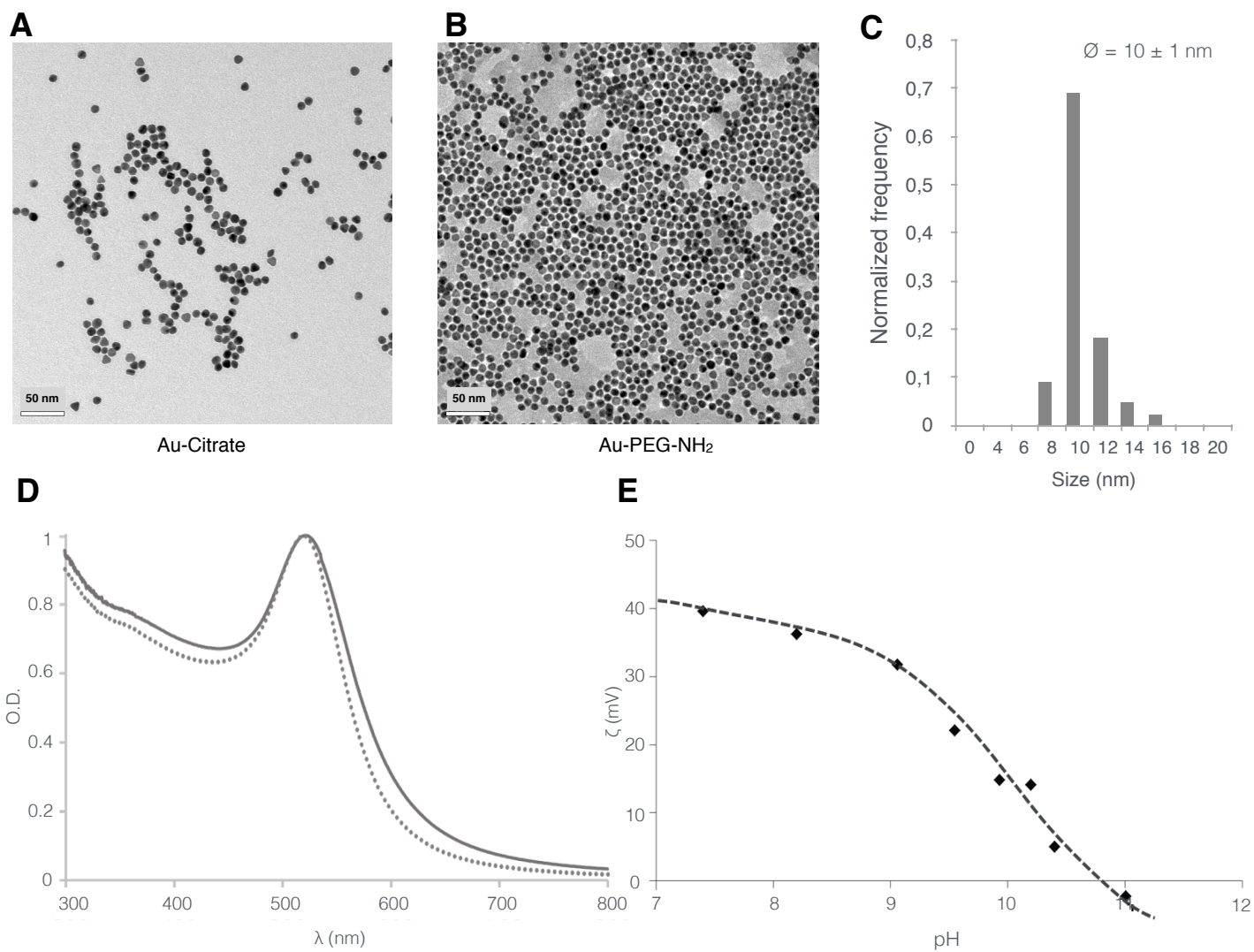


Figure 1 : (A - B) TEM images of citrated and PEGylated 10 nm AuNPs. (C) Size distribution histogram of AuNP-PEG-NH₂. (D) UV-visible spectra of citrated (dotted curve) and PEGylated (solid curve) AuNPs dispersed in water. The red shift from 520 to 522 nm of the plasmon band of PEGylated AuNPs is from anchoring of the nucleophilic thiol function of bifunctionalized PEG macromolecules. (E) Zeta potential measurements (using a Nano-plus device from Micromeritics) of PEGylated AuNPs versus pH.

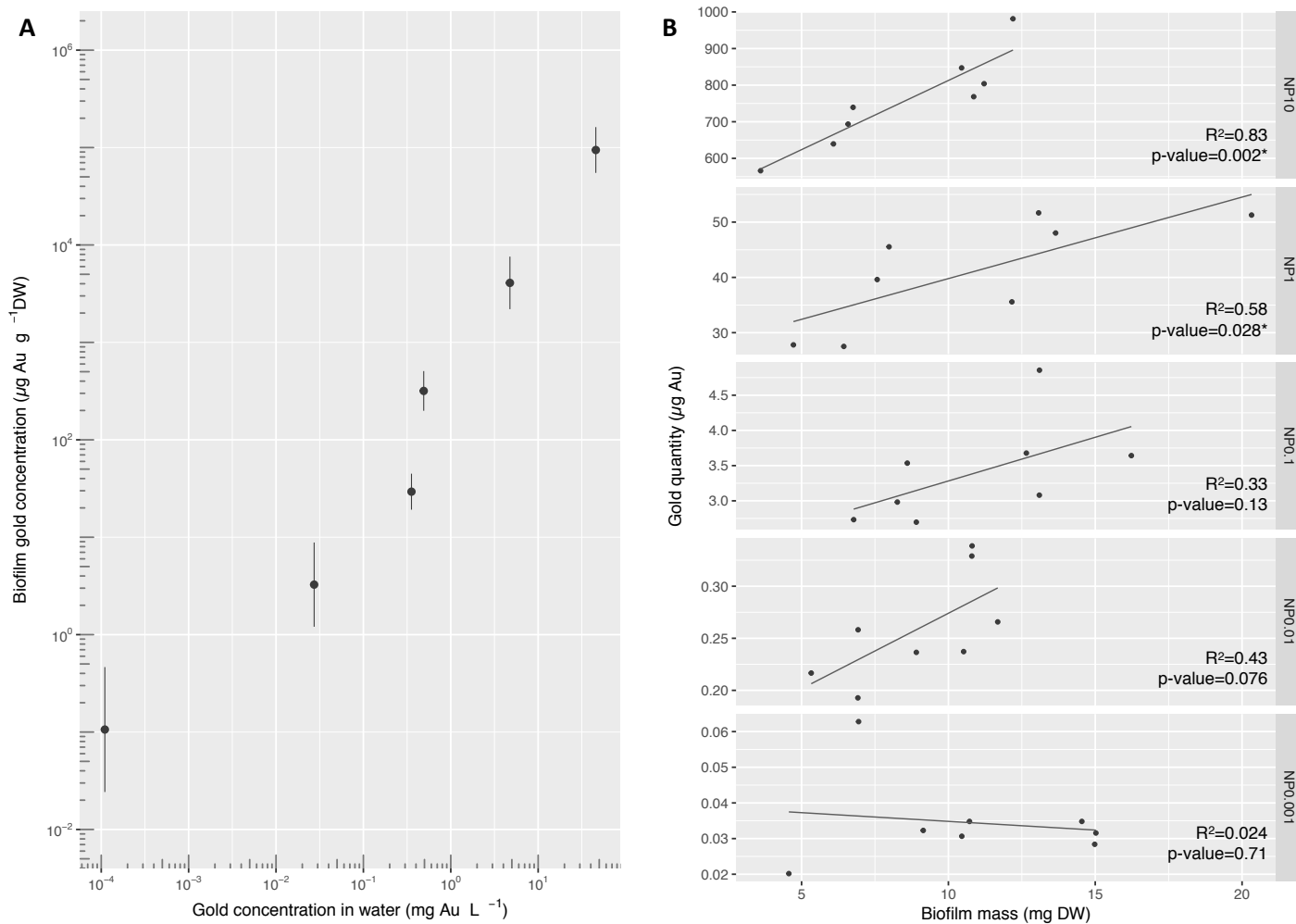


Figure 2 : (A) Gold concentrations in biofilm versus water, mean±SD, n=8. (B) Gold quantities according to biofilm biomass after a 48-hour AuNP exposure. Measurements were fitted with linear models. Statistical values were assessed by the Fisher test, * indicates a significant linear regression (p<0.05).

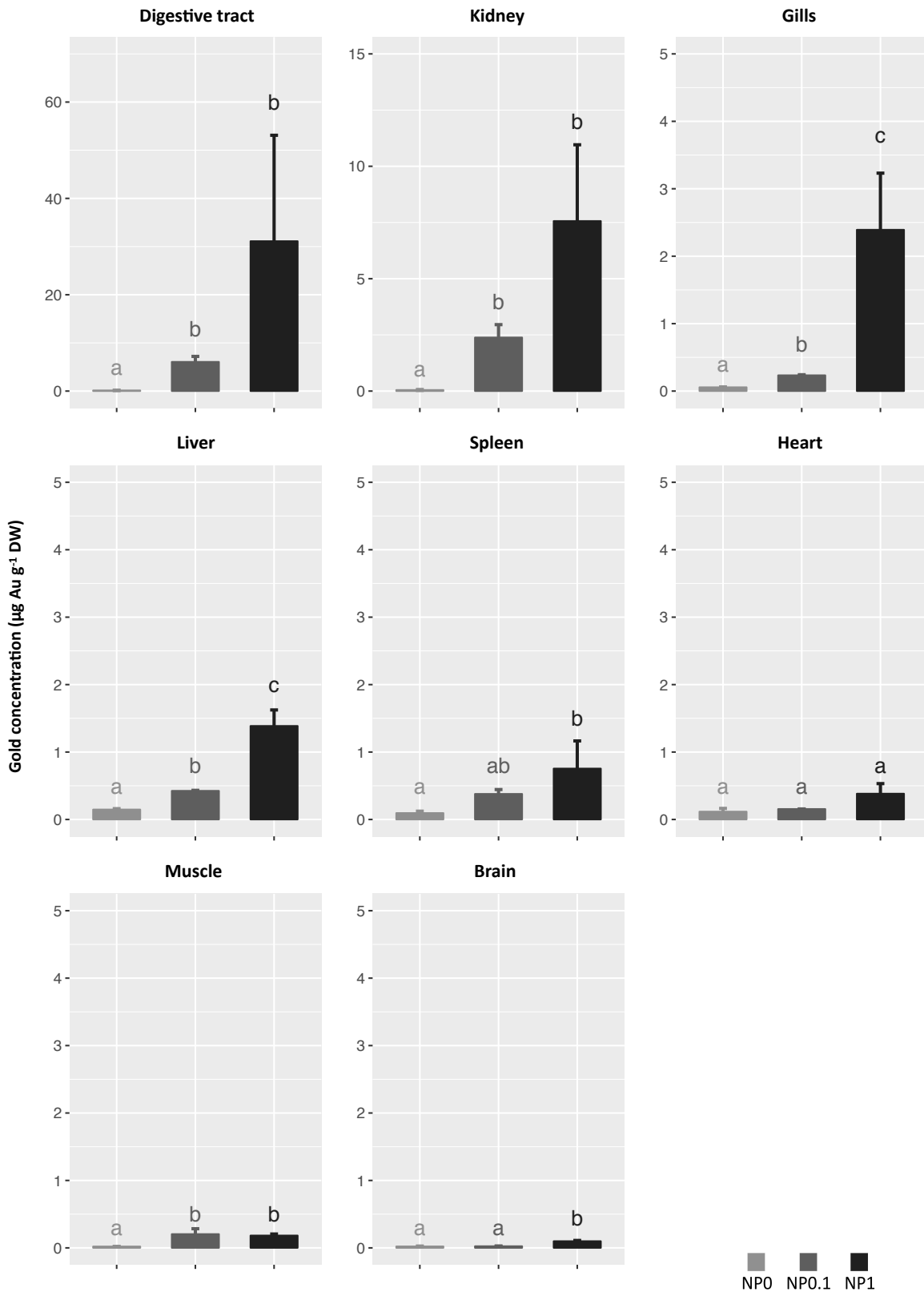


Figure 3 : Gold concentration in fish organs after a 21-day exposure. Metal concentrations are means \pm SE, n=3. Bars with different letters are statistically different from each other as assessed by the ANOVA on ranks - Tukey HSD ($p < 0.05$).

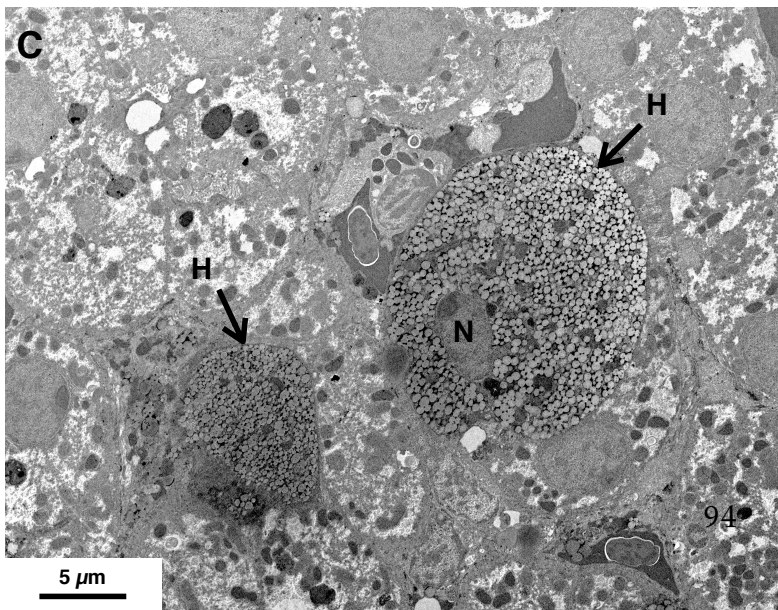
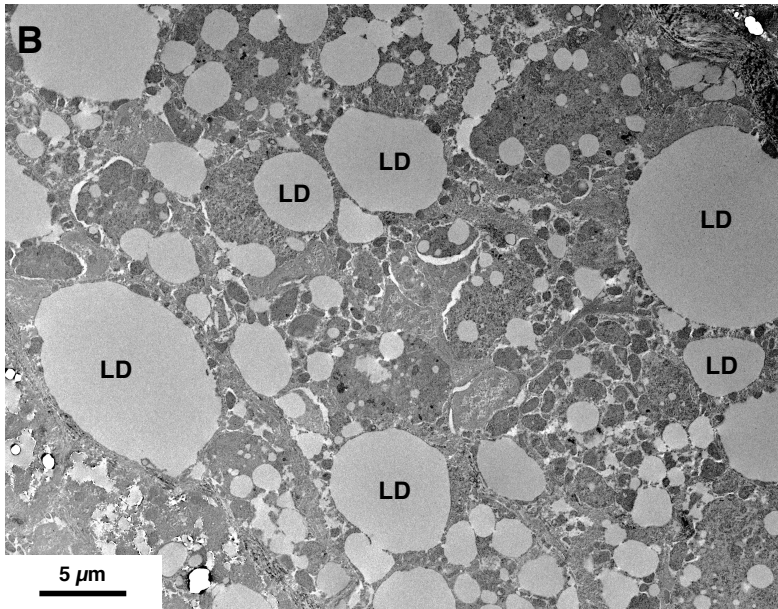
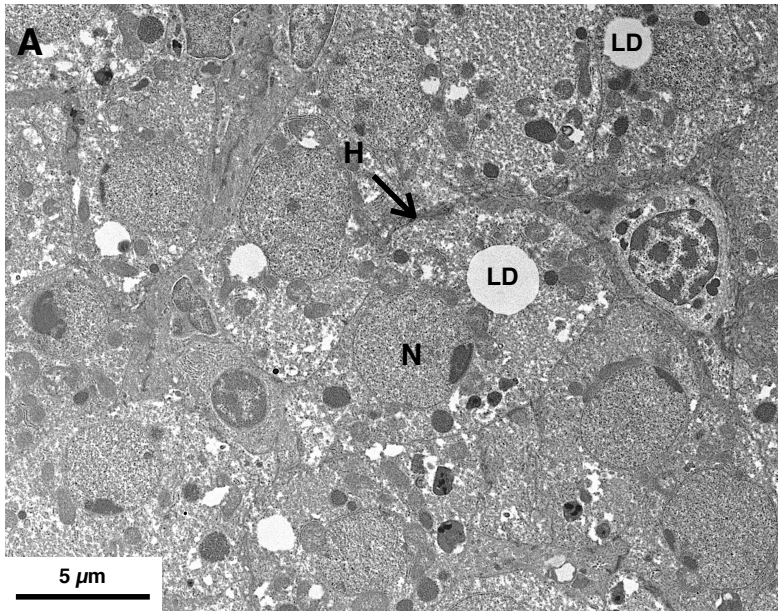


Figure 4 : Representative TEM photomicrographs showing histological injuries observed in fish liver after AuNPs exposure (NP1). (A) Control fish liver. (B) Exposed fish showed fatty degeneration. (C) Exposed fish exhibited vacuolization of the hepatocyte cytoplasm. Legends: H: Hepatocyte; LD: Lipid Droplet; N: Nucleus.

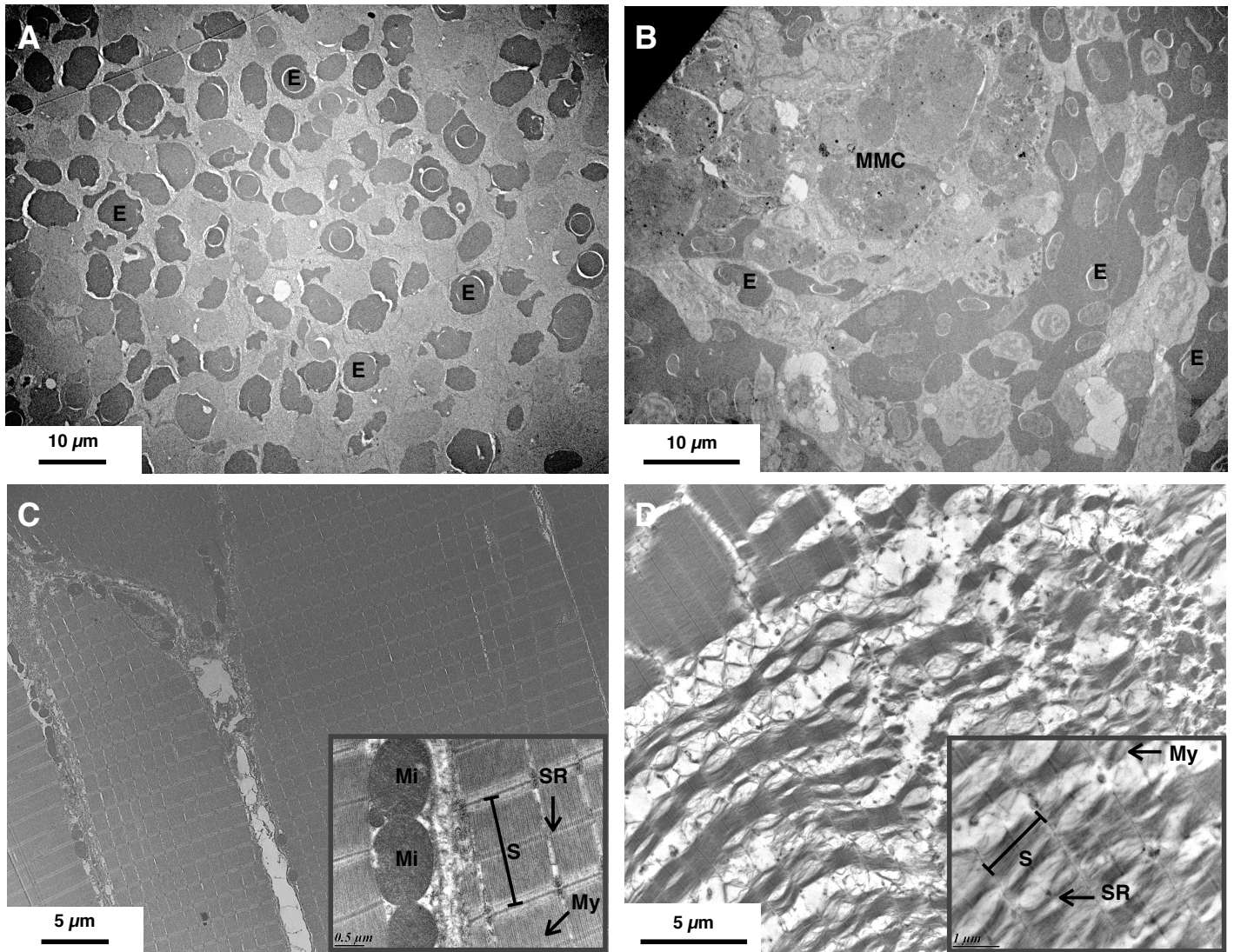


Figure 5 : Representative TEM photomicrographs showing histological injuries observed in fish spleen (A-B) and muscle (C-D) after AuNP exposure (NP1). (A) Control fish spleen. (B) Exposed fish spleen with melano-macrophage centres (MMC). (C) Control fish muscle. (D) Exposed fish muscle exhibited a clear myofibril destruction. Legends: E: Erythrocyte; Mi: Mitochondrion; MMC: Melano-Macrophage Centres; My: Myofibril; S: Sarcomere; SR: Sarcoplasmic Reticulum.

modification by thiolated PEG molecules did not affect colloidal stability. However, a slight plasmon band red shift to 522 nm was observed for PEGylated AuNPs (figure 1.D). This phenomenon was due to the chemisorbed nucleophilic thiolated functions responsible for a charge transfer which took place between the Fermi level of the AuNP and the unoccupied LUMO level of the adsorbed molecule. Zeta potential measurements (figure 1.E) of AuNP-PEG-NH₂ showed an isoelectric point close to the pKa value of aminopropyl groups (*i.e.* 10.5). The zeta potential values decreased gradually in alkaline medium while in neutral and acidic range the particles were positively charged due to the presence of primary ammoniums on the outer layer of the polymer corona.

3.2. AuNPs in biofilms and in water

Nanoparticle accumulation of the natural river biofilms were assessed by gold quantification (figure 2). After an exposure of 48 hours, a significant correlation between biofilm and water gold concentrations was observed ($R^2=0.91$, $p\text{-value} < 2.2 \times 10^{-16}$) (figure 2.A). Moreover, for each nanoparticle exposure level, regressions between biofilm gold quantity and biofilm biomass showed a positive correlation (figure 2.B). Due to the constancy of the colonized surface, biomass might be used to assess biofilm thickness. Pearson coefficients tended to increase with higher gold concentrations in water and reached 0.83 for the highest exposure level (*i.e.* NP10, 48 mg Au L⁻¹). The Fisher test showed a significant regression for NP1 ($p=0.028$) and NP10 ($p=0.002$) conditions.

3.3. Food chain: AuNP transfer and accumulation in fish tissues

No fish mortality was noted during this experiment. Biofilm gold concentrations were monitored in order to follow fish trophic exposure. Gold concentrations were below the detection threshold for NP0 biofilms. For the entire experiment, mean concentrations reached 543 ± 76 and $7, 676 \pm 1, 592 \mu\text{g Au g}^{-1} \text{DW}$ (mean \pm SE, $n=12$) for NP0.1 and NP1 in biofilms, respectively. Bioconcentration factors were

1, 131±158 for NP0.1 and 1, 599±332 for NP1. Fish food intake was assessed by differences of biofilm mass before and after grazing, and the significant decrease in mass after grazing ($p = 1.3 \times 10^{-7}$) confirmed fish feeding during the experiment. There were no significant post-grazing differences in biofilm biomass ($p=0.06$) among exposure levels indicating that nanoparticles did not inhibit fish feeding activity. Gold nanoparticles were transferred from biofilm to grazer fish with a trophic transfer rate of 1.52% for NP0.1 and 0.95% for NP1 fish at the end of the 21-day exposure. All organs except the heart showed a significant gold accumulation compared to control (figure 3). Digestive tract had the highest accumulation, 60- and 220-fold more than control for NP0.1 and NP1 AuNP exposures, respectively. Kidney was second with 49- and 154-fold increases in NP0.1 and NP1 compared to NP0. Gills and liver showed dose-dependent gold concentrations and a significant 8-fold rise was observed between NP0 and NP1 in spleen. Brain had a significantly increased gold concentration at the highest exposure level, 5-fold more than control, whereas NP0 and NP0.1 were unchanged.

3.4. Histological alterations in fish tissues

Histological alterations were detected in liver, spleen and muscle of exposed fish (NP1). Liver exhibited a severe increase of lipid droplets in size and frequency (figures 4.A and 4.B) with vacuolization of hepatocyte cytoplasm (figure 4.C). In spleen, control fish showed a homogeneous distribution of cell types whereas melano-macrophage centers were observed in exposed fish (figures 5.A and 5.B). Skeletal muscle tissue appeared disordered for exposed fish compared to control (figures 5.C and 5.D), with disorganized myofibrils and broken fibers leading to spaces between fiber bundles.

4. Discussion

This study aimed to assess (i) gold biofilm accumulation from AuNP contaminated water and (ii) nanoparticle transfer to grazer fish and impacts through an experimental benthic aquatic food chain for chronic exposure at low contamination pressure.

Natural river biofilms showed a very high AuNP accumulation capacity related to water concentration after only a 48h exposure. Cohesion among biofilm components resulted from extracellular polymeric substances (EPS) which carried surface negative charges [31]. Consequently, biofilm surfaces should display a high affinity for positively charged PEG-stabilized nanoparticles. Nanoparticles coating effects on bacterial biofilm penetration showed penetration of only cationic quantum dots [32], but it was also noted that organic ligands of an EPS matrix might contribute to interactions with nanoparticles [33]. For a 48-hour exposure, retained gold quantity was correlated with biofilm biomass according to nanoparticle concentrations in water. At relatively low exposure levels, biofilm biomass did not significantly increase retained gold quantity, emphasizing that nanoparticles might be mainly fixed to surface charges. Conversely for high exposure levels, a biomass increase was significantly correlated with an increase of biofilm gold quantity. In addition to nanoparticle retention by surface charges, this might indicate nanoparticle penetration into the biofilm. Regardless of accumulation mechanisms, the very high nanoparticles accumulation capacity of natural river biofilm, previously illustrated in marine and paddy artificial mesocosms [12,34], was intriguing due to their position at the bases of trophic webs. A study of gold nanorod distribution in marine mesocosm systems assessed that closed to 61% of all the whole in the experimental system was concentrated into biofilms [12]. Biofilms, thus, could represent a potential entry route for nanoparticles into river food chains through transfer to grazing consumers. Besides nanoparticles accumulation by biofilm, other studies reported

nanoparticle impacts on biofilm community composition [35,36], potentially leading to nutritional quality changes.

In the 21-day exposure, AuNPs were transferred from biofilm to grazer fish tissues. Gold accumulation was highest in the digestive tract for both exposures, which supports trophic route as the primary nanoparticle source. Previous studies showed bioaccumulation of nanomaterials from algae-clam [25], algae-mussel [24], biofilm-gammarus [26] and algae-zooplankton-fish [14] food chains, indicating trophic transfer studies were mainly focused on invertebrates and/or monospecific algae at the bases of experimental food chain. Geitner et al. [23] highlighted the importance of surface affinity in predicting the propensity of nanoparticles to enter the food chain, reporting a correlation between ingested gold concentrations in daphnia and AuNP attachment to algae. Authors calculated attachment efficiencies for different AuNPs to algae culture cells (*Chlorella vulgaris*) which varied based on nanoparticle types [23]. Larginho et al. [24] estimated that 76 and 36% of initial AuNP and PEGylated AuNP were, respectively, fixed by microalgae (*Dunaliella salina*) after a 72h-exposure and Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), fed with these contaminated algae, had 34- and 24-fold increased concentration in digestive glands for AuNPs and PEGylated AuNPs, respectively. Here, biofilms had much higher gold concentrations than fish. A dose-dependent transfer of 1.52% for NP0.1 fish and 0.95% for NP1 fish at the end of the 21-day exposure was nevertheless observed. Baudrimont et al. [26] assessed a 3% trophic transfer rate from biofilms to *Gammarus* for an NP1 equivalent concentration; this higher rate might be explained by physiological differences (*Gammarus* versus *Hypostomus plecostomus*), and/or a 7-day exposure in which excretion played a lesser role than in the 21-day exposure here. Considering other nanoparticles, Wang et al. [37] studied trophic transfer of TiO₂ throughout a marine benthic food chain. During dietary exposure, TiO₂ accumulation in juvenile fish (*Scophthalmus maximus*) increased with increasing Ti content in clamworms during the dietary exposure, however, biomagnification of TiO₂ NPs was not observed. Similarly, Al₂O₃

nanoparticles were transferred in a dose-dependent manner from algae to daphnids without evidence of biomagnification [38]. Conversely, cadmium selenide quantum dots were biomagnified in an experimental microbial food chain [39]. Despite the absence of a clear consensus on nanomaterial biomagnification in food chains, studies concede at least the existence of nanomaterial transfer.

Organs analyses, after the 21-day exposure here showed all organs except the heart with significant gold accumulation compared to control, suggesting nanoparticle transit into the fish circulatory system. A shorter exposure in daphnids showed a clear penetration of quantum dots through the intestinal epithelial barrier and translocation to other cells after only 24 hours [40]. PEG-coated gold nanoparticles in mice blood were still detected 6 months after a single injection [41] and regardless of charge, AuNPs entered red blood cells [42], leading potentially to transport in the whole organism.

Here, gold bioaccumulation in fish was organ- and exposure level- dependent. AuNP organotropism appeared as follows: digestive tract > kidney > gills > liver > spleen > muscle > brain. This is in agreement with literature [41,43,44] in which gold nanoparticles tended to mainly accumulate in liver, spleen and kidney. No general rule for AuNP accumulation can yet be made, the present study points to organ gold distribution after only a 21-day trophic exposure. There was a punctual presence of gold in water, mainly due to fish feces prior to water renewal (maximum 0.4 and 7.0 $\mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1 and NP1, respectively). Although biofilm gold concentrations were 1.4×10^6 (NP0.1) and 1.1×10^6 (NP1) fold higher than in the water column, direct exposure can not be completely excluded. Gill concentrations, classically considered as indicating direct uptake in fish, exhibited a dose-dependent increase according to AuNP exposure levels and were the third highest gold-accumulating organ. For TiO_2 trophic transfer in a marine food chain, Wang et al. [37] also observed higher TiO_2 nanoparticle accumulation in gills, intestine and stomach compared to liver of juvenile turbot. A possible explanation might be the high flow of contaminated blood to gill tissues following

a trophic exposure route. Gold clearly penetrated the brain at the highest exposure level which characterized to our knowledge the first evidence of AuNP internalization into fish brain through a trophic route. Ramsden et al. [15] reported significant accumulation and functional disturbances in brains of juvenile rainbow trout following dietary exposure to TiO₂ nanoparticles: a transient increase of titanium concentrations at week 4 and at the end of experiment, and metal homeostasis (Cu and Zn) and Na⁺-K⁺ ATPase activity were modified, changes which could affect many brain processes including neuroendocrine functions and memory formation.

The last objective of this study was to reveal potential histological effects after AuNP exposure. Although trophic transfer rate appeared low, fish tissue alterations were revealed by electron microscopy. Overall, liver, spleen and muscle tissues showed inflammatory lesions not seen in controls. In the same way, after TiO₂ dietary exposure, juvenile turbot presented abnormal histology (*i.e.* congestion, inflammatory cell infiltration, necrosis and fatty degeneration) in liver and spleen [37]. Similarly, hepatic disturbances were shown in mice causing activation of the JAK-STAT pathway [45]. In this experiment, exposed fish clearly exhibited vacuolization of the hepatocyte cytoplasm and fatty degeneration, indicating liver injury induced by nanoparticles. Both alterations might suggest oxidative stress and might be a response to toxic chemicals [46,47]. Fatty accumulation could result from disturbances in ion and fluid homeostasis [46], and trophic nanoparticle exposure in fish could affect lipid metabolism [14]. Exposed fish had melano-macrophage centres in spleen not seen in controls, these are defined as aggregations of phagocytic cells with abundant cell debris, associated with the vascular system and surrounded by a capsule [48]. These structures could increase in size or frequency in conditions of environmental stress due to their function of destruction, detoxification or recycling of endogenous and exogenous materials [49]. Compared to liver or spleen, fish muscle accumulated less gold, but that does not negate injuries at the histological level. Skeletal muscle cells were shown to be impacted by PEG-AuNPs, including

increased of intracellular ATP levels and mitochondrial membrane potential, resulting in altered cell survival signaling pathways, increased local inflammation and susceptibility to cell death [50]. Present histological results suggested that AuNP toxicity follows stimulation of an inflammatory response, probably due to oxidative stress as reported in many investigations of nanoparticle impacts [51].

5. Conclusions

These results show that AuNP were transferred from natural river biofilm to grazer fish through trophic exposure. Biofilm exhibited high AuNP accumulation capacity leading to important nanoparticles quantities available for higher trophic levels. Histological injuries in fish were induced by a 21-day exposure and gold was distributed in all organs including the brain. These results indicate the potential harm of sub-chronic nanoparticle exposure to aquatic organisms. To further assess environmental impacts of nanoparticles, future exposures may be focused on trophic transfer at upper ecological levels, such as to predator fish.

Acknowledgments

The authors thank Florence Daniel for her daily help and her technical cooperation with the caging devices; Henri Bouillard and Christian Portier for manufacturing the « Rotagit ». Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center, a core facility of the national infrastructure “France BioImaging” (ANR-10-INBS-04-FranceBioImaging). This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the CITTOXIC-Nano program (ANR-14-CE21-0001-01) and the Investments for the Future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). Fanny Perrier was supported by a grant from the French Ministry of Research.

Conflict of Interest

None of the authors report any conflict of interest or other relationship or activity that could appear to have influenced the submitted work.

References

1. Alivisatos AP. 1996. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* (80-.). 271:933–937.
2. Tervonen T, Linkov I, Figueira JR, Steevens J, Chappell M, Merad M. 2009. Risk-based classification system of nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 11:757–766.
3. Keren K, Berman RS, Buchstab E, Sivan U, Braun E. 2003. DNA-Templated carbon nanotube field-effect transistor. *Science* (80-.). 302:1380 LP-1382.
4. Stark WJ, Stoessel PR, Wohlleben W, Hafner A. 2015. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 98:2035–2044.
5. Yan H, Park SH, Finkelstein G, Reif JH, LaBean TH. 2003. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science.* 301:1882–4.
6. Baalousha M, Yang Y, Vance ME, Colman BP, McNeal S, Xu J, Blaszczyk J, Steele M, Bernhardt E, Hochella MF. 2016. Outdoor urban nanomaterials: The emergence of a new, integrated, and critical field of study. *Sci. Total Environ.* 557–558:740–753.
7. Blaser SA, Scheringer M, MacLeod M, Hungerbühler 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.
8. Caballero-Guzman A, Nowack B. 2016. A critical review of engineered nanomaterial release data: Are current data useful for material flow modeling? *Environ. Pollut.* 213:502–517.
9. Kaegi R, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Mueller E, Vonbank R, Bolliger M, Burkhardt M. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor

- facades. *Environ. Pollut.* 158:2900–2905.
10. Künniger T, Gerecke AC, Ulrich A, Huch A, Vonbank R, Heeb M, Wichser A, Haag R, Kunz P, Faller M. 2014. Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden façades. *Environ. Pollut.* 184:464–471.
 11. Baptista MS, Miller RJ, Halewood ER, Hanna SK, Almeida CMR, Vasconcelos VM, Keller AA, Lenihan HS. 2015. Impacts of silver nanoparticles on a natural estuarine plankton community. *Environ. Sci. Technol.* 49:12968–12974.
 12. 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. *Nat. Nanotechnol.* 4:441–444.
 13. Holbrook RD, Murphy KE, Morrow JB, Cole KD. 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nat. Nanotechnol.* 3:352–355.
 14. Cedervall T, Hansson LA, Lard M, Frohm B, Linse S. 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One.* 7:1–6.
 15. Ramsden CS, Smith TJ, Shaw BJ, Handy RD. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology.* 18:939–951.
 16. Abdelhalim MAK, Mady M. 2012. Physical properties of different gold nanoparticles: ultraviolet-visible and fluorescence measurements. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 3:1–5.
 17. 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.
 18. Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. 2009. The effects of PEG

- grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *J. Control. Release.* 139:81–84.
19. Antosh MP, Wijesinghe DD, Shrestha S, Lanou R, Huang YH, Hasselbacher T, Fox D, Neretti N, Sun S, Katenka N, Cooper LN, Andreev OA, Reshetnyak YK. 2015. Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:5372–6.
 20. Boisselier E, Astruc D. 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38:1759–1782.
 21. Cheng Y, Dai Q, Morshed RA, Fan X, Wegscheid ML, Wainwright DA, Han Y, Zhang L, Auffinger B, Tobias AL, Rincon E, Thaci B, Ahmed AU, Warnke PC, He C, Lesniak MS. 2014. Blood-brain barrier permeable gold nanoparticles: An efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. *Small.* 10:5137–5150.
 22. Bogdanov AA, Gupta S, Koshkina N, Corr SJ, Zhang S, Curley SA, Han G. 2015. Gold nanoparticles stabilized with MPEG-Grafted Poly(l-lysine): in vitro and in vivo evaluation of a potential theranostic agent. *Bioconjug. Chem.* 26:39–50.
 23. Geitner NK, Marinakos SM, Guo C, O'Brien N, Wiesner MR. 2016. Nanoparticle surface affinity as a predictor of trophic transfer. *Environ. Sci. Technol.* 50:6663–6669.
 24. Larginho M, Correia D, Diniz MS, Baptista P V. 2014. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels. *J. Nanoparticle Res.* 16:1–11.
 25. 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*). *Gold Bull.* 41:116–126.
 26. Baudrimont M, Andrei J, Mornet S, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Gourves P-Y, Jaffal A, Dedourge-Geffard O, Geffard A, Geffard O, Garric

- J, Feurtet-Mazel A. 2017. Trophic transfer and effects of gold nanoparticles (AuNPs) in *Gammarus fossarum* from contaminated periphytic biofilm. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-017-8400-3.
27. Brisson A, Mornet S. 2013. Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins, application to the high-density labeling of cell membranes. 1.
 28. Duong TT, Morin S, Coste M, Herlory O, Feurtet-Mazel A, Boudou A. 2010. Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Sci. Total Environ.* 408:552–562.
 29. Dauta A. 1982. Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. II. Rôle des nutriments : assimilation et stockage intracellulaire. *Annls Limnol.* 18:263–292.
 30. Liz-Marzán LM. 2004. Nanometals: Formation and color. *Mater. Today.* 7:26–31.
 31. Flemming H, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:623–33.
 32. Li X, Yeh Y-C, Giri K, Mout R, Landis RF, Prakash YS, Rotello VM. 2015. Control of nanoparticle penetration into biofilms through surface design. *Chem. Commun.* 51:282–285.
 33. Xu H, Pan J, Zhang H, Yang L. 2016. Interactions of metal oxide nanoparticles with extracellular polymeric substances (EPS) of algal aggregates in an eutrophic ecosystem. *Ecol. Eng.* 94:464–470.
 34. Yeo MK, Nam DH. 2013. Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environ. Pollut.* 178:166–172.
 35. Gonzalez AG, Mombo S, Leflaive J, Lamy A, Pokrovsky OS, Rols JL. 2015. Silver nanoparticles impact phototrophic biofilm communities to a considerably higher degree than ionic silver. *Environ. Sci. Pollut. Res.*

- 22:8412–8424.
36. Xu Y, Wang C, Hou J, Dai S, Wang P, Miao L, Lv B, Yang Y, You G. 2016. Effects of ZnO nanoparticles and Zn²⁺ on fluvial biofilms and the related toxicity mechanisms. *Sci. Total Environ.* 544:230–237.
 37. Wang Z, Yin L, Zhao J, Xing B. 2016. Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Res.* 95:250–259.
 38. Pakrashi S, Dalai S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. 2014. Trophic transfer potential of aluminium oxide nanoparticles using representative primary producer (*Chlorella ellipsoides*) and a primary consumer (*Ceriodaphnia dubia*). *Aquat. Toxicol.* 152:74–81.
 39. Werlin R, Priester JH, Mielke RE, Krämer S, Jackson S, Stoimenov PK, Stucky GD, Cherr GN, Orias E, Holden PA. 2011. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nat. Nanotechnol.* 6:65–71.
 40. Feswick A, Griffitt RJ, Siebein K, Barber DS. 2013. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquat. Toxicol.* 130:210–218.
 41. Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Han BS, Shin HS, Hong J, Chung BH, Jeong J, Cho MH. 2010. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245:116–123.
 42. Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40:4353–4359.
 43. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials.* 29:1912–1919.
 44. Wojnicki M, Luty-błocho M, Bednarski M, Dudek M, Knutelska J, Sapa J,

- Zygmunt M, Nowak G, Fitzner K. 2013. Tissue distribution of gold nanoparticles after single intravenous administration in mice. *Pharmacol. Reports*. 65:1033–1038.
45. Hong J, Hong F, Ze Y, Zhang YQ. 2016. The nano-TiO₂ exposure can induce hepatic inflammation involving in a JAK–STAT signalling pathway. *J. Nanoparticle Res.* 18:1–9.
46. Del Monte U. 2005. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. *Med. Hypotheses*. 64:818–825.
47. Henics T, Wheatley DN. 1999. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. *Biol. Cell*. 91:485–498.
48. Herraez MP, Zapata AG. 1986. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:117–126.
49. Agius C, Roberts RJ. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26:499–509.
50. Leite PEC, Pereira MR, Santos CA do N, Campos APC, Esteves TM, Granjeiro JM. 2015. Gold nanoparticles do not induce myotube cytotoxicity but increase the susceptibility to cell death. *Toxicol. Vitr.* 29:819–827.
51. Stone V, Donaldson K. 2006. Nanotoxicology: Signs of stress. *Nat. Nanotechnol.* 1:23–24.

3.3 Conclusion

Pour cette expérience, les biofilms naturels de rivière présentent une très forte capacité de rétention des nanoparticules, avec des facteurs de concentration de l'or supérieurs à 1000. De manière intéressante, l'accumulation de l'or par les biofilms s'avère être du même ordre de grandeur indépendamment de la concentration d'exposition, montrant une rétention des nanoparticules par les biofilms directement proportionnelle aux concentrations dans l'eau.

Par ailleurs, cette expérimentation atteste d'un transfert de l'or aux poissons brouteurs sur 21 jours d'exposition et pour les deux niveaux de contamination réalisées.

Les tractus digestifs, vidangés manuellement lors des dissections, constituent le premier organe d'accumulation bien qu'aucune différence statistique ne soit avérée entre les deux conditions de poissons exposés. Toutefois, il n'est pas exclu que la vidange des tractus digestifs n'ait pas été complète et que des restes de contenus alimentaires aient pu demeurer et être dosés. Par conséquent, rapporter ces concentrations à de l'ad ou absorbé par le tube digestif semble une conclusion hasardeuse.

Tous les organes étudiés chez le poisson présentent des augmentations d'or significatives dans les conditions exposées, à l'exception du cœur. Les concentrations d'or dans les organes décroissent comme suit : intestin > rein > branchies > foie > rate > muscle > cerveau et une distribution de l'or dose-dépendante est mise en évidence pour les reins, les branchies et les foies. De plus, à la plus forte condition d'exposition, une augmentation significative de la concentration d'or dans le cerveau est clairement quantifiée.

Enfin, les observations histologiques conduites dans différents organes attestent d'une réponse associée à l'exposition aux nanoparticules. Chez les poissons exposés, le foie présente des amas lipidiques et une vacuolisation du cytoplasme des hépatocytes. Des structures s'apparentant à des centres de mélanomacrophage sont mises en évidence dans la rate des poissons exposés. Pour le tissu musculaire, une destructuration de l'organisation des myofibrilles est clairement observée.

Ainsi, cette expérimentation illustre (1) l'importante capacité de rétention des nanoparticules par les biofilms naturels de rivière, (2) un trans-

3.3. CONCLUSION

fert aux poissons brouteurs avec une distribution de l'or dans les organes, y compris le cerveau, et (3) une réponse histologique associée au transfert.

CHAPITRE 3. DU BIOFILM NATUREL AU POISSON BROUTEUR

Chapitre 4

Transfert et réponses transcriptomiques sans *a priori* d'un poisson prédateur à l'exposition trophique

4.1 Introduction

Alors que les travaux de la littérature se focalisent essentiellement sur les premiers niveaux des chaînes trophiques aquatiques, il a récemment été souligné la nécessité de focaliser les expérimentations sur les prédateurs (TANGAA et al. 2016).

Parmi les organismes de haut de chaîne trophique, l'anguille européenne *Anguilla anguilla* constitue un bon indicateur de la contamination du milieu (BELPAIRE et GOEMANS 2007 ; BELPAIRE et al. 2008 ; BOER et al. 1994) au regard de la littérature. Du cycle de vie complexe de cette espèce résulte la colonisation d'une grande diversité de milieux dans des zones géographiques étendues (TESCH 2003). De surcroît, à ce jour aucune étude ne rend compte de la toxicité des nanoparticules pour les anguilles bien que cette espèce se soit avérée sensible à une grande diversité de substances (BAILLON et al. 2015 ; BELPAIRE et GOEMANS 2007 ; MAES et al. 2008 ; PIERRON et al. 2007, 2008).

Concernant l'évaluation de la toxicité des nanoparticules, la majorité

CHAPITRE 4. TRANSFERT ET RÉPONSES TRANSCRIPTOMIQUES SANS A PRIORI D'UN POISSON PRÉDATEUR À L'EXPOSITION TROPHIQUE

des études préjugent des effets générés chez les organismes, se concentrant essentiellement sur le concept des « biomarqueurs ». Si ces méthodes sont classiquement suivies en (éco)toxicologie, et présentent par ailleurs certains avantages, s'agissant d'un contaminant émergent, une approche sans *a priori* s'avère d'un intérêt particulier afin de révéler des impacts toxiques spécifiques. Alors qu'il est communément admis que les changements de l'expression des gènes constituent une réponse des organismes exposés aux contaminants, l'avènement des technologies de séquençage haut débit permet une analyse complète et précise du transcriptome. Par conséquent, ce *screening* à grande échelle de l'expression des gènes par la technologie du « *RNA-sequencing* » constitue un moyen d'identifier des profils d'expression spécifiques à l'exposition aux nanoparticules.

À notre connaissance, la littérature environnementale ne comporte à ce jour qu'une seule étude d'impacts toxiques de nanoparticules sans *a priori*, à savoir celle de SIMON et al. (2013). En effet, *via* une analyse de séquençage du transcriptome, les auteurs ont discriminé les effets toxicologiques des nanoparticules d'Ag, de TiO₂, de ZnO et des quantum dots CdTe/CdS sur l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à des doses de 1 mg L⁻¹ pour chacune des nanoparticules et de 0,125 mg L⁻¹ pour les quantum dots (SIMON et al. 2013). Ainsi, cette approche sans *a priori* a permis d'appréhender la spécificité de chaque exposition en renseignant la réponse transcriptomique à une échelle globale.

Par conséquent, la présente expérimentation concerne l'étude de la réponse transcriptomique, *via* une approche de séquençage haut débit, chez des anguilles exposées à de la nourriture enrichie aux nanoparticules d'or. Deux organes ont été ciblés pour évaluer les effets, à savoir le foie et le cerveau. Le premier parce que sur le plan physiologique, il participe à la régulation de nombreuses fonctions biologiques ; le second, en raison de la capacité des nanoparticules d'or à être transférées jusqu'à cet organe (Cf. CHAPITRE 3). La consommation alimentaire des anguilles, ainsi que le transfert d'or sont également renseignés.

4.2 ARTICLE : Transcriptomic profiling responses in liver and brain tissues of European eels *Anguilla anguilla* after a gold nanoparticles trophic exposure

(Article en préparation)

Transcriptomic profiling responses in liver and brain tissues of European eels *Anguilla anguilla* after a gold nanoparticles trophic exposure

Fanny Perrier¹, Anthony Bertucci¹, Fabien Pierron¹, Agnès Feurtet-Mazel¹, Olivier Simon², Christophe Klopp³, Frédéric Candaudap⁴, Oleg Pokrovsky⁴, Bruno Etcheverria¹, Stéphane Mornet⁵, Magalie Baudrimont¹

¹ Université de Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

² LECO, IRSN, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

³ Plate-forme bio-informatique Genotoul, Mathématiques et Informatique Appliquées de Toulouse, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ Université de Toulouse, CNRS, GET, UMR 5563, 31400 Toulouse, France

⁵ ICMCB, 87 Avenue du Dr Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

Corresponding author

Magalie BAUDRIMONT

Place du Docteur Peyneau

33120 Arcachon, FRANCE

Ph. +335.56.22.39.27

magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

Abstract

Nanometric revolution is underway, promising technical innovations in a wide range of applications, leading also to a potential boost in environmental discharges. In the literature, nanoparticle propensity to be transferred throughout trophic chains and to generate toxicity was mainly assessed to primary consumers while the lack of knowledge for the higher levels of trophic chain persists. This study focused on a predatory fish, the European eel *Anguilla anguilla* exposed to gold nanoparticles (AuNP, 10 nm, PEG-coated) for 21 days at three concentration levels in food: 0 (NP0), 1 (NP1) and 10 (NP10) mg Au kg⁻¹. Transfer was assessed by gold quantifications in eel tissues and the transcriptomic responses in the liver and the brain were revealed by RNA-sequencing analyses. NP10 eels presented an erratic feeding behavior compared to NP0 and NP1 eels. Gold quantifications in organs did not indicate any gold transfer to exposed eels, except for the NP1 intestine tissues. RNA-sequencing was performed for NP0 and NP1 eels. 0.51% (258 genes) and 0.31% (156 genes) of the total genes were significantly differentially expressed due to AuNP trophic exposure in the liver and the brain, respectively. Liver enrichment analysis highlighted modifications in immune system and its regulation processes. In addition, results pointed out a share response for both studied organs regarding a dozen of genes among which 2 genes involved in the inflammasome (*nlr3* and *nlrp12*). To our knowledge, this is the first evidence of inflammasome responses to nanoparticles in wild fish exposed by trophic route.

Keywords

Gold nanoparticles, *Anguilla anguilla*, trophic transfer, RNA-seq, liver, brain

1. Introduction

Manufactured nanoparticles emerge as a potential contaminant for the environment due to a broad and increasing use over the last few years (Nowack et al., 2013). Nanoparticles are expected to reach aquatic ecosystems through several pathways such as surface runoffs of dry or wet depositions (Baalousha et al., 2016). For one year of weather exposure, a realistic scenario of application experiment assessed a 30% release of nanoparticles or composite colloids, initially contained into the paints, from outdoor facades (Kaegi et al., 2010). Furthermore, quantification of engineered nanomaterials in complex matrices are still challenging for analytical chemistry, and environmental concentrations are estimated according to use, regardless of transformations (Caballero-Guzman and Nowack, 2016).

Nanoparticles exhibit a potential of transfer through experimental aquatic food chains, focused at lower trophic levels such as invertebrates (Buffet et al., 2014; Croteau et al., 2011; Fouqueray et al., 2012; Jackson et al., 2012; Jarvis et al., 2013; McTeer et al., 2014; Renault et al., 2008; Zhao and Wang, 2010) or fish (Cedervall et al., 2012; Wang et al., 2016), which were reported as a major exposure route for organisms according to literature. Regarding biological impacts, nanoparticle size and surface reactivity might be responsible of toxic responses in exposed organisms. Studies mainly pointed out DNA damage (Cardoso et al., 2014; Wise et al., 2010), disruptions of enzyme activities (Chichova et al., 2014; Shrivastava et al., 2014), immunotoxicity (Bettini et al., 2017; Park et al., 2010) and cytotoxicity (Freese et al., 2012; Gliga et al., 2014), as a potential result of oxidative stress (Stoeger et al., 2009; Stone and Donaldson, 2006).

RNA-sequencing constitute an « omic » technology reflecting the whole genes actively expressed at any given moment. Transcriptomic profiling may be remodeled during or after environmental disruptions highlighting potential toxic

effects of pollutants for example. In environmental literature, studies are mainly focused on *a priori* effects such as oxidative stress based on biomarker genes (Baudrimont et al., 2017; Dedeh et al., 2014; Huerta-García et al., 2014; Ladhar et al., 2013; Renault et al., 2008). Suspected emerging contaminants require a without *a priori* method in order to anticipate their potential toxicities. To our knowledge, regarding aquatic environmental science literature, only one study aimed to focus on the whole transcriptome responses after nanoparticle exposures, considering the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Simon et al., 2013). The authors exposed *C. reinhardtii* to TiO₂, ZnO, Ag nanoparticles (1mg L⁻¹) and CdTe/CdS quantum dots (0.125mg L⁻¹) in order to investigate common and distinct effects of different nanoparticles after 2 hours of exposure. They revealed disruptions in photosynthesis functions for TiO₂, nonspecific global stress for ZnO, structural cell damages for Ag and proteasome inhibition for TiO₂, ZnO and CdTE/CdS. So, exposure to nanoparticles leads to complex and specific responses within organisms according to the type of nanoparticles highlighting the necessity to perform integrated approach.

Therefore, the present study focused on a without *a priori* gene expression screening after gold nanoparticle trophic exposure. European eel (*Anguilla anguilla*) has been chosen as model organism for this experiment. This predatory fish presents a complex life cycle including several metamorphoses and migrations (Tesch, 2003); and as euryhaline fish, the ability to adapt to a wide range of aquatic ecosystems. Studies emphasize eel pollutant sensitivity (Geeraerts and Belpaire, 2010; Pierron et al., 2008) as possible contributor to its worldwide decline. Up to day, none study has investigated the nanoparticle toxicity in the eels although this species constitute a confirmed pollutant bioindicator (Belpaire et al., 2008; de Boer et al., 1994), and a top predator for trophic transfer, for which experiments are lacking in the nanoparticle ecotoxicity literature (Tangaa et al., 2016). Liver and brain eel tissues were chosen as target organs for the RNA-sequencing analyses, respectively for its involvement in

biological functions system directly targeted by a trophic contamination, and nervous system as gold nanoparticles could reach the brain (Geffroy et al., 2012).

Among the great variety of nanoparticles, the gold ones have induced huge scientific and technological interest due to their standardized synthesis procedures, chemical stability in solution, and unique properties (*i.e.* surface plasmon resonance) (Abdelhalim and M. Mady, 2012; Kimling et al., 2006). Furthermore, gold nanoparticles (AuNP) are considered suitable for biomedical applications due to their reactivity with biological interfaces (Akiyama et al., 2009; Antosh et al., 2015; Boisselier and Astruc, 2009; Cheng et al., 2014), and may be used as non-invasive radiofrequency cancer therapy (Bogdanov et al., 2015). Several studies showed a AuNP propensity to transfer and generate toxic impacts in primary consumers regarding the trophic exposure (Baudrimont et al., 2017; Ferry et al., 2009; Larguinho et al., 2014; Renault et al., 2008).

This experimental study aims to investigate (*i*) the transfer to a terminal predatory fish from AuNP enriched food and, (*ii*) the transcriptomic remodeling by RNA-sequencing approach for the liver and the brain tissues after a 21-day trophic exposure.

2. Methods

2.1. Ethics

The experimental procedures of the present study respect the animal ethical guidelines in order to secure a decent existence in laboratory and reduce suffering according to the French Ministry of Higher Education and Research.

2.2. PEG-coated gold nanoparticles: synthesis and characterization

Polyethylene glycol coated gold nanoparticles (AuNP) were prepared according to Brisson and Mornet method (Brisson and Mornet, 2013). Briefly, gold ions were

reduced in sodium citrate solution in order to synthesize 10nm-sized and citrate-coated gold nanoparticles. Based on the surface ligand exchanges, polyethylene glycol (PEG) were then substituted to citrate. The PEG-coated AuNPs solution reached a gold concentration of 2.15 g Au L⁻¹ corresponding to 2.1×10^{17} nanoparticles L⁻¹. TEM micrograph of the AuNP prior to their incorporation into fish food was observed (figure 1). The synthesized AuNP looked uniform with a narrow size distribution (10 ± 1 nm). The AuNP were stabilized with PEG-amine at the particle surface and zeta potential was about 40 mV at pH 7, corresponding to a positive charge.

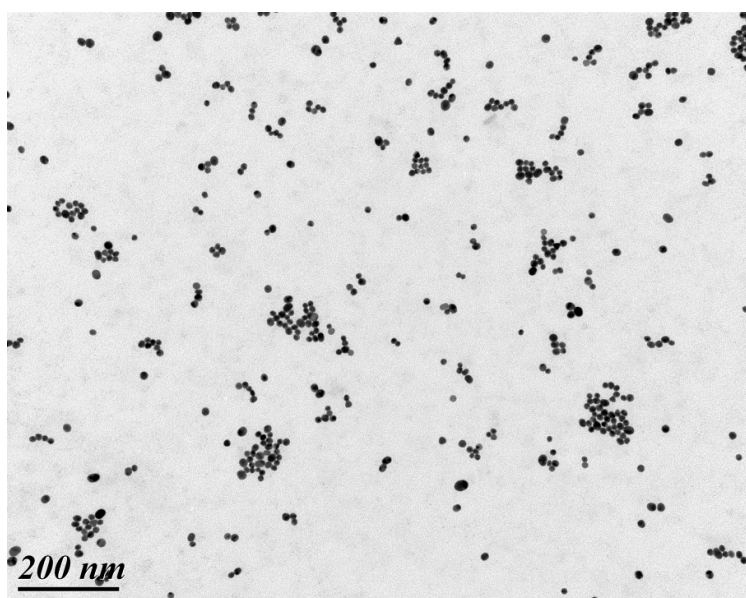


Figure 1: TEM micrographs of gold nanoparticles prior to incorporation into fish food.

2.3. Spiked food preparation

Artificial food spiked with PEG-coated AuNPs were prepared from weeverfish (*Trachinus sp.*) caught in the Arcachon Bay. Weeverfish flesh was crushed and blended to dissolved agar-agar (0.8% of total food weight, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S) in order to obtain an homogeneous mixture. Then, AuNPs were added to the mixture (1.3 mL of AuNP solutions for 380 g of food mixture). The

control diet was exactly prepared in the same way, except that the AuNP solution was replaced by an equal volume of ultra-pure water. Nominal concentrations in gold spiked food were defined as NP0 for control, NP1 for 1 mg Au kg⁻¹ fresh weight, and NP10 for 10 mg Au kg⁻¹ fw. So as to get standardized food portions, final preparation was divided to fill identical molds and stored at -20°C waiting for used. One food portion corresponded to 11 ± 3 g fw (mean ± SE, n = 15). Gold concentrations in the diet were confirmed as described in in 2.5 section and were lower than the detection limit for NP0, 0.98 ± 0.03 for NP1 and 11.96 ± 0.84 mg Au kg⁻¹ fw for NP10 (mean ± SE, n = 5).

2.4. Trophic fish exposure and experimental design

Immature yellow eels (*Anguilla anguilla*, 59 ± 2 g, 33.7 ± 0.3 cm, mean ± SE, n=18) were caught in the Arcachon Bay area considered as a pristine environment (Certes reservoirs: 44°41'24''N-1°01'27''W, Southwest, France) in September 2015. Animals were transferred to the laboratory for a one month acclimatization period (*i.e.* kept in running aerated seawater, and feed with weeverfish flesh every two days). For the experiment, fish were individually separated in a flow-through seawater open system (40L fish⁻¹, daily renewed; 21.0 ± 0.5°C, mean ± SE, n=21) under 12:12 light:dark period. During the 21-day exposure, one standardized portion was used to feed one eel every two days at dusk. The unconsumed food was removed every morning, dried at 45°C for 48 hours and weighed in order to assess fish feeding behavior. Water monitoring did not reveal gold in water tanks enabling to consider exposure of fish only by the trophic route. After 21 days of exposure, the six eels of each condition were sacrificed and tissues (blood, brain, gills, heart, intestine, kidney, liver, muscle, spleen) were dissected. Intestine tissues were manually emptied during dissection to remove most of the food bowl. All organs were stored at -20°C until the gold quantification analysis. A standardized sampling of brain and liver tissues were stored in RNA-later solution for further RNA-sequencing analysis.

2.5. Gold quantification

Biological samples were dried (48 h at 45°C) and then digested in *aqua regia* (0.25 volume of 65% HNO₃ - Carlo Erba Reagent, Dasit Group, Italy - and 0.75 volume of 37% HCl - SCP Science, Canada) at 100°C for 3 h (Fluka, Buchs, Switzerland). Muscle and food samples (weighing > 100 mg dry weight) were digested in 5 mL of *aqua regia*; blood, liver and kidney (tissues weight between 50 and 100 mg dw) in 3 mL of *aqua regia*; intestine (tissues weight between 10 and 30 mg dw) in 2 mL of *aqua regia*; brain, heart, gills and spleen (weighing < 10 mg dw) in 1 mL of *aqua regia*. All acid-digested samples were diluted 6-fold with ultrapure water (MilliQ, Bedford, MA, USA). Gold concentrations were expressed as µg Au g⁻¹ dw. The gold quantification in water samples were diluted with ultrapure acidified water (2% *aqua regia*) prior the analysis. Gold quantifications in fish tissues were performed by HR-ICP-MS (Element XR, Thermo Scientific) at the GET laboratory in Toulouse (<http://www.get.obs-mip.fr/>). The detection limit of the Element XR in fish digests was around 0.1 ng L⁻¹ for gold. Water gold concentrations in experimental tanks were determined by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (240Z AA spectrometer, Agilent Technologies, USA), whose detection limit was 0.1 µg Au L⁻¹. The analytical method was validated by the analyses of gold standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany), and for each samples series by checking an inter-laboratories biological reference material (gold contaminated asiatic clam *Corbicula fluminea*, concentration intercalibrated with six laboratories, data not shown). Gold recoveries reached 101 ± 1 % (n = 26).

Trophic transfer ratio was assessed after the 21-day exposure with the following calculation: [(organ gold quantity in fish ÷ ingested gold quantity) x 100].

2.6. RNA-sequencing analyses and bioinformatics pipeline

Total RNAs were extracted from liver and brain using SV Total RNA Isolation System (Promega) according to the manufacturer's instructions. NP10 eels were excluded for RNA-sequencing analyses (see result section 3.1). RNA-sequencing libraries were prepared by Genotoul (France) in order to perform analyses with the Illumina HiSeq 3000 technology. RNA reads results were registered in NCBI Gene Expression Omnibus under GEO accession XXX.

The read quality of the RNA-seq libraries was evaluated using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Cleaned and filtered reads were *de novo* assembled using DRAP version 1.7 (Cabau et al., 2017) (*de novo* RNA-Seq Assembly Pipeline, <http://www.sigenae.org/drap>) using the Trinity assembler version 2.0.6 and filtered with at least one FPKM. The resulting contigs were aligned with NCBI blast (blastx program, -e 1e-5 parameter, version 2.2.26) on Refseq protein, Swissprot and Ensembl protein reference files from *Danio rerio*, *Latimeria chalumnae* and *Lepisosteus oculatus* to retrieve the corresponding annotations. The contigs were also processed with rnammer (Lagesen et al., 2007) (standard parameters, version 1.2) to find ribosomal genes, with repeatmasker (Smith et al) (-engine crossmatch -gccalc -species *Danio rerio* parameters, version open-4-0-3) to list the contained repeats and with interproscan (Quevillon et al 2005) (-goterms-pathways parameters, version 4.8) for gene ontology and structural annotation. Reads have been realigned back to contigs with bwa (Li and Durbin, 2009) (standard parameters, mem algorithm, version 0.7.12). The resulting sam files were compressed, sorted and indexed with samtools (Li and Durbin, 2009) (view, sort and index programs, standard parameters, version 1.1). The contig expression counts have been generated from the bam files with samtools (idxstats program, standard parameters, version 1.1) and merged with unix commands (cut, paste). The alignment files have then been filtered for duplicates with samtools (rmdup program, standard parameters, version 1.1) before variant calling. The resulting bam files have been processed

with GATK (McKenna et al., 2010) (-glm BOTH parameter, version v3.0-0-g6bad1c6) following the best practices found on the GATK website. All the results have been uploaded in a RNAbrowse (Mariette et al., 2014) instance and can be accessed from the web.

2.7. Statistical analysis

Data were processed using R 3.3.0 collaborative statistical software (www.r-project.org/). For feeding behavior and gold bioaccumulation, comparisons among groups were performed using analysis of variance (ANOVA) with mean grouping using Tukey's test ($p < 0.05$) after checking assumptions (normality and homoscedasticity of error terms). Datasets underwent Box-Cox transformations in order to respect the ANOVA test assumptions.

Differential gene expressions between NP0 and NP1 eels were based on gene expression counts by using DESeq2 R package (Love et al 2014). P-values for differential gene expressions were corrected for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method, and a false discovery rate (FDR) was calculated. Gene ontology (GO) annotations were obtained with an E-value and a homology threshold set to 10^{-6} and 50%, respectively. GO analyzes were performed on Blas2GO 2.8 software.

3. Results

3.1. Mortality and eels feeding behavior

No mortality occurred during this experiment. Food consumption by eels was monitored during the 21-day exposure and reached a total of 32.5 ± 0.5 g dw for NP0, 31.0 ± 0.7 g dw for NP1 and 18.6 ± 6.3 g dw for NP10 (mean \pm SE, $n = 6$). Regarding the whole experiment, eels had significantly less eaten at the highest AuNP exposure level (*i.e.* NP10, $p = 0.04$) in food compared to controls and NP1.

In addition, NP10 eels presented erratic dietary intakes highlighted by extended standard error range.

3.2. Gold accumulation in eels tissues

Gold concentrations were below the detection limits for all organs except for intestine, kidney and liver (figure 2). For these three organs, no statistical difference in gold accumulation was shown among exposure levels excepted for the intestine in NP1 condition with a significant 13-fold increase compared to control. Kidney and liver of NP1 exposed eels presented a non-significant raising tendency in gold accumulation compared to controls.

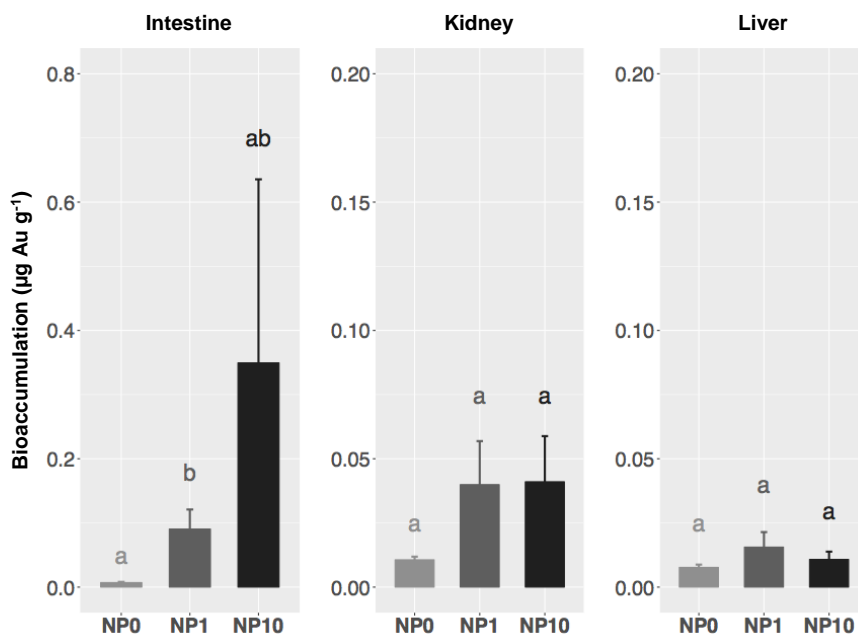


Figure 2: Gold accumulation in intestine, kidney and liver of the eels after a 21-day AuNPs trophic exposure at the three contamination levels (mean \pm SE, n = 6). Values are compared by variance analyses, letters indicate significant differences (p<0.05).

Despite a 10-concentration factor in food between NP1 and NP10 exposure levels, organs exhibited similar mean gold concentrations. Thus in relation to the low food consumptions of the eels, trophic transfer ratios for kidney and liver showed low values respectively of 0.0023 and 0.0015% at the NP1 exposure level. Ratios

tended to decrease beyond the quantifiable for NP10 exposure levels compared to NP1 reaching less than 2×10^{-5} %.

3.3. An overview of transcriptomic responses

De novo transcriptome assembly highlighted 50,479 transcript sequences. NP10 eels were excluded for the transcriptomic analysis due to their erratic feeding behavior compared to NP0 or NP1 eels (see section 3.1). AuNP trophic exposure led to significant differences in transcriptomic profiling compared to control eels in the liver and the brain (table 1). Taking into account the whole transcriptome, less than 1% of gene expression was altered due to AuNP trophic exposure. Divergences with the NP0 eel transcriptome were mainly higher for the liver compared to the brain of NP1 eels. For the liver, regardless of significance threshold (*i.e.* p-value < .05, .01 or .001), genes were more under- than over-expressed, while for the brain, distributions between under- and over-expressed appeared most homogeneous. The whole genes differently expressed in NP1 eels compared to NP0 eels were listed in supplementary informations (SI1 for the liver tissue and SI2 for the brain tissue).

Table 1: Number of genes differentially expressed in liver and brain of contaminated eels after a 21-day AuNPs exposure. Percentage are referring of the total number of transcripts.

	Total	Under-expressed	Over-expressed
<i>Liver</i>			
p<0.05	258 (0.51%)	177 (0.35%)	81 (0.16%)
p<0.01	100 (0.20%)	78 (0.15%)	22 (0.05%)
p<0.001	41 (0.08%)	33 (0.07%)	8 (0.01%)
<i>Brain</i>			
p<0.05	156 (0.31%)	94 (0.19%)	62 (0.12%)
p<0.01	65 (0.13%)	39 (0.08%)	26 (0.05%)
p<0.001	24 (0.04%)	12 (0.02%)	12 (0.02%)

3.4. Biological process distribution

Taking into account gene classifications by ontology, sequence distributions were broadly similar between brain and liver tissues, with gene expressions mainly down-regulated after a 21-day AuNP trophic exposure (figure 3). In agreement with table 1, gene expressions were more altered into the liver than in the brain, with up to 26 sequences assigned to the GO « regulation of cellular process » for the liver. Regarding the brain, « macromolecule metabolic process » and « transport » were the most impacted GO by AuNP according to number of sequences. Major functional categories of transcripts altered by trophic exposure to AuNPs might be grouped as follow: immune system (GO:0002250; GO:0002443; GO:0002682), metabolism-biosynthesis (GO:0043170; GO:0044249; GO:1901576; GO:0006725; GO:0034641; GO:0046483; GO:1901360; GO:0019222; GO:0006629; GO:0006793), stimulus (GO:0051716; GO:0048583), toxicity (GO:0031341; GO:0055114), transport/organization (GO:0006810; GO:0006996).

3.5. Enrichment analysis

Enrichment analysis was performed and significant results were pointed out for liver (table 2). Regarding biological process, immune system (GO:0002376; GO:0002697), response to stimulus (GO:0048583; GO:0048584; GO:0050896) and cell killing (GO:0001906) appeared to be impacted by AuNP exposure. Molecular functions clearly emphasized binding process (GO:0003823; GO:0042277; GO:0033218), mainly focused in membrane as cellular component (GO:0042611; GO:0042612; GO:0098797). Regarding the brain tissue, statistical analysis did not reveal any enrichment.

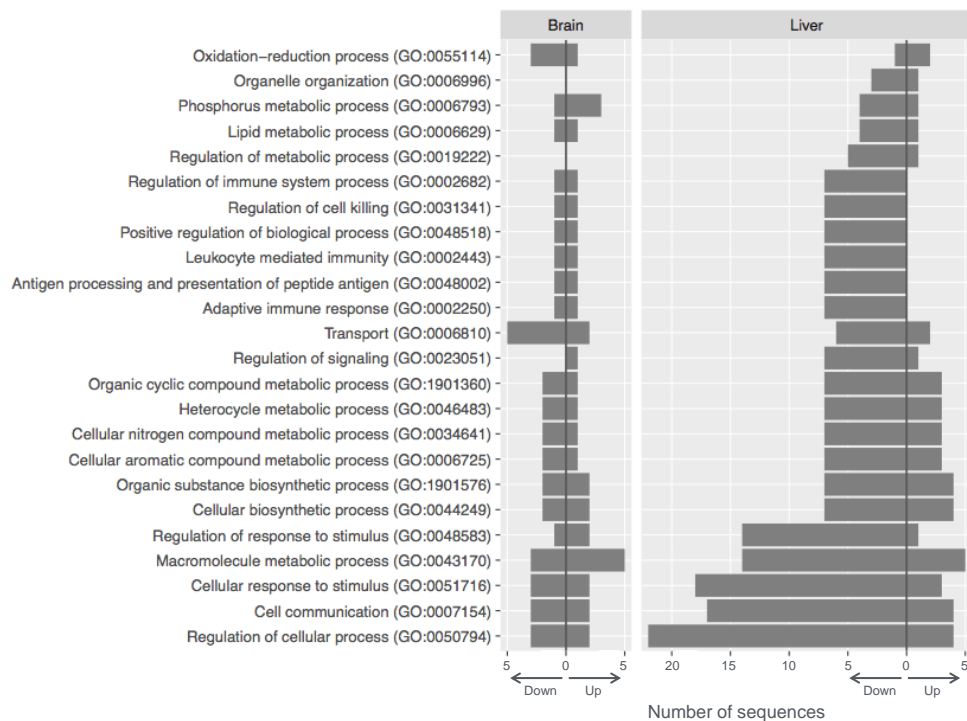


Figure 3: Gene ontology (GO) analysis regarding biological processes for brain and liver of the eels after a 21-day AuNPs trophic exposure. Distribution between number of sequences up- and down-regulated are for NP1 eels compared to control. GO with a total number of sequences higher than 3 at least one of organs were represented.

Table 2: Gene Ontology (GO) enrichment analysis from liver of contaminated eels after a 21-day AuNPs exposure.

term ID	Description	FDR
<i>Biological process</i>		
GO:0002376	Immune system process	6.07E-04
GO:0002697	Regulation of immune effector process	6.07E-04
GO:0048583	Regulation of response to stimulus	6.07E-04
GO:0001906	Cell killing	7.59E-04
GO:0048584	Positive regulation of response to stimulus	1.28E-03
GO:0050896	Response to stimulus	1.98E-03
GO:0048518	Positive regulation of biological process	1.49E-02
<i>Molecular function</i>		
GO:0003823	Antigen binding	3.04E-003
GO:0042277	Peptide binding	3.04E-003
GO:0033218	Amide binding	3.50E-003
<i>Cellular component</i>		
GO:0042611	MHC protein complex	3.73E-04
GO:0042612	MHC class I protein complex	9.68E-04
GO:0098797	Plasma membrane protein complex	9.20E-03

3.6. A shared transcriptomic responses between the liver and the brain tissues

Genes differentially expressed between NP0 and NP1 eels were compared for the liver and the brain in order to highlight a specific transcriptomic response due to AuNP trophic exposure. Thirteen genes were shared by the liver and the brain tissues (table 3) with 3 not annotated. The summary of major functions of each gene revealed an implication of immune responses for both organs, in addition to various cellular movements. Interestingly, 2 genes characteristic of the inflammasome (*nlr3* and *nlrp12*) were jointly over-expressed in the liver and the brain of NP1 eels. Overall, gene expression profilings were similar for both organs except for *tnrc6b* gene, involved in gene silencing by RNA.

Table 3: Genes differentially and jointly expressed for liver and brain. Fold changes (FC) were indicated compared to controls of the corresponding organ (n = 6).

Gene ID	Function/ Involvement	Liver		Brain	
		FDR	FC	FDR	FC
Citcontig_00047	Unknown	0.43E-2	2.52	0.46E-2	1.89
Citcontig_05910	Unknown	0.24E-5	0.22	0.19E-2	0.59
Citcontig_16608	Unknown	0.01	2.88	0.03	1.88
	<i>gstk1</i> Oxidation-reduction process	0.02	0.52	0.04	0.60
	<i>lamtor3</i> Regulation of late endosomal traffic and cell proliferation	0.01	2.19	0.12E-3	2.29
LOC100304631	Cell-specific chemotaxis	0.73E-4	3.79	0.03	1.92
	<i>mr1</i> Innate immunity	0.37E-3	0.26	0.84E-2	0.49
	<i>napb</i> Transport	0.11E-2	0.36	0.21E-2	0.46
	<i>nlr3</i> Innate immunity, inflammasome	0.01	1.89	0.04	1.73
	<i>nlrp12</i> Inflammasome	0.03	1.98	0.04	1.72
	<i>per3</i> Biological rhythms	0.04	0.51	0.34E-4	0.50
	<i>sptbn1</i> Cytoskeleton movement (calcium-dependent)	0.33E-2	1.94	0.44E-2	1.71
	<i>tnrc6b</i> RNA-mediated gene silencing	0.03	1.74	0.04	0.61

4. Discussion

This experiment aimed to study transfer and transcriptomic responses by RNA-sequencing approach in the eels at the end of a 21-day trophic exposure.

No mortality was noted throughout this experiment, neither within control eels (NP0) nor in contaminated eels (NP1, NP10). This observation was consistent with a study involving dietary exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to gold nanoparticles (12 and 50 nm) despite biochemical disturbances revealed in the muscle and the brain (Geffroy et al., 2012).

Regarding food intake, for the higher exposure level (NP10), eels presented an avoidance and erratic feeding behavior which was not observed for the NP0 and NP1 eels. Similar avoidance behavior were pointed out for the isopod *Porcellionides pruinosus* exposed to Ag nanoparticles by trophic route (Tourinho et al., 2015). The discontinuation of feeding were reported by Kasumyan (2001) for fish, and considered as a nonspecific response to high concentrations of toxicants or to a prolonged exposure in the polluted environment, previously highlighted for metal and organic contaminants.

To our knowledge, this is the first experiment regarding AuNP trophic transfer to a top predatory fish. Here, gold quantification in eel tissues neither revealed significant bioaccumulation except for the intestine. Conversely, Ramsden et al. (2009) showed a titanium transfer to rainbow trout after 10 weeks of spiked TiO₂ nanoparticle food (10 and 100 mg kg⁻¹), which get started from the 4th week according to the accumulation kinetics. The 10-fold lower exposure doses, the 3-fold shorter exposure period, and the 3-fold higher fish weight might explain this absence of significant transfer in the eels by comparison with Ramsden et al. (2009). Despite the removal of intestinal contents prior gold analysis, the rest of some food residuals might not have been excluded, restricting the ability to discern AuNP ad- or absorption to digestive tract. However, this result clearly emphasized an exposure of eel intestinal barrier to AuNP (NP1 condition).

Despite an absence of quantifiable trophic transfer, transcriptomic profilings revealed AuNP impacts at the end of the 21-day exposure period for the NP1 eels. For liver and brain tissues, respectively 0.51% and 0.31% of the total genes were

differentially expressed in NP1 eels compared to NP0 eels ($p < 0.05$). Similarly, gene expressions in zebrafish were altered even though gold was not detected in fish tissues after a 60-day trophic exposure (Geffroy et al., 2012). For comparison, Cho et al. (2009) investigated the gene expression responses in the mice liver after an intravenous administration of 4 or 100 nm PEG-coated AuNP ($4.26 \text{ mg Au kg}^{-1}$ of body weight) for 30 minutes. Only 0.38% (for 4 nm) and 0.50% (for 100 nm) of the total genes were differentially expressed in AuNP exposed mice (Cho et al., 2009), highlighting the same variation range of gene expressions compared to the present experiment, which similar chemical compositions of nanoparticles. In addition, authors pointed out that these genes were involved in apoptosis, inflammation and metabolic processes (Cho et al., 2009), showing the overall transcriptomic response similar to the present experiment although biological models and exposure modalities clearly differed. Thus, these two experiments tend to reveal analogous transcriptomic responses in the exposed organisms to PEG-coated AuNP, regardless of particle sizes.

In the present study, a clear immune response was highlighted in the liver by enrichment analysis. Engineered nanoparticles were already reported at the initiation of the immune response which corresponds to either a suppression or a stimulation (Dobrovolskaia and McNeil, 2007; Dwivedi et al., 2009; Ngobili and Daniele, 2016; Petrarca et al., 2015). Engineered nanoparticles might interact with the innate and adaptive immune systems (Cui and Mumper, 2002; Fytianos et al., 2015; García et al., 2013; Lutsiak et al., 2006; Yen et al., 2009). For example, after a single intratracheal instillation in mice (0.250 to 1 mg kg^{-1}) of Fe_3O_4 (5 nm, 23.14 mV), Park et al. (2010) noticed raising levels of cytokines and distribution modifications in lymphocyte types, emphasizing a chronic inflammation due to the persistent effects at 28 days. Immunotoxicity, defined as deregulated function of the immune system, contributes to the onset and development of various disorders (Ilinskaya and Dobrovolskaia, 2014). Regarding the present fish trophic exposure, gold nanoparticle induced immunotoxicity responses at transcriptomic level in absence of significant accumulation.

The intriguing common response in the liver and the brain, considering differential expressions of some genes, requires a careful attention. Two genes were subclassified in the NLR-receptor family, NLRC3 and NLRP12, corresponding to cytoplasmic proteins involved in many different biological processes including innate and adaptive immunity (Kufer and Sansonetti, 2011). The TRAF6 protein must be ubiquitinated to activate NF- κ B pathway, involved in inflammatory response (Chen, 2005). Schneider et al. (2012) exhibited the interaction between NLRC3 and TRAF6 which prevent the ubiquitination of TRAF6 leading to a downregulation of NF- κ B signaling in mouse cells. NLRC3 appeared as a negative feedback loop in inflammatory response. *In vitro* study also established the control by NLRC3 to the activation of STING pathway (stimulator of interferon genes), which mediates signaling events for the host defenses (Barber, 2015; Zhang et al., 2014). Regarding these dual roles, Mangan and Latz (2014) suggested that NLRC3 behaves as a watchdog to prevent an overshooting onset of immune responses in the wake of diverse immune stimuli. Another NLR, overexpressed in the liver and the brain eel tissues, NLRP12, appeared according to the literature as a critical checkpoint during inflammation, migration of immune cells and tumorigenesis (Allen et al., 2012). For example, NLRP12 is implicated to maintain intestine homeostasis and to provide protection against colorectal tumorigenesis (Kaki et al., 2012). Recent study pointed out the NLRP12 implication in the inflammasome, leading to activation of caspase-1-dependent cytokines, and NLRP12 propensity to suppress NF- κ B-kinase-dependent immune cell activation (Zaki et al., 2014). NLRP12 presented divergent functions highlighting its differential role in defense mechanisms, currently misunderstood (Claes et al., 2015). Several particulate materials, such as silica, asbestos, and carbon nanotubes, were highlighted as inflammasome activators (Baron et al., 2015; Dostert et al., 2008; Naji et al., 2016). To our knowledge, this is the first evidence of inflammasome responses to nanoparticles regarding to ecotoxicological literature. In addition, NLR subfamily might regulate the transcription of Major Histocompatibility Complex (MHC)

(Kobayashi and van den Elsen, 2012), a protein group on cell surfaces which are crucial for an effective adaptative immune response. Interestingly, MHC appeared as enriched cellular component in the eel liver and with *mr1* in common genes differentially expressed in the liver and the brain tissues. These results might indicate the onset of adaptative immune response in AuNP exposed eels.

Considering the whole experiment results, eel gut might appear as the potential starter of the revealed immunotoxicity. Several hypotheses might support the immune response propagation from nanoparticles in absence of quantifiable transfer to organs. Firstly, nanoparticles might be suspected to disrupt gut microbiota (Pietrojusti et al., 2016). For example, a study reported a disturbance for bacterial evenness and population in the mice gut microbiota after a 28-day silver nanoparticle dietary exposure (van den Brule et al., 2015). Williams et al. (2015) assessed the effects of silver nanoparticle subchronic dietary exposure on the gut microbiota and gut-associated immune responses. Rats exhibited a gut microbiome shift towards a larger proportion of gram negative bacteria jointly to a gut associated immune response with an expression decrease of immunomodulatory genes (Williams et al., 2015). In addition, the activity of gut microbial populations also plays an important role in host health (Bennett et al., 2015) and the gut–liver axis emerges as an area of interest in the microbial-mammalian metabolic axis (Russell et al., 2013). A recent study demonstrated the direct involvement of the gut microbiota on whole body glucose homeostasis and on liver lipid metabolism with the development of associated disease (Le Roy et al., 2013). Regarding the brain tissues, microbiota-gut-brain axis is also considered as a bidirectional communication which includes immune, endocrine and metabolic pathways (Dinan and Cryan, 2017). Present results highlighted a differential expression in both studied tissues for *per3* gene, involved in biological rhythms. Thaiss et al. (2016) pointed out the bidirectional regulation between gut microbiota and rhythms, showing that disruption of homeostatic microbiome rhythmicity incited genome-wide *de novo* oscillations in the intestine and the liver tissues. Secondly, in this experiment, gastrointestinal tract was the first and the

only one eel biological barrier in contact with AuNP. Regarding dietary exposure, Bettini et al. (2017) reported the TiO₂ nanoparticle propensity to generate immune responses in rat intestine by affecting dendritic cell frequencies and T cell populations in the Peyer's patches. Here, RNA-sequencing results exhibited a clear immune response in the liver and brain tissues. Gastrointestinal tract is referred as an important involvement in immune function (Bergin and Witzmann, 2013) and might initiate immune response in the whole organism. For example, El Aidy et al. (2014) emphasized the implication of cytokine molecules as communication route in immune signaling from gut to brain. Thirdly and finally, due to AuNP presence in the digestive tract of exposed eels, disruption of digestive function might also be suspected. Guo et al. (2017) examined *in vitro* the TiO₂ nanoparticle effects (30 nm) on small intestinal epithelium cells in order to assess TiO₂ influences on intestinal barrier functions. The decrease in absorptive microvilli in exposed cells and the alteration of nutrient transporter protein gene expression might explain the significant iron, zinc, and fatty acid transport decrease following exposure to TiO₂ nanoparticles (Guo et al., 2017). Here, GO term distribution (figure 3) exhibited numerous sequences in the liver associated to metabolic and biosynthetic processes. According to literature, these results might suggest a nutrient flow impairments as consequence of intestinal disorders due to AuNP exposure.

5. Conclusions

At the light of the present results, gold nanoparticles were not transferred from enriched food to eels. At the highest exposure level, eels presented an erratic feeding behavior. Significant gold concentrations were only measured in the intestine tissues of NP1 eels. In absence of gold transfer, transcriptomic responses after AuNP trophic exposure were revealed in the liver and the brain tissues (NP1), with some common genes differentially expressed by both organs. As discussed, the intestine tissue might contribute to the transcriptomic responses in the liver and the brain, emphasizing the necessity to study it in future experiments.

Acknowledgments

The authors thanks: Florence Daniel for her daily help and her technical cooperation; Maria Gonzalez to make fish fillets and eel dissections; Pierre-Yves Gourves and Nathalie Mesmer-Dudons for eel dissections; Henri Bouillard and Christian Portier for the experimental room fittings. This work was supported by the French National Research Agency (ANR CITTOXIC-Nano program – ANR-14-CE21-0001-01) and the Investments for the Future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). Fanny Perrier was supported by a grant from the French Ministry of Research.

Conflict of Interest

None of the authors report any conflict of interest or other relationship or activity that could appear to have influenced the submitted work.

References

- Abdelhalim, M.A.K., M. Mady, M., 2012. Physical properties of different gold nanoparticles: ultraviolet-visible and fluorescence measurements. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 3, 1–5. doi:10.4172/2157-7439.1000133
- Aidy, S. El, Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2014. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Front. Microbiol.* 5, 3–6. doi:10.3389/fmicb.2014.00146
- Akiyama, Y., Mori, T., Katayama, Y., Niidome, T., 2009. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *J. Control. Release* 139, 81–84. doi:10.1016/j.jconrel.2009.06.006
- Allen, I.C., Wilson, J.E., Schneider, M., Lich, J.D., Roberts, R.A., Arthur, J.C., Woodford, R.M.T., Davis, B.K., Uronis, J.M., Herfarth, H.H., Jobin, C.,

- Rogers, A.B., Ting, J.P.Y., 2012. NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- κ B Signaling. *Immunity* 36, 742–754. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.012
- Antosh, M.P., Wijesinghe, D.D., Shrestha, S., Lanou, R., Huang, Y.H., Hasselbacher, T., Fox, D., Neretti, N., Sun, S., Katenka, N., Cooper, L.N., Andreev, O.A., Reshetnyak, Y.K., 2015. Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5372–6. doi:10.1073/pnas.1501628112
- Baalousha, M., Yang, Y., Vance, M.E., Colman, B.P., McNeal, S., Xu, J., Blaszczak, J., Steele, M., Bernhardt, E., Hochella, M.F., 2016. Outdoor urban nanomaterials: The emergence of a new, integrated, and critical field of study. *Sci. Total Environ.* 557–558, 740–753. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.132
- Barber, G.N., 2015. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 760–770. doi:10.1038/nri3921
- Baron, L., Gombault, A., Fanny, M., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Panek, C., Le Bert, M., Lagente, V., Rassendren, F., Riteau, N., Couillin, I., 2015. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis.* 6, 1629. doi:10.1038/cddis.2014.576
- Baudrimont, M., Andrei, J., Mornet, S., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Gourves, P.-Y., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Geffard, O., Garric, J., Feurtet-Mazel, A., 2017. Trophic transfer and effects of gold nanoparticles (AuNPs) in *Gammarus fossarum* from contaminated periphytic biofilm. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-017-8400-3
- Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., 2008. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 1483–1491. doi:10.1093/icesjms/fsn112

- Bennett, B.J., Hall, K.D., Hu, F.B., McCartney, A.L., Roberto, C., 2015. Nutrition and the science of disease prevention: A systems approach to support metabolic health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1352, 1–12. doi:10.1111/nyas.12945
- Bergin, I., Witzmann, F.A., 2013. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* 3. doi:10.1504/IJBNN.2013.054515.Nanoparticle
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J.-P., Carrière, M., Audinot, J.-N., Pierre, F.H., Guzylack-Piriou, L., Houdeau, E., 2017. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 7, 40373. doi:10.1038/srep40373
- Bogdanov, A.A., Gupta, S., Koshkina, N., Corr, S.J., Zhang, S., Curley, S.A., Han, G., 2015. Gold nanoparticles stabilized with MPEG-Grafted Poly(l-lysine): in vitro and in vivo evaluation of a potential theranostic agent. *Bioconjug. Chem.* 26, 39–50. doi:10.1021/bc5005087
- Boisselier, E., Astruc, D., 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1759–1782. doi:10.1039/b806051g
- Brisson, A., Mornet, S., 2013. Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins, application to the high-density labeling of cell membranes 1.
- Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Chatel, A., Berthet, B., Métais, I., Perreinetjani, H., Poirier, L., Luna-acosta, A., Thomas-guyon, H., Faverney, C.R., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-jones, E., Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and

toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114

Caballero-Guzman, A., Nowack, B., 2016. A critical review of engineered nanomaterial release data: Are current data useful for material flow modeling? *Environ. Pollut.* 213, 502–517. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.028

Cabau, C., Escudié, F., Djari, A., Guiguen, Y., Bobe, J., Klopp, C., 2017. Compacting and correcting Trinity and Oases RNA-Seq de novo assemblies. *PeerJ* 5, e2988. doi:10.7717/peerj.2988

Cardoso, E., Rezin, G.T., Zanoni, E.T., de Souza Notoya, F., Leffa, D.D., Damiani, A.P., Daumann, F., Rodriguez, J.C.O., Benavides, R., da Silva, L., Andrade, V.M., Da Silva Paula, M.M., 2014. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 766–767, 25–30. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.05.009

Cedervall, T., Hansson, L.A., Lard, M., Frohm, B., Linse, S., 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One* 7, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0032254

Chen, Z.J., 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758–65. doi:10.1038/ncb0805-758

Cheng, Y., Dai, Q., Morshed, R.A., Fan, X., Wegscheid, M.L., Wainwright, D.A., Han, Y., Zhang, L., Auffinger, B., Tobias, A.L., Rincon, E., Thaci, B., Ahmed, A.U., Warnke, P.C., He, C., Lesniak, M.S., 2014. Blood-brain barrier permeable gold nanoparticles: An efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. *Small* 10, 5137–5150. doi:10.1002/sml.201400654

- Chichova, M., Shkodrova, M., Vasileva, P., Kirilova, K., Doncheva-Stoimenova, D., 2014. Influence of silver nanoparticles on the activity of rat liver mitochondrial ATPase. *J. Nanoparticle Res.* 16. doi:10.1007/s11051-014-2243-3
- Cho, W.S., Kim, S., Han, B.S., Son, W.C., 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. doi:10.1016/j.toxlet.2009.08.010
- Claes, A.-K., Zhou, J.Y., Philpott, D.J., 2015. NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. *Physiology* 30, 241–250. doi:10.1152/physiol.00025.2014
- Croteau, M.-N., Dybowska, A.D., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5, 79–90. doi:10.3109/17435390.2010.501914
- Cui, Z., Mumper, R.J., 2002. Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses. *Int. J. Pharm.* 238, 229–239. doi:10.1016/S0378-5173(02)00079-0
- de Boer, J., van der Valk, F., Kerkhoff, M., Hagel, P., 1994. 8-year study on the elimination of PCBs and other organochlorine compound from eel under nature conditions. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2242–2248.
- Dedeh, A., Ciutat, A., Treguer-delapierre, M., Bourdineaud, J.-P., 2014. Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment. *Nanotoxicology* 5390, 1–10. doi:10.3109/17435390.2014.889238
- Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2017. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J. Physiol.* 595, 489–503.

doi:10.1113/JP273106

Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E., 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2, 469–478.

Dostert, C., Pétrilli, V., Bruggen, R. Van, Steele, C., Mossman, B.T., Tschopp, J., 2008. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* (80-.). 674, 674–677. doi:10.1126/science.1156995

Dwivedi, P.D., Misra, A., Shanker, R., Das, M., 2009. Are nanomaterials a threat to the immune system? *Nanotoxicology* 3, 19–26. doi:10.1080/17435390802604276

Ferry, J.L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P.L., Fulton, M.H., Scott, I.G., Decho, A.W., Kashiwada, S., Murphy, C.J., Shaw, T.J., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nat. Nanotechnol.* 4, 441–444. doi:10.1038/nnano.2009.157

Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., Labille, J., Rose, J., Garric, J., 2012. Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route. *Environ. Pollut.* 163, 55–61. doi:10.1016/j.envpol.2011.11.035

Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M.I., Unger, R.E., Weksler, B.B., Romero, I. a., Couraud, P.-O., Kirkpatrick, C.J., 2012. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres : comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 1. doi:10.1186/1743-8977-9-23

Fytianos, K., Rodriguez-Lorenzo, L., Clift, M.J.D., Blank, F., Vanhecke, D., von Garnier, C., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2015. Uptake efficiency of surface modified gold nanoparticles does not correlate with functional changes and cytokine secretion in human dendritic cells in vitro.

- Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 11, 633–644.
doi:10.1016/j.nano.2014.11.004
- García, C.P., Sumbayev, V., Gilliland, D., Yasinska, I.M., Gibbs, B.F., Mehn, D., Calzolari, L., Rossi, F., 2013. Microscopic Analysis of the Interaction of Gold Nanoparticles with Cells of the Innate Immune System. *Sci. Rep.* 3, 1326.
doi:10.1038/srep01326
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: A review. *Ecotoxicology* 19, 239–266. doi:10.1007/s10646-009-0424-0
- Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brèthes, D., Bourdineaud, J.-P., 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.
doi:10.3109/17435390.2011.562328
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H.L., 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 11.
doi:10.1186/1743-8977-11-11
- Guo, Z., Martucci, N.J., Moreno-Olivas, F., Tako, E., Mahler, G.J., 2017. Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine. *NanoImpact* 5, 70–82.
doi:10.1016/j.impact.2017.01.002
- Huerta-García, E., Pérez-Arizti, J.A., Márquez-Ramírez, S.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Chirino, Y.I., Iglesias, G.G., López-Marure, R., 2014. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 73C, 84–94.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026

- Ilinskaya, A.N., Dobrovolskaia, M.A., 2014. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3988–4000. doi:10.1111/bph.12722
- Jackson, B., Bugge, D., Ranville, J., Chen, C., 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5550–5556. doi:10.1021/es202864r
- Jarvis, T.A., Miller, R.J., Lenihan, H.S., Bielmyer, G.K., 2013. Toxicity of ZnO nanoparticles to the copepod *Acartia tonsa*, exposed through a phytoplankton diet. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1264–1269. doi:10.1002/etc.2180
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Pollut.* 158, 2900–2905. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.009
- Kasumyan, A.O., 2001. Effects of Chemical Pollutants on Foraging Behavior and Sensitivity of Fish to Food Stimuli. *J. Ichthyol.* 41, 76–87.
- 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. doi:10.1021/jp061667w
- Kobayashi, K.S., van den Elsen, P.J., 2012. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 813–820. doi:10.1038/nri3339
- Kufer, T., Sansonetti, P.J., 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat. Immunol.* 12, 121–128. doi:10.1038/ni.1985
- Ladhar, C., Geffroy, B., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Durand, E., Brèthes, D., Bourdineaud, J.-P., 2013. Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure.

Nanotoxicology 8, 676–685. doi:10.3109/17435390.2013.822116

Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E.A., Stærfeldt, H.H., Rognes, T., Ussery, D.W., 2007. RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 35, 3100–3108. doi:10.1093/nar/gkm160

Larguinho, M., Correia, D., Diniz, M.S., Baptista, P. V., 2014. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels. *J. Nanoparticle Res.* 16, 1–11. doi:10.1007/s11051-014-2549-1

Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., Perlemuter, G., Cassard-Doulier, A.-M., Gérard, P., 2013. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 62, 1787–1794. doi:10.1136/gutjnl-2012-303816

Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324

Lutsiak, M.E.C., Kwon, G.S., Samuel, J., 2006. Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 739–747. doi:10.1211/jpp.58.6.0004

Mangan, M.S.J., Latz, E., 2014. NLRC3 puts the brakes on STING. *Immunity* 40, 305–306. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.007

Mariette, J., Noirot, C., Nabihoudine, I., Bardou, P., Hoede, C., Djari, A., Cabau, C., Klopp, C., 2014. RNAbrowse: RNA-Seq de novo assembly results browser. *PLoS One* 9, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0096821

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-

generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110

McTeer, J., Dean, A.P., White, K.N., Pittman, J.K., 2014. Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 8, 305–316. doi:10.3109/17435390.2013.778346

Naji, A., Muzembo, B.A., Yagyu, K.-I., Baba, N., Deschaseaux, F., Sensebé, L., Sukanuma, N., 2016. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 6, 26162. doi:10.1038/srep26162

Ngobili, T.A., Daniele, M.A., 2016. Nanoparticles and direct immunosuppression. *Exp. Biol. Med.* 241, 1064–1073. doi:10.1177/1535370216650053

Nowack, B., Brouwer, C., Geertsma, R.E., Heugens, E.H.W., Ross, B.L., Toufektsian, M., Wijnhoven, S.W.P., Aitken, R.J., 2013. Analysis of the occupational, consumer and environmental exposure to engineered nanomaterials used in 10 technology sectors. *Nanotoxicology* 7, 1152–1156. doi:10.3109/17435390.2012.711863

Park, E.-J., Kim, H., Kim, Y., Yi, J., Choi, K., Park, K., 2010. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 275, 65–71. doi:10.1016/j.tox.2010.06.002

Petrarca, C., Clemente, E., Amato, V., Pedata, P., Sabbioni, E., Bernardini, G., Iavicoli, I., Cortese, S., Niu, Q., Otsuki, T., Paganelli, R., Di Gioacchino, M., 2015. Engineered metal based nanoparticles and innate immunity. *Clin. Mol. Allergy* 13, 13. doi:10.1186/s12948-015-0020-1

Pierron, F., Baudrimont, M., Lucia, M., Durrieu, G., Massabuau, J.C., Elie, P.,

2008. Cadmium uptake by the European eel: Trophic transfer in field and experimental investigations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 10–19. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.11.018
- Pietroiusti, A., Magrini, A., Campagnolo, L., 2016. New frontiers in nanotoxicology: Gut microbiota/microbiome-mediated effects of engineered nanomaterials. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299, 90–95. doi:10.1016/j.taap.2015.12.017
- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18, 939–951. doi:10.1007/s10646-009-0357-7
- 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*). *Gold Bull.* 41, 116–126. doi:10.1007/BF03216589
- Russell, W.R., Hoyles, L., Flint, H.J., Dumas, M.E., 2013. Colonic bacterial metabolites and human health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 246–254. doi:10.1016/j.mib.2013.07.002
- Schneider, M., Zimmermann, A.G., Roberts, R.A., Zhang, L., Swanson, K. V., Wen, H., Davis, B.K., Allen, I.C., Holl, E.K., Ye, Z., Rahman, A.H., Conti, B.J., Eitas, T.K., Koller, B.H., Ting, J.P.-Y., 2012. The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- κ B. *Nat. Immunol.* 13, 823–831. doi:10.1038/ni.2378
- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., Flora, S.J.S., 2014. Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative

stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 336–47. doi:10.3109/01480545.2013.866134

Simon, D.F., Domingos, R.F., Hauser, C., Hutchins, C.M., Zerges, W., Wilkinson, K.J., 2013. Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4774–4785. doi:10.1128/AEM.00998-13

Stoeger, T., Takenaka, S., Frankenberger, B., Ritter, B., Karg, E., Maier, K., Schulz, H., Schmid, O., 2009. Deducing in vivo toxicity of combustion-derived nanoparticles from a cell-free oxidative potency assay and Metabolic activation of organic compounds. *Environ. Health Perspect.* 117, 54–60. doi:10.1289/ehp.11370

Stone, V., Donaldson, K., 2006. Nanotoxicology: Signs of stress. *Nat. Nanotechnol.* 1, 23–24. doi:10.1038/nnano.2006.69

Tangaa, S.R., Selck, H., Winther-Nielsen, M., Khan, F.R., 2016. Trophic transfer of metal-based nanoparticles in aquatic environments: a review and recommendations for future research focus. *Environ. Sci. Nano* 3, 966–981. doi:10.1039/C5EN00280J

Tesch, F.W., 2003. *The Eel*, Blackwell Science Ltd. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.00509a.x

Thaiss, C.A., Levy, M., Korem, T., Dohnalová, L., Shapiro, H., Jaitin, D.A., David, E., Winter, D.R., Gury-BenAri, M., Tatirovsky, E., Tuganbaev, T., Federici, S., Zmora, N., Zeevi, D., Dori-Bachash, M., Pevsner-Fischer, M., Kartvelishvily, E., Brandis, A., Harmelin, A., Shibolet, O., Halpern, Z., Honda, K., Amit, I., Segal, E., Elinav, E., 2016. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell* 167, 1495–1510.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.003

- Tourinho, P.S., Van Gestel, C.A.M., Jurkschat, K., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2015. Effects of soil and dietary exposures to Ag nanoparticles and AgNO₃ in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*. *Environ. Pollut.* 205, 170–177. doi:10.1016/j.envpol.2015.05.044
- van den Brule, S., Ambroise, J., Lecloux, H., Levard, C., Soulas, R., De Temmerman, P.-J., Palmari-Pallag, M., Marbaix, E., Lison, D., 2015. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. Part. *Fibre Toxicol.* 13, 38. doi:10.1186/s12989-016-0149-1
- Wang, Z., Yin, L., Zhao, J., Xing, B., 2016. Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Res.* 95, 250–259. doi:10.1016/j.watres.2016.03.027
- Williams, K., Milner, J., Boudreau, M.D., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2015. Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology* 9, 279–289. doi:10.3109/17435390.2014.921346
- Wise, J.P., Goodale, B.C., Wise, S.S., Craig, G.A., Pongan, A.F., Walter, R.B., Thompson, W.D., Ng, A.K., Aboueissa, A.E.M., Mitani, H., Spalding, M.J., Mason, M.D., 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat. Toxicol.* 97, 34–41. doi:10.1016/j.aquatox.2009.11.016
- Yen, H.-J., Hsu, S., Tsai, C.-L., 2009. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small* 5, 1553–1561. doi:10.1002/smll.200900126
- Zaki, M.H., Man, S.M., Vogel, P., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., 2014. Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 385–390.

doi:10.1073/pnas.1317643111

Zhang, L., Mo, J., Swanson, K. V., Wen, H., Petrucelli, A., Gregory, S.M., Zhang, Z., Schneider, M., Jiang, Y., Fitzgerald, K.A., Ouyang, S., Liu, Z.J., Damania, B., Shu, H.B., Duncan, J.A., Ting, J.P.Y., 2014. NLRC3, a member of the NLR family of proteins, is a negative regulator of innate immune signaling induced by the DNA sensor STING. *Immunity* 40, 329–341. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.010

Zhao, C.M., Wang, W.X., 2010. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7699–7704. doi:10.1021/es101484s

4.3 Conclusion

Aucune mortalité n'a été observée pour cette expérience. Les dosages de l'or dans l'eau d'exposition des anguilles n'ont révélé aucune présence d'or, permettant de ne considérer ici que l'exposition par la voie trophique.

Les anguilles exposées à la plus forte concentration dans la nourriture enrichie ($10 \mu\text{g Au g}^{-1}\text{MF}$) ont consommé en moyenne moins de nourriture. Le suivi journalier montre que ce comportement d'évitement a commencé dès le début de l'exposition. Après 21 jours d'exposition, les analyses du plasma sanguins n'ont révélé aucune différence significative avec les témoins, à l'exception de l'aspartate transaminase (AST) pour les anguilles du groupe NP10 (table 4.1). Pour éviter toutes interférences avec des effets biologiques liés à ce jeûne, les anguilles de cette condition expérimentale ont été écartées des analyses de transcriptomique.

TABLE 4.1 – Dosages de paramètres chimiques du plasma sanguin, réalisés par un laboratoire d'analyses vétérinaires, des anguilles après 21 jours d'exposition aux nanoparticules d'or (moyenne \pm ES, $n = 6$). Les valeurs sont comparées par une analyse de variance, les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0.05$).

	Unit	NP0 mean \pm SE	NP1 mean \pm SE	NP10 mean \pm SE
Total Protein	g L ⁻¹	45.5 \pm 1.4 ^a	43.9 \pm 1.9 ^a	46.5 \pm 1.3 ^a
Albumin	g L ⁻¹	10.4 \pm 0.8 ^a	9.7 \pm 0.8 ^a	9.1 \pm 0.7 ^a
Uric Acid	mg L ⁻¹	4.9 \pm 0.6 ^a	4.4 \pm 0.4 ^a	4.6 \pm 0.5 ^a
Chloride	mEq L ⁻¹	138.9 \pm 1.4 ^a	140.5 \pm 1.5 ^a	144.5 \pm 0.9 ^a
Potassium	mEq L ⁻¹	5.8 \pm 0.4 ^a	5.7 \pm 0.4 ^a	5.1 \pm 0.3 ^a
Sodium	mEq L ⁻¹	151.0 \pm 0.8 ^a	151.5 \pm 1.1 ^a	150.0 \pm 1.0 ^a
AST	U L ⁻¹	276.3 \pm 29.1 ^a	218.5 \pm 35.7 ^a	163.2 \pm 22.7 ^b
Gamma-GT	U L ⁻¹	14.8 \pm 1.8 ^a	10.4 \pm 1.4 ^a	14.5 \pm 2.6 ^a
ALP	U L ⁻¹	13.0 \pm 2.5 ^a	12.1 \pm 1.7 ^a	16.1 \pm 1.9 ^a
Creatinine	mg L ⁻¹	1.0 \pm 0.0 ^a	2.9 \pm 1.3 ^a	1.3 \pm 0.3 ^a
Urea	g L ⁻¹	0.12 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a	0.15 \pm 0.02 ^a

CHAPITRE 4. TRANSFERT ET RÉPONSES TRANSCRIPTOMIQUES SANS A PRIORI D'UN POISSON PRÉDATEUR À L'EXPOSITION TROPHIQUE

Les dosages d'or, effectués dans 9 organes différents (branchies, cerveau, coeur, foie, intestin vidangé, muscle, rate, sang) à la suite de l'exposition de 21 jours, n'ont révélé aucune différence significative d'accumulation entre les conditions, à l'exception de l'intestin pour la condition intermédiaire ($1 \mu\text{g Au g}^{-1}\text{MF}$). Cela confirme l'ingestion par l'anguille de nourriture contenant des nanoparticules. Ces résultats illustrent aussi l'absence d'internalisation des nanoparticules d'or par l'anguille dans le cadre de cette expérience.

Malgré l'absence de transfert, des effets transcriptomiques sont observés grâce à l'approche sans *a priori* dans le foie et le cerveau des anguilles exposées. Au regard de l'ensemble du transcriptome de l'anguille, soit 50 479 transcrits, 258 et 156 gènes sont significativement différemment exprimés dans le foie et le cerveau, respectivement, chez les anguilles exposées aux nanoparticules d'or par comparaison aux anguilles non-exposées. En considérant le nombre total de transcrits, cela correspond à une expression différentielle de 0,51% de gènes pour le foie et 0,31% pour le cerveau. Pour le foie, les analyses d'enrichissement ont montré que l'exposition trophique génère des effets associés au système immunitaire, à la réponse au stimulus et à la mort cellulaire. Par ailleurs, une dizaine de gènes est conjointement exprimés dans le foie et le cerveau, deux organes aux fonctionnements biologiques distincts par essence. Cette réponse commune entre le foie et le cerveau implique notamment des gènes de l'inflammasome, et un gène associé aux rythmes biologiques.

Après 21 jours d'exposition trophique, les résultats de cette étude conduite chez l'anguille illustrent (1) une modification possible de prise alimentaire liée à la présence de nanoparticules, (2) une absence de transfert avec internalisation et (3) l'induction d'une réponse transcriptomique dans le foie et le cerveau.

Chapitre 5

Étude expérimentale d'une chaîne alimentaire à trois maillons

5.1 Introduction

Dans le cadre de la problématique des nanomatériaux, l'un des enjeux actuels consiste en la réalisation d'études dont le design expérimental tend à la représentativité environnementale. Pour cela, différentes stratégies d'exposition peuvent être envisagées, à savoir : les expositions multi-espèces, les expositions mimant les chaînes trophiques en conditions contrôlées et les expositions menées en extérieur (BOUR et al. 2015a). Par ailleurs, il a récemment été souligné que les expérimentations sur le transfert trophique jusqu'aux prédateurs aquatiques font défaut dans la littérature (TANGAA et al. 2016). De la difficulté expérimentale inhérente à la réalisation de chaînes trophiques en laboratoire, résulte sans doute le peu d'études dans la littérature.

Ainsi, afin de prendre en compte ces différents constats, cette expérience a été conçue afin de permettre la réalisation d'une chaîne trophique à trois maillons en conditions contrôlées de laboratoire. De plus, à notre connaissance, aucune étude ne renseigne pour l'heure le transfert trophique des nanoparticules d'or dans une chaîne aquatique à trois maillons.

L'expérience présentée dans ce chapitre a été réalisée en deux phases, à savoir : une contamination des corbicules par des algues phytoplanctoniques, puis dans un second temps, le nourrissage des anguilles avec les

corbicules préalablement contaminés. Le terme de *continuum* trophique, utilisé dans ce chapitre, évoque cette réalisation séquentielle du mode opératoire, permettant de renseigner principalement la voie trophique. D'autres protocoles réalisés de manière séquentielle pour étudier la voie trophique ont également été utilisés par CEDERVALL et al. (2012), CHAE et al. (2016).

La première phase correspond à un dispositif d'apport en continu d'une solution d'algues et de nanoparticules. Réalisé en circuit ouvert, avec un renouvellement complet par jour, ce dispositif permet d'assurer la constance dans le temps (1) des propriétés physico-chimiques du milieu et (2) de la pression de contamination. Ainsi, ce dispositif est adapté pour la réalisation de cinétique de bioaccumulation pour les organismes filtreurs. Les corbicules sont congelés, servant ensuite de proie pour les anguilles. Les anguilles, individuellement séparées pour permettre le suivi de leur consommation alimentaire, sont nourries avec les organismes précédemment contaminés. Le dispositif d'exposition des anguilles est également un circuit ouvert. À la suite des 21 jours d'exposition, l'accumulation de l'or est quantifiée dans l'intestin, le foie, les reins et les branchies des anguilles.

En parallèle de l'évaluation du transfert des nanoparticules dans une chaîne trophique à trois maillons, la réponse transcriptomique de l'anguille, par une approche q-PCR, a également été évaluée. La sélection des gènes d'intérêt a été réalisée à la lumière des résultats de séquençage (CHAPITRE 4), afin de confirmer (ou non) la réponse transcriptomique aux nanoparticules d'or dans le cadre d'une exposition qui se veut plus « naturelle » (relativement à la nourriture enrichie).

5.2 **ARTICLE : Gold nanoparticles transfer throughout a three level trophic chain leads to transcriptomic responses in the top predator, *Anguilla anguilla***

(Article en préparation)

Gold nanoparticles transfer throughout a three level trophic chain leads to transcriptomic responses in the top predator, *Anguilla anguilla*

Fanny Perrier¹, Agnès Feurtet-Mazel¹, Magalie Baudrimont¹, Stéphane Mornet², Bruno Etcheverria¹, Olivier Simon³

¹ Université de Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

² ICMCB, 87 Avenue du Dr Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

³ LECO, IRSN, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

Corresponding author

Magalie Baudrimont

Magalie BAUDRIMONT

Place du Docteur Peyneau

33120 Arcachon, FRANCE

Ph. +335.56.22.39.27

magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

Abstract

Nanotechnology increasing use will probably result in nanomaterials release in aquatic environments which might be finally introduced into food webs. Among nanoparticle studies, informations on trophic transfer and consequent effects in natural and complex food chains are still limited. This experiment focused on spherical gold nanoparticles (AuNP, PEG-coated, 10 nm⁺) transfer and associated effects throughout an experimental three trophic level *continuum* (algae *Senedesmus sp.* - clams *Corbicula fluminea* - European eels *Anguilla anguilla*). The clams were continuously exposed to contaminated algae (480 µg Au L⁻¹) for 15 days and finally, the eels were fed for 21 days by the previous contaminated clams. Gold concentrations were measured throughout the trophic chain for transfer assessment. Bioaccumulation kinetics were performed on the clams and transcriptomic responses to « natural » trophic exposure to nanoparticles were investigated in the eels. Algae appeared to sorb about 85% of the initial gold supplied to the system. The exposed clams accumulated significant gold concentrations in their soft tissues, with the highest concentrations observed into visceral mass. Bioaccumulation factor from algae to clams might be assessed as 406. Then, transfer was also pointed out from the clams to the eels with a 2.9% trophic transfer ratio in the liver tissues after the 21-day exposure. Differential gene expressions revealed significant effects generated by AuNP in exposed eels. This study clearly exhibits the AuNP propensity to transfer in « natural » food chains at low dose of exposure and exert molecular toxic effects on top predators, highlighting the potential hazard for aquatic ecosystems.

Keyword

Nanoparticles, trophic transfer, algae, *Corbicula fluminea*, *Anguilla anguilla*, transcriptomic responses

1. Introduction

Due to the significant rise of nanomaterial applications, associated technologies might achieve a \$3 trillion market value by 2020 according to Roco et al. (2011). As a result, these nano-products are suspected to be released in the environment through various pathways such as atmospheric depositions (Montes et al 2012), urban runoff (Kaegi et al., 2010; Künniger et al., 2014) or wastewater treatment (Ma et al., 2013). Thus, nanomaterials transfer and their related ecological impacts are of major concern.

Trophic relations constitute one of the main interactions among organisms in ecosystem, involving equilibrium and inter-regulation for the predator and prey species. Trophic interactions are also a transfer pathway for contaminants in ecosystems. Regarding environmental literature, nanoparticles were both transferred in terrestrial (Judy et al., 2011; Unrine et al., 2012; Yeo and Nam, 2013) and aquatic (Holbrook et al., 2008; Renault et al., 2008; Wang et al., 2016) food chains. In aquatic ecosystems, studies were mainly focused on invertebrates, such as daphnia (Bouldin et al., 2008; Fouqueray et al., 2012; Geitner et al., 2016; Gilroy et al., 2014; Lee et al., 2015; McTeer et al., 2014; Zhao and Wang, 2010), gastropods (Croteau et al., 2011), bivalves (Buffet et al., 2014; Larginho et al., 2014; Renault et al., 2008), copepods (Jarvis et al., 2013), or amphipods (Baudrimont et al., 2017; Jackson et al., 2012). As a result, nanoparticle trophic transfers have also extensively been investigated regarding the first levels of food chains. These studies suggest that nanoparticles are available for dietary uptake at the lower trophic levels which might be subsequently transferred through the entire food web, including humans. But up to now, only two experiments were focused on a three level food chain, considering each other different ecosystems and nanoparticles (Cedervall et al., 2012; Chae et al., 2016). Chae et al. (2016) assessed quantum dots terrestrial trophic transfer from a yeast to collembolan and finally the pill bug using fluorescence analytical techniques. Quantum dots (Cd/Se, 70 nm) were observed in collembolan intestine tissues after short-term (3 days) and long-term

(12 days) feeding with exposed yeasts (Chae et al., 2016). Quantum dots were further only transferred to pill bug intestines too (Chae2016). Cedervall et al. (2012) investigated freshwater trophic chain, from algae, through zooplankton to fish. Lipid metabolism and behavior of the top consumer (*Carassius carassius*) were disrupted by polystyrene nanoparticles (Cedervall et al., 2012). Regarding these both studies, transfer quantifications were lacking whereas significant biological effects were demonstrated.

Studying the trophic transfer along food chains constitutes an experimental challenge but also an environmentally relevant scenario regarding the potential nanopollution. The major aim of the present study is to demonstrate how nanoparticles move through a « natural » fresh water food chain from the water column to a three level trophic *continuum*, which starts with the algae *Scenedesmus sp.* Indeed, in aquatic ecosystems, planktonic algae constitute the base of many food chains and appear strongly impacted by various pollutants due to their small sizes and consequently high surface-to-volume ratios. Algae are preys for many organisms including filter-feeding bivalves. *Corbicula fluminea*, an aquatic benthic clam constitutes then the second trophic level as a key species in the fresh water ecosystems with implication in cycles of both nutrients and contaminants as a result of its important ventilatory activity. Finally, the European eel *Anguilla anguilla*, a carnivorous and top predator fish at the yellow stage, was included in the present trophic chain as the third level. Previous investigations have pointed out the sensitivity of this species to various contaminants highlighting its interest as pollutant bioindicator (Baillon et al., 2015; Geeraerts and Belpaire, 2010). But nowadays, no study has still considered nanoparticle transfer up to the eels in case of « natural » trophic chains.

Moreover, biological responses to nanoparticles for predator are still poorly addressed (Tangaa et al., 2016). Previous (eco)toxicology investigations highlighted nanoparticle effects on immune system (Bettini et al., 2017; Cho et al., 2010), cell viability (Freese et al., 2012; Gliga et al., 2014) or oxidative stress initiation

(Gomes et al., 2012; Pan et al., 2009). In this study, effects associated to « natural » trophic transfer were examined at the transcriptome scale in the predator fish according to a gene selection based on RNA-sequencing data (article Chapitre 4). Chosen organs to explore toxic responses were the intestine which is the first biological barrier exposed to nanoparticles by trophic route (Chae et al., 2016), the liver due to its involvement in biological function regulations and also as nanoparticles accumulation organ (Cho et al., 2010; De Jong et al., 2008), and the brain because nanoparticles might impact this organ in absence of accumulation (article Chapitre 4).

In this study, spherical polyethylene glycol-coated gold nanoparticles (AuNP, 10 nm⁺), stable in solution (García-Negrete et al., 2013), were used as model nanoparticles in order to investigate nanoparticle transfers and effects on a three-level trophic system (algae - clams - European eels). Algae were exposed to low AuNP concentration (480 µg Au L⁻¹, corresponding to LC₅₀ ÷ 100, according to Renault et al. 2008) for 24 hours, the clams were continuously exposed to contaminated algae for 15 days and finally, European eels were fed for 21 days by the previous contaminated clams. Gold concentrations were measured throughout the trophic *continuum* for the transfer ratio assessment, bioaccumulation kinetics were performed for the clams, bioaccumulation was measured in the eels, and transcriptomic responses after « natural » trophic exposure to nanoparticles were investigated in the eels.

2. Methods

2.1. Ethics

The experimental procedures of the present study respect the animal ethical guidelines in order to secure a decent existence in laboratory and reduce suffering according to the French Ministry of Higher Education and Research.

2.2. PEG coated gold nanoparticles

Polyethylene glycol coated gold nanoparticles (AuNP) were prepared according to the Brisson and Mornet method as previously described (Brisson and Mornet, 2013). The synthesized AuNP were uniform with a narrow size distribution (10 ± 1 nm) and observed in TEM micrograph (figure 1). AuNP were stabilized with PEG-amine at the particle surface and zeta potential was about 40 mV at pH 7.

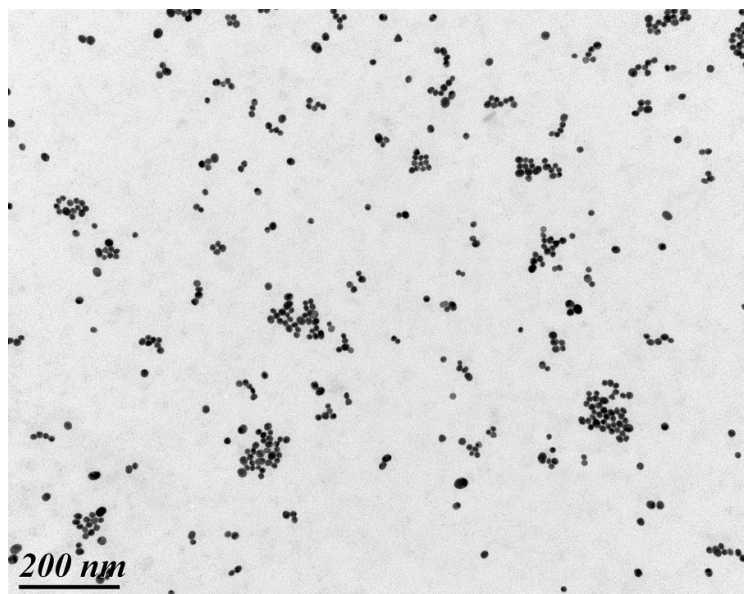


Figure 1: TEM micrograph of the PEG-coated gold nanoparticles after synthesis.

2.3. Exposure system from algae to bivalves

Asiatic clams *Corbicula fluminea* (500 animals; 13 ± 1 mm shell length; 20 ± 2 mm shell width) were catch in September 2016 from the Isle River ($44^{\circ}50'16''N$, $00^{\circ}34'46''W$, France), an uncontaminated site according to measured metal concentrations in aquatic organisms (data not shown). Animals were acclimated for 2 weeks prior to the experiment. Clams were divided in 6 tanks containing 15 L of water with sand at the bottom, isolated from external vibrations, and with a 12:12 hr light-dark photoperiod. Each tank was continuously supplied with an homogenized algae solution (90% fresh water - 10% Dauta culture medium with 10^6 cells

mL⁻¹; T°C = 18.2 ± 0.4 °C; pH = 8.2 ± 0.1; mean ± SE; n = 15) at a flow rate of 10 mL min⁻¹ containing 10⁵ cells mL⁻¹ in order to maintain a constant exposure. Two AuNP concentrations in algae solutions were studied: 0 µg Au L⁻¹ (NP0) and 480 µg Au L⁻¹ (NP0.1, concentration 100-fold lower than the LC₅₀ of *Scenedesmus subspicatus* - Renault et al., 2008). Total gold concentrations were daily measured during the experiment into the algae solution tanks and the clam exposure tanks. Gold concentrations of the filtrated water (0.45 µm, GH Polypropylene) into both tanks were also daily performed to assess proportions of the free-AuNP and the ad/absorbed AuNP to algae by difference with total gold concentrations.

Five clams were randomly sampled and dissected (visceral mass, gills and mantle) for the bioaccumulation kinetics at day 0, 5, 7, 10 and 15. At the day 7, 210 clams in each exposure condition were sampled and stocked at -20°C waiting to feed the eels in the second experiment part.

2.4. Experimental design for eels trophic exposure

Immature yellow eels (*Anguilla anguilla*, 12.8 ± 0.3 g, 21.7 ± 0.5 cm, mean ± SE, n = 20) were caught in the Arcachon Bay considered as a pristine environment (44°41'24''N-1°01'27''W, Southwest of France) in September 2016. Animals were transferred to the laboratory (Marine Station, Arcachon) for a 2-month acclimatization period (*i.e.* kept in running aerated seawater, and fed with *Mytilus edulis* every two days). For the experiment, 20 fish were individually separated in a flow-through seawater open system (15 L fish⁻¹; daily renewed; T = 17.8 ± 1.1°C, pH = 8.0 ± 0.1; mean ± SD, n = 42) under 12:12 hr light:dark period. During the 21-day exposure, the previously contaminated *Corbicula fluminea* were used to feed the eels, at a rate of 1 bivalve fish⁻¹ day⁻¹. Gold concentrations in the clams were below the DL for NP0 and of 47.96 µg Au g⁻¹ DW (mean ± SE, n = 5) for NP0.1 after 7 days of exposure. The remaining food after consumption by the eels was removed to be monitored every morning and assessed as « consumed » if

only the clam shells were found or as « unconsumed » if any clam soft tissues were still observed stered to the shells. Water monitoring did not reveal any trace of gold in tanks allowing to consider the exposure of eels only by the trophic route. After 21 days of exposure, the 10 eels of each condition were sacrificed and tissues (brain, gills, intestine, kidney, liver) were sampled. Intestine tissues were manually emptied during dissections to remove most of the food bowl. Gills, intestine, kidney and liver tissues were stored at -20°C waiting for gold quantification analysis. The brain and a standardized sampling of intestine and liver tissues were picked up for RT-qPCR analysis and stored in RNA-later solution at -20°C.

2.5. Gold quantifications

Biological samples were dried (48h at 50°C) and then digested in aqua regia (0.25 volume of 65% HNO₃ - Carlo Erba Reagent, Dasit Group, Italy - and 0.75 volume of 37% HCl - SCP Science, Canada) at 100°C for 3h (Fluka, Buchs, Switzerland). Gill tissues of clams were digested in 0.5 mL of aqua regia; mantle and visceral mass of clams, gill and intestine of eels in 2 mL of aqua regia; liver and kidney of eels in 3 mL of aqua regia. All acid-digested samples were diluted 6-fold with ultrapure water (MilliQ, Bedford, MA, USA) before analysis. Algae and water samples were diluted with ultrapure acidified water (2% aqua regia) before gold quantification.

All gold quantifications were performed by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction using a graphite furnace (240ZAA spectrometer, Agilent Technologies, USA). The detection limit was 0.1 µg Au L⁻¹. The analytical method was validated by the analysis of gold standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany), and for each sample series by checking an inter-laboratory biological reference material (gold-contaminated Asiatic clam *Corbicula fluminea*, concentration intercalibrated with six laboratories, data not shown). Gold recoveries reached 95.9 ± 1.4 % (n = 14). Gold concentrations were expressed for clams and eels organs as µg Au g⁻¹ dry weight (DW).

Bioaccumulation factor for the clams were estimated by gold concentration accumulated in the clam DW \div gold concentration in the clam exposure tanks. Trophic transfer ratio to the liver tissues of exposed eels was assessed after the 21-day exposure with the following calculation: [(liver gold quantity in the exposed fish - liver gold quantity in the control fish) \div ingested gold quantity] \times 100.

2.6. RNA extraction and real-time qPCR

Total RNA was isolated from the brain, intestine and liver tissues using the SV Total RNA isolation system kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Specific primers were designed in order to amplify approximately 100 bp using the software primer3. Primer sequences are itemized in table 1. PCR reactions were prepared as advocated by GoTaq qPCR mastermix (Promega) with: 1 \times GoTaq qPCR mastermix, 200 nM primers, and 10 ng of cDNA in a total volume of 25 μ l. Transcript level quantification was performed using a Roche LC480 instrument parameterized as follow : 95°C for 2 min, followed by 40–45 cycles of 15 sec at 95°C, 60 sec at 60°C, and a dissociation curve step (60–95°C) to confirm the absence of nonspecific products. The dissociation curves showed a single amplification product and no primer dimers. In the present study, amplification of the housekeeping gene (elongation factor 1-alpha) cDNA was used as an internal control for gene expression. Indeed, this gene presented a steady-state level of expression (coefficient of variation = 3.9%), and no significant differences were observed between Ct values for the housekeeping gene among all samples ($p = 0.12$). Results were expressed as $2^{-\Delta Ct}$ with $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$.

Table 1: Studied genes and respective primer designs for the eel tissues.

Gene	Primer annotation	Primer design	
		Forward	Reverse
Alkaline ceramidase 2	<i>acer2</i>	TGCGCTTGTTTCGTCAGTAC	GGGTGGCATGGAAGTACGTT
Allograft inflammatory factor 1	<i>aif1</i>	TCTCTGACCTGCCCTGAAGA	CCATGCATGCACTGTCCTGT
Caspase-3	<i>casp3</i>	TGCTACGATACATGGCATTGGA	CCAGTCGGGTTGGTCTTTATTT
Caspase-8	<i>casp8</i>	CACGCAGGGATCCATCTTCA	GCCCGTTAACTCTCGTCAT
Circadian locomotor output cycles protein kaput	<i>clock</i>	TCGTCAGTTATGCGGAGGTG	CCTGACTCTTATCCGCAGCA
Cathepsin S	<i>ctss</i>	TGATGGCAGAGGAGGTCAAC	TCTGGCAAGGTGAACGTCAG
ERO1-like protein alpha	<i>ero1a</i>	CAGCTTTACACTGGCCAACC	GCCTCGTCAAAGTGCAAAGG
Glutathione S-transferase kappa 1	<i>gstk1</i>	GGTCTCGTCCCAACAAGTT	GGTTTTCAGGGAAGGCGAGA
Integrin beta-2	<i>itgb2</i>	GACCCTTCTGCATGTGGTGT	GTCACAGCCCTTCTCCATCA
Integrin beta-4	<i>itgb4</i>	GGTGAAAGCTCTCGAGAAAGTC	GAAGGCGGTGCTGAATGTTG
NLR family CARD domain-containing protein 3	<i>nlr3</i>	ACAGGTGATCAAAGGGTCCG	CTGAAGTTGATTGGATGAGGCA
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	<i>nlrp3</i>	TGGAGATCTGCCCAAACTCT	TTGGTGCCACGATACTTCTCA
Period circadian protein	<i>per</i>	TCCGTCTACCAGCAGATCA	GCGATGGACAGAGACTTGCT
Elongation factor 1-alpha	<i>ef1a</i>	CGACTCATCATGTAATCTGGG	CAGCGGGACAGTCAGTTAAGA
Suppression of tumorigenicity 5 protein	<i>st5</i>	GCCCCAGTTCTAAGAGCACT	TCAGATCCACATCCTCATAACGG
TNF receptor-associated factor 6	<i>traf6</i>	TGCAGGAGGAAGGCTCTCTA	TTAGGGCTTGGAATCGCA

2.7. Data treatment

Data were processed using R 3.3.0 collaborative statistical software (www.r-project.org/). For bioaccumulation kinetics of the clams, gold accumulations and gene expressions of the eels, comparisons between exposure groups were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test, considering the 0.05 threshold as significant probability.

3. Results

3.1. Algae and clam exposures

Gold concentrations in algae suspensions were below the detection limit for NP0 and reached $529.0 \pm 13.1 \mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1 exposures (mean \pm SE, n = 45). Free-AuNP assessment obtained after algae filtration pointed out a gold concentration below the detection limit for NP0 and of $77.0 \pm 11.9 \mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1 (mean \pm SE, n = 45), highlighting that about 85% of AuNP were ad/absorbed to algae. In clam exposure tanks, continuously supplied by the algae suspensions, measured total gold concentrations were below the detection limit for NP0 and of

$118.7 \pm 5.0 \mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1 (mean \pm SE, n = 25). After water filtrations of clam exposure tanks, gold concentrations were below the detection limit for NP0 and of $22.0 \pm 1.9 \mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1 (mean \pm SE, n = 25). Algae concentration monitoring in the algae solution gave the following results: $1.27 \times 10^5 \pm 5.53 \times 10^3$ and $1.27 \times 10^5 \pm 4.61 \times 10^3$ cells mL⁻¹ for NP0 and NP0.1 conditions respectively (mean \pm SE, n = 15). Algae concentrations in the clam tanks were of $3.70 \times 10^4 \pm 2.75 \times 10^3$ and $4.38 \times 10^4 \pm 2.59 \times 10^3$ cells mL⁻¹ for NP0 and NP0.1 conditions respectively (mean \pm SE, n = 31). For the 15-day exposure, 13 and 11 clams died in the NP0 and NP0.1 conditions, respectively.

3.2. Clam bioaccumulation kinetics

Bioaccumulation kinetics of gold in the clams were monitored for the 15-day AuNP exposure. From the day 5, gold accumulations in the clams were significantly increased for NP0.1 compared to NP0 regarding all studied organs (figure 2). Visceral mass of exposed clams exhibited the highest gold concentrations compared to the gills and mantle tissues. From the day 5 and until the end of exposure, gold accumulations in the visceral mass were around $225.6 \pm 45.8 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW. Gold concentrations in the gill tissues increased all along the experiment reaching $19.4 \pm 1.9 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW (mean \pm SE, n = 5). For the mantle tissues, gold concentrations increased to each sampling time, except the slight depletion observed at the day 10. At the end of NP0.1 exposure, gold concentrations in the visceral mass were 13- and 16-fold higher than in the gill and mantle tissues, respectively. At the day 7 (sampling to feed the eels), bioaccumulation factor from algae to clams were assessed as 406.

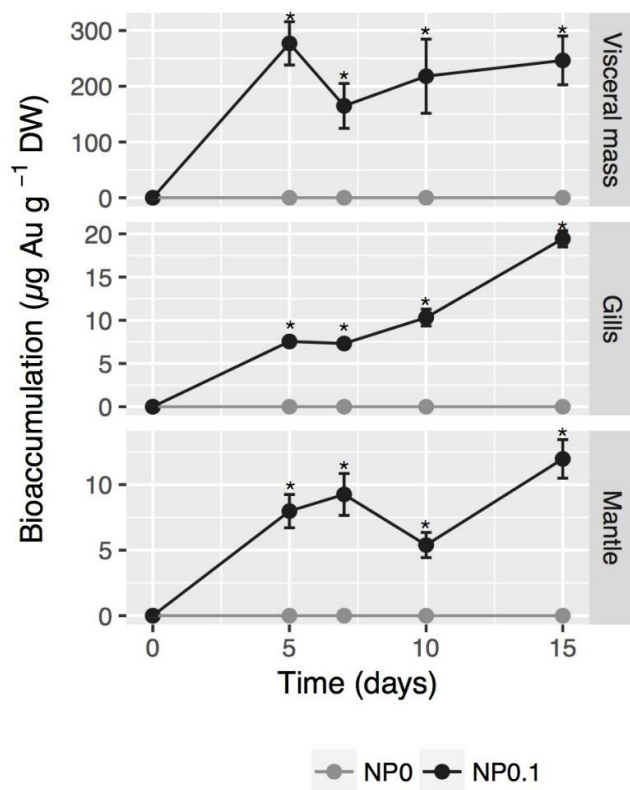


Figure 2: Gold accumulation in *Corbicula fluminea* as a function of time. * represent significant difference from the corresponding data in the NP0 condition. Mean \pm SE, n = 5; DW = dry weight.

3.3. Trophic exposure of the eels and gold accumulations

No mortality was observed for the eels. For the 21-day trophic exposure, no significant difference was noted for the food intakes by the eels with 19.5 ± 0.6 and 19.8 ± 0.7 consumed clams for NP0 and NP0.1, respectively ($p = 0.36$, mean \pm SE, n = 210). At the end of exposure, gold accumulations were measured in gill, intestine, kidney and liver of the eels (figure 3). For all the studied organs, gold concentrations were below the detection limit for the NP0 eels. For the NP0.1 exposed eels, gold concentrations were also below the detection limit for the gills. The intestine of the NP0.1 eels exhibited the highest gold accumulation with $2.5 \pm 0.4 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW, followed by the kidney ($1.7 \pm 0.5 \mu\text{g Au g}^{-1}$ DW) and the liver

($0.3 \pm 0.05 \mu\text{g Au g}^{-1} \text{ DW}$). The transfer ratio to the eels liver was assessed to 2.9% after the 21-day trophic exposure.

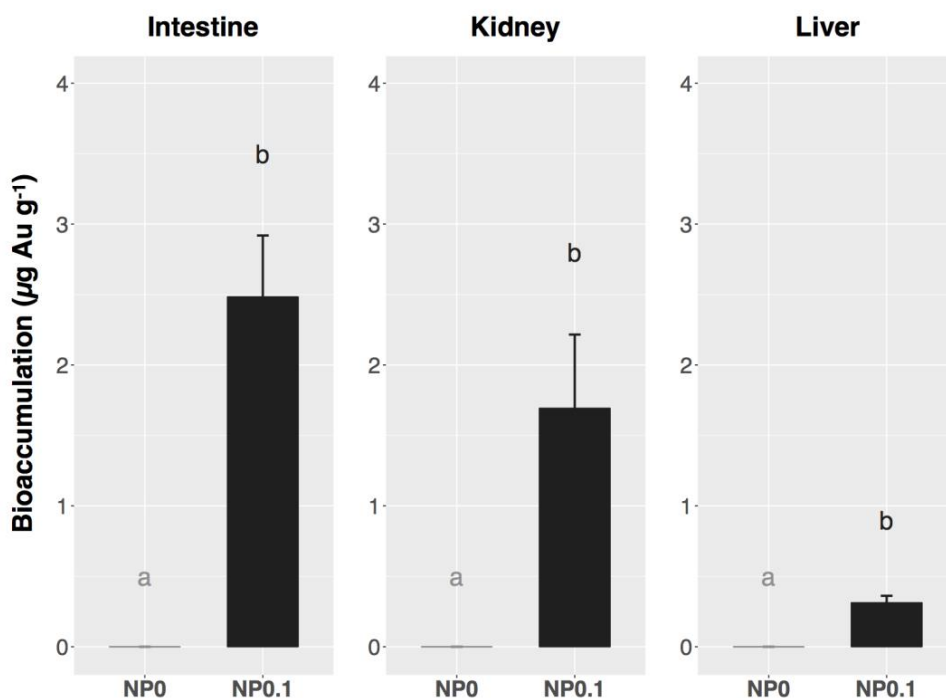


Figure 3: Gold accumulation for the intestine, kidney and liver tissues of the eels after the 21-day AuNP trophic exposure (Mean \pm SE, n = 10). Gold accumulation was below the detection limit for both condition. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.4. Eel transcriptomic responses

Gene expressions were assessed by RT-qPCR in the brain, intestine and liver in order to investigate eel responses to AuNP after the 21-day trophic exposure (table 2). Studied genes might be classified in several biological functions such as inflammatory responses, cell proliferation and apoptosis process, oxydo-reduction homeostasis and biological rhythms. Significant differential expressions compared to NP0 eels were revealed for the *aif1*, *itgb2* and *acer2* genes in the liver and for the *per* gene in the intestine (table 2). No significant difference was observed in gene expressions for the brain comparing both exposure conditions. Inflammatory responses in the liver appeared down-regulated for *aif1* and *itgb2*

genes with a 0.44 and 0.31 repression factor, respectively. *Acer2* gene was also 0.43-fold down-regulated in the NP0.1 eel livers compared to the NP0. In the intestine, *per* gene was significantly up-regulated in the NP0.1 eels compared to the NP0 after a 21-day AuNP trophic exposure.

Table 2: Differential expression of the studied genes in the brain, intestine and liver of the eels after the 21-day trophic exposure. Results are expressed as $2^{-\Delta C_t}$ for the NP0 and NP0.1 eel tissues (mean \pm SE, n = 10). Statistical comparisons are performed between the NP0 and the NP0.1 eels for each tissue; * indicates a p-value < 0.05 and ** represents a significant p-value < 0.01 according to Kruskal-Wallis test..

Biological function	Gene	Brain		Intestine		Liver		P-value
		NP0	NP0.1	NP0	NP0.1	NP0	NP0.1	
Inflammatory responses	<i>aif1</i>	14.68 \pm 1.83	26.95 \pm 5.19	266.67 \pm 39.59	166.33 \pm 30.45	18.75 \pm 2.98	8.32 \pm 0.83	0.003 **
	<i>ciss</i>	0.89 \pm 0.11	0.86 \pm 0.15	27.40 \pm 2.86	23.14 \pm 3.61	9.89 \pm 3.70	6.22 \pm 0.54	0.61
	<i>itgb2</i>	1.67 \pm 0.19	1.75 \pm 0.27	9.32 \pm 0.54	8.12 \pm 0.90	2.75 \pm 0.67	0.86 \pm 0.06	0.02 *
	<i>itgb4</i>	2.81 \pm 0.14	2.80 \pm 0.22	11.45 \pm 0.69	12.53 \pm 1.19	1.23 \pm 0.11	1.16 \pm 0.05	0.95
	<i>nlrc3</i>	2.44 \pm 0.23	3.28 \pm 1.00	26.56 \pm 3.26	28.49 \pm 5.99	4.90 \pm 1.46	3.78 \pm 1.22	0.69
	<i>nlrp3</i>	161.66 \pm 13.21	183.71 \pm 13.67	1971.29 \pm 171.77	1884.88 \pm 159.18	452.57 \pm 61.59	301.83 \pm 34.88	0.10
	<i>trafb6</i>	8.74 \pm 0.66	10.62 \pm 1.14	35.03 \pm 2.66	31.51 \pm 3.22	8.51 \pm 1.35	8.66 \pm 0.73	0.30
	<i>acer2</i>	6.20 \pm 0.75	6.56 \pm 0.50	3.20 \pm 0.58	3.26 \pm 0.28	12.40 \pm 2.01	5.45 \pm 0.90	0.04 *
Cell proliferation and apoptosis process	<i>casp3</i>	0.32 \pm 0.04	0.31 \pm 0.04	0.30 \pm 0.05	0.23 \pm 0.03	0.51 \pm 0.08	0.49 \pm 0.09	0.61
	<i>casp8</i>	0.92 \pm 0.08	0.98 \pm 0.11	29.56 \pm 2.36	26.42 \pm 3.28	5.83 \pm 1.06	3.72 \pm 0.46	0.14
	<i>st5</i>	0.61 \pm 0.04	0.72 \pm 0.09	1.14 \pm 0.09	1.32 \pm 0.10	12.07 \pm 2.55	11.64 \pm 2.06	0.99
	<i>ero1a</i>	2.12 \pm 0.17	1.97 \pm 0.09	14.45 \pm 1.53	13.72 \pm 1.76	10.17 \pm 1.77	8.92 \pm 1.49	0.89
Oxydoreduction homeostasis	<i>gstk1</i>	1.76 \pm 0.20	2.47 \pm 0.47	9.11 \pm 1.86	13.50 \pm 1.91	25.75 \pm 5.51	16.82 \pm 4.21	0.31
	<i>clock</i>	14.35 \pm 0.66	12.00 \pm 1.34	15.87 \pm 1.01	17.06 \pm 1.51	6.35 \pm 1.32	4.18 \pm 0.75	0.19
Biological rhythms	<i>per</i>	9.25 \pm 0.68	7.95 \pm 0.90	2.85 \pm 0.23	4.27 \pm 0.27	2.56 \pm 0.47	3.27 \pm 0.83	0.60

4. Discussion

The present experimental study aimed to focus on a « natural » transfer of AuNP along an aquatic three-level trophic *continuum*. In addition, toxic impacts associated to AuNP trophic exposure were investigated at the transcriptome scale for the top-predator fish in several tissues.

Trophic *continuum* started with the algae *Scenedesmus sp.* Throughout the experiment, the algae were exposed for 24 hours to $529.0 \pm 13.1 \mu\text{g Au L}^{-1}$ (NP0.1 – nominal concentration of $480 \mu\text{g Au L}^{-1}$) and Au appeared to adsorb about 85% of PEG-coated AuNP. AuNP sorption by the algae *Dunaliella salina* was also assessed after a 24-hour exposure ($23.6 \text{ mg Au L}^{-1}$) to about 76% for citrate-coated and 36% for PEG-coated AuNP (Larguinho et al., 2014). Different sorption ratios between this study and our experiment might be the result of differences in exposure concentrations ($0.529 \text{ mg Au L}^{-1}$ versus $23.6 \text{ mg Au L}^{-1}$) and algae concentration ($10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ in our study versus $4 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$). Microscopic observation of *Scenedesmus sp.* exposed to higher PEG-coated AuNP concentration ($48.0 \text{ mg Au L}^{-1}$) showed only an adsorption phenomenon with nanoparticle distribution all around the algae cell wall (Renault et al., 2008). The strong electrostatic attraction between the negative charges of algae cell walls and the positive charge of the PEG-coated AuNP (zeta potential = 40 mV at pH7) might lead to adsorptions between both components in solution, as previously demonstrated for other cell membranes (Goodman et al., 2004). Regarding other nanomaterials, Conway et al. (2014) exposed the phytoplankton *Isochrysis galbana* to 30 mg L^{-1} of CeO_2 nanorods ($67 \times 31 \text{ nm}$) for 8 days noticing the occurrence of nanorod sorption to phytoplankton within 1 hour. For the authors, this fast interaction between nanorods and phytoplankton cells might also support adsorption hypothesis due to electrostatic attractions.

The clams were then continuously exposed for 15-days to the previous AuNP-algae suspension. The water concentrations in clam exposure tanks exhibited a lower gold concentration ($118.7 \pm 5.0 \mu\text{g Au L}^{-1}$ for NP0.1) compared to the sup-

plied algae suspension, as a result of clam feeding activity, algae sedimentation and sorption to plastic tanks. Interestingly, according to the performed water filtrations, the AuNP sorption to algae was assessed at 82%, also in the same proportion than the supplied algae suspension. Here, the clam gold accumulations were the highest in visceral mass which appeared to reach the maximum concentration from the fifth day. Conversely, gold bioaccumulations in the gills increased throughout the AuNP 15-day exposure; the mantle seemed to follow the same trend with lower concentrations compared to the gills at the end of exposure. As well, for marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to citrate and PEG-coated AuNP, gold concentration was also higher in the digestive gland than in gills (Larguinho et al., 2014). Hull et al. (2011) exposed the clam *Corbicula fluminea* to 7.8, 15 and 46 nm AuNP (BSA-coated, 2 mg Au L⁻¹) during 180 h, and AuNP were again mainly internalized in the digestive gland. Increased uptakes were observed for bivalves exposed to the highest nanoparticle size ranges (Hull et al., 2011; Pan et al., 2012). All this results might suggest that gold nanoparticle are mainly accumulated by trophic route in bivalves.

Finally, AuNP were transferred from the clams to the eels mimicking a « natural » trophic exposure. The eels of both exposure conditions presented the same food consumption, highlighting no significant effects of AuNP on their dietary behavior. Regarding gold bioaccumulation, exposed eels exhibited a significant increase in concentrations compared to control in the intestine, kidney and liver, emphasizing a clear transfer up to the predator fish. The kidney presented concentrations 5-fold higher than the liver for NP0.1 eels. Similar trend was observed for another fish exposed by the trophic route to PEG-coated AuNP (Perrier et al., submitted), whereas the AuNP intravenous injections in rodents always led to the highest concentrations in the liver compared to the kidney (Cho et al., 2010; De Jong et al., 2008; Wojnicki et al., 2013) (DeJong 2008, Cho2010 et Wojnicki2013). Contrary to Chae et al. (2016), in the present experiment, nanoparticles passed throughout the intestinal barrier of the higher trophic level since significant gold accumulations in the liver and the kidney were observed.

In this study, gold bioaccumulations were higher in the clams compared to the eels. As a consequence, no biomagnification was highlighted in the present experiment. Judy et al. (2011) have brought evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain emphasizing by higher concentration in the hornworm *Manduca sexta* compared to tobacco plant. Similarly, biomagnification of cadmium selenide quantum dots were observed in microbial food chain (16-hr of exposure) with a 5-fold higher concentration in protozoa predator compared to their bacterial prey (Werlin et al., 2011). But except for these two experiments (Judy et al., 2011; Werlin et al., 2011), associated literature had mainly concluded to an absence of nanoparticle biomagnification according to their experimental designs (Holbrook et al., 2008; Lewinski et al., 2011; Wang et al., 2016; Zhu et al., 2010). For example, regarding to another fish (juvenile *Scophthalmus maximus*) dietary exposed for 20-day to TiO₂ contaminated clams (from 108 to 194 μg Ti. g⁻¹ DW), no biomagnification was still observed with a 0.3 calculated factor (Wang et al., 2016).

After the 21-day AuNP trophic exposure, few significant differential expressions were observed among investigated genes in eel tissues, except for the brain. In the liver, significant differential gene expressions highlighted an inflammatory response (*aif1*, *itgb2*) and a modulation in apoptosis regulation (*acer2*). PEG-coated AuNP (13 nm), administered by intravenous injection, were accumulated in the mouse livers up to 7 days and also induced acute inflammation and apoptosis regarding gene expressions (Cho et al., 2009a). Expression of *aif1* gene was kinetically studied by Volland et al. (2015) in the digestive gland of marine clams *Ruditapes philippinarum* exposed to AuNP (20 nm). Compared to the present study, they did not observed any significant difference between exposed and control clams whatever the kinetics time (1, 7 or 14 days). AIF-1 is a cytokine, involved in the regulation of cell cycle progression and cellular activation status, which also plays an important role in chronic immune inflammatory processes, especially those involving macrophages (Kimura et al., 2007). Indeed, Yang et al. (2005) showed the mediation on survival and pro-inflammatory activity of mac-

rophages by AIF-1. Recently, Wang et al. (2017) demonstrated the implication of ACER2 in the induction of autophagy as well as apoptosis. Interestingly, various nanoparticles were previously pointed out to disrupt autophagy process in different organisms (Stern et al., 2012). But the present experimentation did not emphasize a clear immune or apoptosis regulation responses after the 21-day trophic exposure due to only few genes differentially expressed and just concerning the liver. For a human cell line, Falagan-Lotsch et al. (2016) studied differential gene expressions regarding chronic and non-chronic exposures to low concentrations of PEG-coated gold nanorods. They analyzed 25 genes involved in several functional pathways such as inflammatory response, oxidative or osmotic stress, cell death by apoptosis, autophagy or necrosis, and DNA damage signaling (Falagan-Lotsch et al., 2016). According to their selected genes, significant expression modifications were mainly observed during non-chronic exposure compared to chronic one, highlighting that a cell adaptation might occur during long-term nanoparticle exposure (Falagan-Lotsch et al., 2016). Indeed, chronic and low doses might lead to a prolonged change in cell physiology as part of an adaptive response to the long-term effects of a specific stimulus (Calabrese et al., 2007). As a consequence, the results of our experiment might also suggest the end of inflammatory process after the 21-day exposure with the setting up of adaptive mechanisms.

The *per* gene expression exhibited a significant up-regulation in the eel intestine after trophic exposure. Other studies have also revealed a disruption in the *per* gene transcription due to different nanoparticle exposures. Balasubramanian et al. (2010) performed microarray analyses in the liver and spleen of rats after an AuNP single intravenous injection ($15.1 \mu\text{g Au L}^{-1}$). Their results also showed a significant up-regulation of the *per* gene in both liver and spleen with expression changes still observed in the rat liver two months after the AuNP injection. Another experiment in mice exposed to PEG-coated AuNP (4 and 100 nm) highlighted a significant effect on *per* gene transcription in the liver among the 0.5% genes differentially expressed of the 45,000 tested genes by microarray analysis (Cho et al., 2009b). Minchenko et al. (2012) demonstrated that silver nanoparti-

cles significantly affect the expression levels of several biological rhythm genes including the *per* gene in different rat tissues in time-dependent and tissue-specific manner. Authors concluded that circadian gene expressions might be considered as a sensitive marker for silver nanoparticles toxic action (Minchenko et al., 2012). All these studies might suggest potential nanoparticle effects on biological rhythms but other investigations are necessary in order to confirm these results.

To conclude, this aquatic experiment clearly illustrated gold nanoparticle transfer throughout a three-level trophic *continuum* regarding to a relatively low initial exposure dose compared to literature. In both clams and eel tissues, gold nanoparticles were internalized in exposed organisms. But this experimental design did not reveal any biomagnification. Gene expressions in the predator fish suggest transcriptomic effects associated to inflammatory responses and apoptotic process in the liver tissues, whereas disruption for one gene implicated in biological rhythms was also pointed out in the intestine. Nevertheless, future investigations should address the potential adaptive responses in organisms chronically exposed to nanoparticles.

Acknowledgments

The authors thanks Laura P., Damien T. and Florence F. for their helps to massive clam opening. The authors also thanks Pierre-Yves G., Anthony B and Fabien P. for their helps to the eel dissections. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the CITTOXIC-Nano program (ANR-14-CE21-0001-01) and the Investments for the Future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). Fanny Perrier was supported by a grant from the French Ministry of Research.

Conflict of Interest

None of the authors report any conflict of interest or other relationship or activity that could appear to have influenced the submitted work.

References

- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normendeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, J., Elie, P., Couture, P., Baudrimont, M., Bernatchez, L., 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology* 24, 71–84. doi:10.1007/s10646-014-1356-x
- Balasubramanian, S.K., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C.N., Yu, L.E., Ong, W.Y., 2010. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31, 2034–2042. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.079
- Baudrimont, M., Andrei, J., Mornet, S., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Gourves, P.-Y., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Geffard, O., Garric, J., Feurtet-Mazel, A., 2017. Trophic transfer and effects of gold nanoparticles (AuNPs) in *Gammarus fossarum* from contaminated periphytic biofilm. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-017-8400-3
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J.-P., Carrière, M., Audinot, J.-N., Pierre, F.H., Guzylack-Piriou, L., Houdeau, E., 2017. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 7, 40373. doi:10.1038/srep40373
- Bouldin, J.L., Ingle, T.M., Sengupta, A., Alexander, R., Hannigan, R.E.,

- Buchanan, R. a, 2008. Aqueous toxicity and food chain transfer of Quantum DOTs in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1958–63. doi:10.1897/07-637.1
- Brisson, A., Mornet, S., 2013. Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins, application to the high-density labeling of cell membranes 1.
- Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Chatel, A., Berthet, B., Métais, I., Perreinetjani, H., Poirier, L., Luna-acosta, A., Thomas-guyon, H., Faverney, C.R., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-jones, E., Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114
- Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer, A.J., Bolger, P.M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M.G., Chiueh, C.C., Clarkson, T.W., Cook, R.R., Diamond, D.M., Doolittle, D.J., Dorato, M.A., Duke, S.O., Feinendegen, L., Gardner, D.E., Hart, R.W., Hastings, K.L., Hayes, A.W., Hoffmann, G.R., Ives, J.A., Jaworowski, Z., Johnson, T.E., Jonas, W.B., Kaminski, N.E., Keller, J.G., Klaunig, J.E., Knudsen, T.B., Kozumbo, W.J., Lettieri, T., Liu, S.Z., Maisseu, A., Maynard, K.I., Masoro, E.J., McClellan, R.O., Mehendale, H.M., Mothersill, C., Newlin, D.B., Nigg, H.N., Oehme, F.W., Phalen, R.F., Philbert, M.A., Rattan, S.I.S., Riviere, J.E., Rodricks, J., Sapolsky, R.M., Scott, B.R., Seymour, C., Sinclair, D.A., Smith-Sonneborn, J., Snow, E.T., Spear, L., Stevenson, D.E., Thomas, Y., Tubiana, M., Williams, G.M., Mattson, M.P., 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 122–128. doi:10.1016/j.taap.2007.02.015

- Cedervall, T., Hansson, L.A., Lard, M., Frohm, B., Linse, S., 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One* 7, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0032254
- Chae, Y., Kim, S.W., An, Y., 2016. Chemosphere In vivo visual evaluation of nanoparticle transfer in a three-species terrestrial food chain. *Chemosphere* 151, 101–107. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.075
- Cho, W.S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J., 2009a. Acute toxicity and pharmacokinetics of 137nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 16–24. doi:10.1016/j.taap.2008.12.023
- Cho, W.S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Han, B.S., Shin, H.S., Hong, J., Chung, B.H., Jeong, J., Cho, M.H., 2010. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 116–123. doi:10.1016/j.taap.2010.02.013
- Cho, W.S., Kim, S., Han, B.S., Son, W.C., Jeong, J., 2009b. 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. doi:10.1016/j.toxlet.2009.08.010
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1517–1524. doi:10.1021/es404549u
- Croteau, M.-N., Dybowska, A.D., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5, 79–90. doi:10.3109/17435390.2010.501914

- De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29, 1912–1919. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.037
- Falagan-Lotsch, P., Grzincic, E.M., Murphy, C.J., 2016. One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 13318–13323. doi:10.1073/pnas.1616400113
- Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., Labille, J., Rose, J., Garric, J., 2012. Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route. *Environ. Pollut.* 163, 55–61. doi:10.1016/j.envpol.2011.11.035
- Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M.I., Unger, R.E., Weksler, B.B., Romero, I. a., Couraud, P.-O., Kirkpatrick, C.J., 2012. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 1. doi:10.1186/1743-8977-9-23
- García-Negrete, C.A., Blasco, J., Volland, M., Rojas, T.C., Hampel, M., Lapresta-Fernández, A., Jiménez De Haro, M.C., Soto, M., Fernández, A., 2013. Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. *Environ. Pollut.* 174, 134–141. doi:10.1016/j.envpol.2012.11.014
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: A review. *Ecotoxicology* 19, 239–266. doi:10.1007/s10646-009-0424-0
- Geitner, N.K., Marinakos, S.M., Guo, C., O'Brien, N., Wiesner, M.R., 2016. Nanoparticle surface affinity as a predictor of trophic transfer. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6663–6669. doi:10.1021/acs.est.6b00056
- Gilroy, K.D., Neretina, S., Sanders, R.W., 2014. Behavior of gold nanoparticles in

- an experimental algal-zooplankton food chain. *J. Nanoparticle Res.* 16. doi:10.1007/s11051-014-2414-2
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H.L., 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. Part. *Fibre Toxicol.* 11, 11. doi:10.1186/1743-8977-11-11
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 118–119, 72–79. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.017
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M., 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897–900. doi:10.1021/bc049951i
- Holbrook, R.D., Murphy, K.E., Morrow, J.B., Cole, K.D., 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nat. Nanotechnol.* 3, 352–355. doi:10.1038/nnano.2008.110
- Hull, M.S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J., 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloiddally stable gold nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6592–6599. doi:10.1021/es200809c
- Jackson, B., Bugge, D., Ranville, J., Chen, C., 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5550–5556. doi:10.1021/es202864r
- Jarvis, T.A., Miller, R.J., Lenihan, H.S., Bielmyer, G.K., 2013. Toxicity of ZnO nanoparticles to the copepod *Acartia tonsa*, exposed through a phytoplankton diet. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1264–1269. doi:10.1002/etc.2180

- Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environ. Sci. Technol.* 45, 776–781. doi:10.1021/es103031a
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Pollut.* 158, 2900–2905. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.009
- Kimura, M., Kawahito, Y., Obayashi, H., Ohta, M., Hara, H., Adachi, T., Tokunaga, D., Hojo, T., Hamaguchi, M., Omoto, A., Ishino, H., Wada, M., Kohno, M., Tsubouchi, Y., Yoshikawa, T., 2007. A critical role for allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 178, 3316–3322. doi:10.1093/infdis/jii111 [pii]
- Künniger, T., Gerecke, A.C., Ulrich, A., Huch, A., Vonbank, R., Heeb, M., Wichser, A., Haag, R., Kunz, P., Faller, M., 2014. Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden façades. *Environ. Pollut.* 184, 464–471. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.030
- Larguinho, M., Correia, D., Diniz, M.S., Baptista, P. V., 2014. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels. *J. Nanoparticle Res.* 16, 1–11. doi:10.1007/s11051-014-2549-1
- Lee, W.-M., Yoon, S.-J., Shin, Y.-J., An, Y.-J., 2015. Trophic transfer of gold nanoparticles from *Euglena gracilis* or *Chlamydomonas reinhardtii* to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 201, 10–16. doi:10.1016/j.envpol.2015.02.021
- Lewinski, N.A., Zhu, H., Ouyang, C.R., Conner, G.P., Wagner, D.S., Colvin, V.L., Drezek, R.A., 2011. Trophic transfer of amphiphilic polymer coated CdSe/ZnS quantum dots to *Danio rerio*. *Nanoscale* 3, 3080.

doi:10.1039/c1nr10319a

- Ma, R., Levard, C., Judy, J.D., Unrine, J.M., Martin, B., Jefferson, B., Lowry, G.V., Durenkamp, M., 2013. Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot waste water treatment plant and in processed biosolids Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot waste water treatment plant and in processed biosolids. *Environ. Sci. Technol.*
- McTeer, J., Dean, A.P., White, K.N., Pittman, J.K., 2014. Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 8, 305–316. doi:10.3109/17435390.2013.778346
- Minchenko, D.O., Yavorovsky, O.P., Zinchenko, T.O., Komisarenko, S. V, Minchenko, O.H., 2012. Expression of circadian gens in different rat tissues is sensitive marker of in vivo silver nanoparticles action. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 40, 12016. doi:10.1088/1757-899X/40/1/012016
- Pan, J.F., Buffet, P.E., 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. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.051
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., Jahnen-Dechent, W., 2009. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5, 2067–2076. doi:10.1002/sml.200900466
- 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*). *Gold Bull.* 41, 116–126.
doi:10.1007/BF03216589
- Roco, M.C., Mirkin, C.A., Hersam, M.C., 2011. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Summary of international study. *J. Nanoparticle Res.* 13, 897–919. doi:10.1007/s11051-011-0275-5
- Stern, S.T., Adisheshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part. *Fibre Toxicol.* 9, 20. doi:10.1186/1743-8977-9-20
- Tangaa, S.R., Selck, H., Winther-Nielsen, M., Khan, F.R., 2016. Trophic transfer of metal-based nanoparticles in aquatic environments: a review and recommendations for future research focus. *Environ. Sci. Nano* 3, 966–981. doi:10.1039/C5EN00280J
- Unrine, J.M., Shoults-Wilson, W., Zhurbich, O., Bertsch, P., Tsyusko, O. V, 2012. Trophic Transfer of Au Nanoparticles from Soil along a Simulated Terrestrial Food Chain. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9753–9760. doi:10.1021/es3025325
- Volland, M., Hampel, M., Martos-Sitcha, J.A., Trombini, C., Martínez-Rodríguez, G., Blasco, J., 2015. Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: uptake, elimination and oxidative stress response. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17414–17424. doi:10.1007/s11356-015-4718-x
- Wang, Y., Zhang, C., Jin, Y., Wang, He, Q., Liu, Z., Ai, Q., Lei, Y., Li, Y., Song, F., Bu, Y., 2017. Alkaline ceramidase 2 is a novel direct target of p53 and induces autophagy and apoptosis through ROS generation. *Sci. Rep.* 7, 44573. doi:10.1038/srep44573
- Wang, Z., Yin, L., Zhao, J., Xing, B., 2016. Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile

- turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Res.* 95, 250–259. doi:10.1016/j.watres.2016.03.027
- Werlin, R., Priester, J.H., Mielke, R.E., Krämer, S., Jackson, S., Stoimenov, P.K., Stucky, G.D., Cherr, G.N., Orias, E., Holden, P.A., 2011. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nat. Nanotechnol.* 6, 65–71. doi:10.1038/nnano.2010.251
- Wojnicki, M., Luty-błocho, M., Bednarski, M., Dudek, M., Knutelska, J., Sapa, J., Zygmunt, M., Nowak, G., Fitzner, K., 2013. Tissue distribution of gold nanoparticles after single intravenous administration in mice. *Pharmacol. Reports* 65, 1033–1038. doi:10.1016/S1734-1140(13)71086-7
- Yang, Z.F., Ho, D.W., Lau, C.K., Lam, C.T., Lum, C.T., Poon, R.T.P., Fan, S.T., 2005. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *Int. Immunol.* 17, 1391–1397. doi:10.1093/intimm/dxh316
- Yeo, M.K., Nam, D.H., 2013. Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environ. Pollut.* 178, 166–172. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.040
- Zhao, C.M., Wang, W.X., 2010. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7699–7704. doi:10.1021/es101484s
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere* 79, 928–933. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.022

5.3 Conclusion

Le design expérimental, tel que conçu pour cette étude, a permis la réalisation d'une chaîne trophique à trois maillons, dont la pression de contamination pour les organismes s'est avérée constante durant toute la durée de l'exposition.

Pendant cette expérience, une faible mortalité (2% pour chaque modalité d'exposition), non imputable à la présence des nanoparticules, est observée chez les corbicules ; alors qu'aucune mortalité n'a été constatée pour les anguilles.

Cette expérimentation évalue qu'environ 80% des nanoparticules dans la colonne d'eau sont fixées aux algues, et que cette proportion est maintenue qu'il s'agisse de la solution d'algues apportées aux systèmes ou du milieu d'exposition des corbicules.

La cinétique d'accumulation réalisée chez la corbicule montre une augmentation significative des concentrations d'or dans les tissus dès le cinquième jour d'exposition, avec des concentrations environ 10 fois supérieures dans la masse viscérale comparativement aux branchies et au manteau.

Pour l'anguille, les dosages attestent d'un transfert et d'une internalisation de l'or chez les organismes exposés, avec des concentrations 5 fois supérieures dans les reins comparativement au foie. Pour les branchies, aucune présence n'a pu être observée chez les poissons exposés.

Enfin, l'étude de la réponse transcriptomique visait à renseigner l'expression de 15 gènes associés à la réponse inflammatoire, à la prolifération cellulaire et aux processus d'apoptose, à la régulation de l'oxydoréduction, et enfin, aux rythmes biologiques. Le cerveau, le foie et l'intestin ont été sélectionnés comme organes cibles. Les résultats ne montrent aucune différence significative d'expressions géniques pour le cerveau. Pour l'intestin, un gène associé aux rythmes biologiques répond de manière significative à la contamination trophique ; pour le foie, deux gènes associés à la réponse inflammatoire et un gène associé à l'apoptose, s'avèrent différenciellement exprimés chez les organismes exposés.

5.3. CONCLUSION

Cette expérience illustre (1) la capacité des nanoparticules à transférer dans une chaîne alimentaire à trois maillons et (2) une réponse transcriptomique associée à l'internalisation du contaminant pour le plus haut niveau trophique.

*CHAPITRE 5. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE D'UNE CHAÎNE ALIMENTAIRE À
TROIS MAILLONS*

Chapitre 6

Discussion générale et perspectives

Les travaux de cette thèse visaient à renseigner la capacité de transfert des nanoparticules d'or le long des chaînes trophiques aquatiques d'une part, et d'en évaluer les réponses biologiques induites *via* différentes approches d'autre part. Alors qu'actuellement la littérature associée à la nanoécotoxicologie se positionne essentiellement sur l'étude des expositions relativement courtes et concentrées sur les premiers niveaux trophiques, ce travail s'est davantage orienté vers des temps d'exposition allongés en considérant des organismes de différents niveaux trophiques (biofilm naturel de rivière, poisson brouteur, bivalve filtreur) avec un prédateur haut de chaîne, l'anguille européenne. Par ailleurs, alors que classiquement l'évaluation des effets s'inscrit dans le précepte des « biomarqueurs » de natures diverses, ce travail s'est orienté, pour partie, vers une approche résolument moins exclusive, en considérant notamment la réponse de l'ensemble du transcriptome à l'exposition aux nanoparticules d'or. Les principaux résultats sont synthétisés dans la figure 6.1.

L'apport scientifique de l'ensemble des résultats, ainsi que leurs limites, sont discutés dans ce chapitre, dont la clôture souligne par ailleurs les perspectives de recherche.

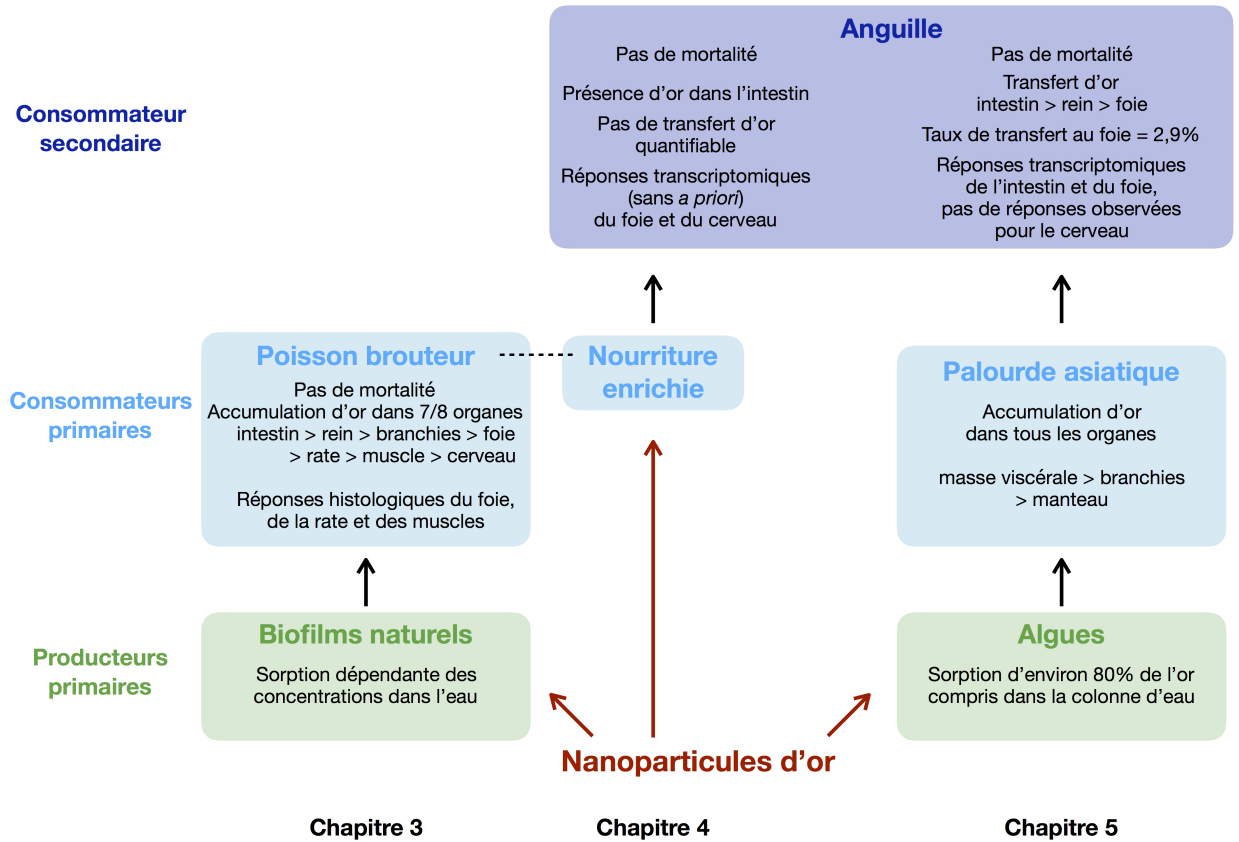


FIGURE 6.1 – Représentation synthétique des principaux résultats de ce travail.

6.1 Évaluation du transfert trophique

Le transfert trophique a été évalué au regard de la bioaccumulation d'or pour les organismes exposés.

6.1.1 Producteurs primaires

Le premier point souligné par ces expérimentations concerne la capacité de sorption des nanoparticules pour les premiers niveaux trophiques, s'agissant ici des biofilms naturels de rivière (CHAPITRE 3) ou des algues en suspension (CHAPITRE 5). Ces résultats font consensus avec ceux de la littérature dans laquelle davantage de données sont disponibles pour le phytoplancton (GOODMAN et al. 2004; LARGUINHO et al. 2014; RENAULT et al. 2008). L'équipe de FERRY et al. (2009) a été la première, dans le cadre de mésocosmes estuariens, à s'intéresser au cas des biofilms. Il s'en est suivi d'autres études pour les sols ennoyés de rizières notamment (YEO et NAM 2013). L'originalité du présent travail concerne le choix de biofilms naturels préalablement colonisés en rivière, permettant d'évaluer les capacités de sorption des nanoparticules par un biofilm rencontré *in situ*. L'évaluation du transfert a été abordée pour une gamme de concentrations, pour laquelle les capacités d'accumulation des biofilms naturels semblent élevées et linéaires avec le milieu d'exposition. Néanmoins, une évaluation de la composition biologique et chimique du biofilm, pour expliquer les importantes capacités de sorption, est nécessaire. Cependant, au vu de la complexité de ce compartiment, et de la « boîte noire » qu'il représente encore de nos jours (FLEMMING et al. 2016), pour qu'elle soit satisfaisante, cette évaluation requiert l'intervention de spécialistes de la taxonomie et nécessite par ailleurs le développement d'outils analytiques adaptés. En effet, les biofilms étant composés d'un ensemble d'organismes différents (microalgues, bactéries, champignons, *etc.*) dont l'abondance relative est à même d'évoluer au cours du temps, il semble tout à fait envisageable que la composition biologique du biofilm modifie les capacités de sorption de celui-ci. Et ce d'autant plus que, la matrice qui assure la cohésion du biofilm est synthétisée par les organismes eux-mêmes, alors que sa composition chimique (variable) joue directement un rôle dans la sorption passive des polluants (FLEMMING et al. 2016). De même, des efforts méthodologiques sont nécessaires pour renseigner la distribution des nanoparticules à l'intérieur des biofilms, notamment pour évaluer si ce contaminant reste piégé dans la matrice ou s'il est absorbé par les organismes qui composent le biofilm.

Toutefois, l'ensemble de ces résultats souligne que les producteurs primaires d'eau douce constituent un puits et une source potentiellement importante de nanoparticules pour le maillon supérieur.

6.1.2 Consommateurs primaires

Dans cette étude, deux consommateurs primaires ont été sélectionnés, représentant tous deux un mode alimentaire distinct, à savoir par filtration ou par broutage. Les dosages d'or attestent d'un transfert entre le producteur et le consommateur primaire selon les modalités d'exposition.

Pour le cas des algues - corbicules (CHAPITRE 5), de l'or est mesuré dès le cinquième jour d'exposition continue dans les organismes. Des études cinétiques, en augmentant la fréquence d'échantillonnage, devraient confirmer le profil d'absorption des nanoparticules. Les concentrations dans la masse viscérale demeurent relativement stables tout au long de l'exposition semblant témoigner de l'exposition constante aux nanoparticules des corbicules ou que l'accumulation maximale dans cet organe est atteinte. Dans un niveau environ 10 fois moindre, les branchies et le manteau présentent quant à eux une augmentation des concentrations d'or au cours du temps, qui pourrait résulter d'une redistribution du contaminant à l'échelle de l'organisme et/ou d'autres voies d'entrée dont la cinétique d'internalisation serait plus lente.

Pour le transfert des biofilms naturels aux poissons brouteurs (CHAPITRE 3), une distribution de l'or est avérée dans tous les organes étudiés, à l'exception du tissu cardiaque. Les branchies, le foie et la rate présentent des bioaccumulations dose-dépendantes, alors que pour l'intestin vidangé, le rein et le muscle, les bioaccumulations diffèrent entre les poissons témoins et exposés. En revanche, cette expérience a montré une accumulation significative dans le cerveau pour le niveau d'exposition le plus élevé, avec une augmentation d'un facteur 4 pour la concentration comparativement aux témoins. En toxicologie, une source d'interrogation majeure dans le cas des nanoparticules concerne leurs capacités à franchir la barrière hémato-encéphalique, celle-ci assurant notamment la protection du cerveau face aux xénobiotiques. Alors que ces études portent sur des mammifères, chez les poissons, la physiologie de cette barrière est nettement moins connue et s'avère différente de celle des mammifères (BERNSTEIN et STREICHER 1965). Au delà de la question du transfert au cerveau montré ici, des effets toxiques sont observés dans cet organe (Cf. section 6.2).

En accord avec la littérature, les résultats de ce travail attestent de

l'existence d'un transfert au consommateur primaire à partir de producteurs contaminés par des nanoparticules d'or. Cependant, à notre connaissance, il s'agit de la première étude d'exposition chronique portant sur un consommateur primaire vertébré.

6.1.3 *Continuum* trophique jusqu'à l'anguille

Ce travail a également porté sur la réalisation d'un « *continuum* » intégrant trois niveaux trophiques (CHAPITRE 5). Malgré le challenge expérimental qu'a représenté cette expérimentation, l'exposition des organismes peut être considérée pour cette expérience comme relativement maîtrisée dans le temps. Il est en effet important de souligner que les concentrations d'or mesurées dans les milieux d'exposition des unités apparaissent comme reproductibles au cours de l'exposition (15 jours). La variabilité des niveaux d'exposition, exprimée par le ratio entre le SE et la moyenne, est faible, inférieur à 4,2% pour ce qui concerne les algues et les corbicules ($529,0 \pm 13,1 \mu\text{g Au L}^{-1}$ et $118,7 \pm 5,0 \mu\text{g Au L}^{-1}$, respectivement). Un autre point à souligner concerne la prise alimentaire des anguilles qui est identique entre la condition contrôle et la condition exposée. Par conséquent, le dispositif expérimental, tel qu'il a été conçu ici, pourrait être reconduit pour des problématiques similaires à celle posée ici.

Concernant la première phase de transfert (algues - corbicules), environ 80% de l'or présent dans le milieu est sorbé aux algues. Les différences de concentration pour l'or et pour les algues, d'un facteur 4 et 3,2 respectivement, entre la solution de la réserve d'algues et le milieu d'exposition des corbicules, est imputable à l'activité de filtration des organismes, au dépôt au fond des bacs (malgré l'homogénéisation permanente par mouvement de convection), et à la perte inhérente à tous les systèmes d'exposition (sorption sur les plastiques, *etc*). Le facteur de concentration (calculé dans le CHAPITRE 5) intègre par conséquent la concentration d'or mesurée dans le milieu d'exposition des corbicules, à savoir $118,7 \pm 5,0 \mu\text{g Au L}^{-1}$.

La deuxième phase concerne le transfert « naturel » jusqu'à un consommateur secondaire, l'anguille européenne. Aucune présence d'or n'a été mise en évidence dans l'eau d'exposition des anguilles, permettant de considérer le transfert trophique comme la seule voie de transfert. L'analyse des dosages d'or montre une accumulation significative dans l'intestin, le

foie et les reins des anguilles exposées, alors que les niveaux d'or dans les branchies sont inférieurs à la limite de détection analytique. Ces résultats attestent clairement de la capacité des nanoparticules à transférer *via* la voie trophique jusqu'à un consommateur secondaire.

Dans la littérature, les expérimentations à trois niveaux trophiques demeurent peu nombreuses. La plus récente est celle de CHAE et al. (2016), qui montre visuellement un transfert, sans internalisation, entre levure - collembole et collembole - cloporte pour les quantum dots de Cd/Se enrobés par du ZnS et pour des temps d'exposition de 3 jours et de 1 heure, respectivement. Bien qu'en de nombreux points divergente de celle de CHAE et al. (2016) pour les choix expérimentaux, la présente expérimentation à trois niveaux trophiques souligne clairement un transfert avec internalisation, pour des temps d'exposition (15 et 21 jours) pouvant être considérés comme chroniques au regard de la littérature. Ainsi, ce travail illustre que les nanoparticules sont en mesure d'être internalisées jusqu'aux organismes de haut de chaîne trophique.

6.1.4 Transferts à l'anguille au regard des modalités d'exposition

Deux expérimentations (CHAPITRE 4 & CHAPITRE 5) ont porté sur l'étude du transfert trophique à l'anguille, dans un cas à partir de nourriture enrichie aux nanoparticules, dans l'autre à partir de nourriture « naturellement » contaminée.

S'agissant de la nourriture enrichie, aucune bioaccumulation significative d'or n'a été mesurée, indiquant une absence d'internalisation des nanoparticules. Seul l'intestin présentait des concentrations d'or significativement plus élevées que celles des témoins. Néanmoins, les choix méthodologiques ne permettent pas de discerner les fractions ad et absorbées dans cet organe.

Dans le cas de la nourriture « naturellement » contaminée, l'internalisation des nanoparticules d'or a été mise en évidence, avec notamment une augmentation significative des concentrations d'or dans les foies et reins des anguilles exposées.

6.1. ÉVALUATION DU TRANSFERT TROPHIQUE

Ainsi, au regard de ces résultats, il semblerait que la conception des expérimentations, bien que toutes deux dans le cadre d'exposition trophique, a en toute logique un impact sur l'interprétation des résultats. Si les durées d'exposition pour ces deux expérimentations sont identiques (21 jours), d'autres divergences ne sont pas à exclure (masse des anguilles, différences de concentrations d'exposition et de biodisponibilité). Une différence majeure entre ces deux expérimentations concerne la spéciation biologique des nanoparticules dans la nourriture donnée aux anguilles. La question d'une potentielle transformation au long de la chaîne trophique, en incluant les postulats de « biocorona », est ici posée, sans pour autant apporter de certitude. En effet, un nombre croissant de travaux de recherche suggèrent que, dès lors que les nanoparticules entrent en contact avec des fluides physiologiques, elles sorbent des protéines et d'autres biomolécules, qui vont former en conséquence une couche autour des nanoparticules nommée « biocorona ». Or, des travaux récents, conduits sur des cellules endothéliales humaines ont montré que (1) la nature chimique de l'enrobage des nanoparticules d'or influence fortement la composition de la « biocorona » et que (2) l'internalisation dans les cellules est dépendante de cette dernière (CHANDRAN et al. 2017). Donc ces résultats pourraient illustrer que, dès lors que les nanoparticules entrent en interaction et sont internalisées par les organismes de bas de chaînes trophiques, elles subissent des transformations à même de modifier leur biodisponibilité pour le maillon supérieur. De la même manière, des altérations des nanoparticules en raison des variations physico-chimiques du milieu interne de chaque organisme, peuvent également modifier leur biodisponibilité. Ainsi, la dualité des résultats d'internalisation, mise en évidence par la comparaison de ces deux expérimentations, invite à réfléchir quant à la transposition expérimentale des scénarios environnementaux (à défaut d'études *in situ*) pour ce qui concerne l'évaluation des transferts trophiques des nanoparticules (nourriture enrichie *versus* nourriture « naturellement » contaminée). Dans l'évaluation des transferts trophiques, l'utilisation de nourriture artificielle enrichie est une première étape, exploratoire et facile à réaliser. Elle permet en première approche d'évaluer le potentiel de transfert d'un contaminant. Dans le cas des nanoparticules, cette première approche n'a pas fourni les résultats attendus et impose l'utilisation de conditions réalistes d'exposition.

6.2 Évaluation des réponses induites

6.2.1 À l'échelle tissulaire, chez le consommateur primaire

Des observations histologiques ont été conduites chez le poisson brouetteur après 21 jours d'exposition aux biofilms naturels contaminés aux nanoparticules d'or (CHAPITRE 3). Ces analyses histologiques portent sur le foie, la rate et les muscles des poissons exposés au niveau le plus élevé par comparaison aux poissons non exposés. À noter que pour ces trois organes, l'accumulation d'or est significativement différente entre les poissons contrôles et exposés.

Pour le foie, une augmentation de l'occurrence de gouttelettes lipidiques, ainsi qu'une vacuolisation du cytoplasme des hépatocytes ont été mises en évidence. Ces observations peuvent être assimilées à une dégénérescence graisseuse, comme observée dans l'expérimentation de WANG et al. (2016).

Pour la rate, le tissu des poissons exposés présente des structures s'apparentant à des centres de mélanomacrophages, associés à la réponse à un stress environnemental chez les poissons (AGIUS et ROBERTS 2003; HERRAEZ et ZAPATA 1986).

Enfin, pour le tissu musculaire, une déstructuration de l'organisation des myofibrilles est nettement observable ici, alors qu'il a été par ailleurs illustré une tendance à l'inflammation et à l'apoptose pour les cellules musculaires (LEITE et al. 2015).

Ces observations sont intéressantes parce qu'elles rendent compte d'une réponse à l'échelle d'un tissu, en intégrant de fait la diversité des types cellulaires. Néanmoins, les connaissances histopathologiques pour les poissons demeurent relativement limitées, ne facilitant pas l'identification des structures. Cependant, ces résultats présentent une certaine cohérence avec les données de la littérature. En effet, ces observations histologiques pourraient témoigner de la génération d'un stress oxydant par les nanoparticules (HENICS et WHEATLEY 1999; PAN et al. 2009; STONE et DONALDSON 2006) mais également d'une réponse inflammatoire (HONG et al. 2016; WANG et al. 2016) et d'une perturbation de l'homéostasie des tissus (CEDERVALL et al. 2012; DEL MONTE 2005; HENICS et WHEATLEY 1999). Notons

que ce marqueur apparaît comme sensible et précoce. Il est régulièrement utilisé pour d'autres xénobiotiques. L'étude confirme l'intérêt de cette approche.

6.2.2 À l'échelle transcriptionnelle, chez le consommateur secondaire

L'évaluation des réponses transcriptomiques a été conduite chez l'anguille, alors qu'à ce jour, très peu d'études dans la littérature renseignent les effets induits par les nanoparticules chez les organismes prédateurs (TANGAA et al. 2016). Chronologiquement dans ce travail, l'approche par séquençage de l'ARN (CHAPITRE 4) a été initiée avant la réalisation du *continuum* trophique (CHAPITRE 5), afin d'étudier, dans un premier temps, la réponse transcriptomique des organismes en s'inscrivant plutôt dans une démarche de toxicologie en termes d'exposition des organismes.

Approche sans *a priori* : séquençage du transcriptome

Ainsi, la technique de séquençage haut-débit du transcriptome présente un intérêt certain car elle permet l'exploration de l'expression génique à un instant t sans préjuger d'aucune réponse chez les organismes. Cette approche prend le contre-pied de la logique des « biomarqueurs », dont l'avantage routinier n'est par ailleurs plus à démontrer.

De fait, cette approche a montré que, sur l'ensemble du transcriptome de l'anguille, soit 50 479 transcrits, 258 et 156 gènes sont significativement différentiellement exprimés dans le foie et le cerveau, respectivement, chez les anguilles exposées aux nanoparticules d'or par comparaison aux anguilles non-exposées. En considérant le nombre total de transcrits, cela correspond à une expression différentielle de 0,51% de gènes pour le foie et 0,31% pour le cerveau. Bien que ces pourcentages puissent sembler faibles, l'analyse des données à partir de cette liste de gènes différentiellement exprimés montre un enrichissement des fonctions biologiques impliquées dans le système immunitaire, à la réponse à un stimulus et à la mort cellulaire pour le foie. En toxicologie, une étude menée sur des souris s'est également intéressée à la réponse transcriptomique du foie à la suite d'une injection en intraveineuse de nanoparticules d'or enrobées au PEG de 4 et 100 nm (CHO et al. 2009). Alors que la proportion de gènes

différentiellement exprimés dans le foie est similaire à celle de ce travail (0,38% pour les 4 nm et 0,50% pour les 100 nm), les auteurs ont également montré que ces gènes étaient associés à l'apoptose, à l'inflammation et aux processus métaboliques (CHO et al. 2009). Il est ici intéressant de noter que ces deux expérimentations, qui présentent des modalités opératoires différentes, soulignent des effets apparentés similaires pour les nanoparticules d'or enrobées au PEG. Par conséquent, les réponses biologiques associées aux processus sus-mentionnés semblent présenter une piste à approfondir dans le cadre de l'évaluation écotoxicologique des nanoparticules d'or.

La réponse commune de deux organes dont les fonctions biologiques divergent, à savoir le foie et le cerveau, interpelle, et semble associée à l'inflammation, avec notamment les deux gènes *nlr* différenciellement exprimés par comparaison aux témoins. À notre connaissance, il s'agit de la première mise en évidence d'une réponse de ces gènes dans un contexte écotoxicologique, alors que d'autres études sur cultures cellulaires ont montré récemment l'implication de ceux-ci dans le déclenchement de l'inflammasome associé à l'exposition aux nanoparticules de SiO₂, de TiO₂, d'Ag ou d'ITO (BARON et al. 2015; MISHRA et al. 2016; NAJI et al. 2016; WINTER et al. 2011).

Enfin, cette expérimentation atteste d'une réponse transcriptomique dans deux organes en l'absence d'un transfert quantifiable des nanoparticules. Similairement, GEFROY et al. (2012) ont souligné la propension des nanoparticules d'or à entraîner une modification de l'expression génique, révélée par des analyses q-PCR, pour des tissus où les niveaux d'or étaient sous les limites de détections analytiques. Ainsi, ces résultats interpellent quant à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux. En effet, avec une induction d'effets transcriptomiques, en l'absence de transfert, la toxicité des nanoparticules pourrait également être qualifiée d'indirecte. Comme évoqué dans le CHAPITRE 4, l'ensemble de ces résultats pourraient illustrer le rôle majeur du tractus digestif, en suggérant son implication dans la réponse à l'échelle de l'organisme.

En considérant l'ensemble de ces résultats au regard des données de la littérature, plusieurs hypothèses ont été évoquées : (1) le rôle de l'intestin dans le déclenchement du système immunitaire en réponse à un stimulus (apparenté à la présence des nanoparticules dans le bol alimentaire), (2) l'action des nanoparticules sur le microbiome intestinal, et (3) l'action des

nanoparticules sur la fonctionnalité digestive.

Approche classique : analyses q-PCR

Dans la seconde expérimentation, qui se veut davantage représentative d'un transfert trophique « naturel », l'expression des gènes chez l'anguille a été étudiée par une approche classique, à savoir des réactions de polymérisation en chaîne en temps réel (RT q-PCR). Cette méthode implique le design préalable d'amorces permettant de cibler l'expression des gènes d'intérêt. Cela implique donc une sélection *a priori* des gènes à étudier. Par conséquent, cette sélection s'est faite à partir des gènes qui avaient été différentiellement exprimés chez l'anguille par l'approche de séquençage. De plus, la potentielle implication de l'intestin dans la réponse à l'échelle de l'organisme étant évoquée, ce tissu a été considéré pour cette seconde expérimentation. Au regard des gènes sélectionnés, cette expérimentation atteste d'une expression différentielle pour quelques gènes dans l'intestin et le foie des anguilles, alors qu'aucune différence significative n'est observée pour le cerveau. Pour le foie, deux gènes concernent la réponse inflammatoire et un gène supplémentaire est associé à la régulation de l'apoptose. Pour l'intestin, seul le gène *per* impliqué dans la régulation des rythmes biologiques est différentiellement exprimé comparativement aux anguilles non-exposées.

Comparaison des résultats associés aux deux approches : séquençage du transcriptome vs analyses q-PCR

L'ensemble de ces résultats interpelle quant à la réponse transcriptomique des anguilles exposées par la voie trophique. En effet, pour ces deux expériences, la durée d'exposition est identique (21 jours), les niveaux d'exposition sont du même ordre de grandeur, et aucune présence d'or n'a été retrouvée dans l'eau, permettant de n'envisager que la voie trophique comme voie de contamination. Bien que l'expression différentielle de certains gènes s'avère commune entre ces deux expérimentations, les résultats ne semblent toutefois pas attester d'une réponse similaire entre ces deux expérimentations au regard des gènes sélectionnés dans la démarche en q-PCR. Deux hypothèses

pourraient permettre d'expliquer ces résultats.

La première concerne le mode d'exposition (nourriture enrichie *versus* « naturellement » contaminée). En effet, comme précédemment évoqué, si la question de la modification ou altération des nanoparticules accumulées dans les organismes se pose pour l'évaluation du transfert, elle se pose aussi pour l'évaluation des effets. Une fois encore, sans pour autant apporter la réponse concernant les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules internalisées par les organismes, son rôle peut être suspecté ici. En effet, il a été montré que la composition de la « corona » était en mesure d'impacter l'expression génique après exposition de cultures cellulaires (CHANDRAN et al. 2017).

L'autre hypothèse concerne la cinétique des réponses des organismes. En effet, dans un cas, aucune internalisation n'est observée, et l'impact transcriptomique évalué à l'échelle globale atteste notamment d'une réponse inflammatoire; dans l'autre cas, l'internalisation est significative, et l'impact transcriptomique évalué *a priori* ne révèle pas d'expression différentielle de la majorité des gènes sélectionnés. Ainsi, il est aussi envisageable de suggérer que la réponse inflammatoire s'apparente à une réponse fugace, et qu'une fois que l'internalisation est avérée, d'autres mécanismes adaptatifs sont mis en place par les organismes. Cette hypothèse pourrait être appuyée par le travail de FALAGAN-LOTSCH et al. (2016) qui a montré que les cellules peuvent s'adapter à une exposition à long terme des nanoparticules.

6.3 Limitations analytiques et conceptuelles

6.3.1 Caractérisation des nanoparticules dans les matrices complexes

Étudier les transferts trophiques, c'est accepter de ne pas contrôler la physico-chimie du contaminant liées aux transformations potentielles après internalisation. Cependant, il n'en demeure pas moins nécessaire de renseigner la physico-chimie et la taille des nanoparticules dans les matrices biologiques. L'avancée des techniques analytiques ne permet toutefois pas pour l'heure de générer facilement ce type d'informations et de nombreuses mises au point s'avèrent encore nécessaires.

6.3. LIMITATIONS ANALYTIQUES ET CONCEPTUELLES

Une tentative a été envisagée pour ce travail avec la réalisation d'analyses EDX sur coupes histologiques (Cf. CHAPITRE 2). Or, la détection en MET des nanoparticules dans les organismes n'est déjà pas aisée, et tout particulièrement pour des expérimentations réalisées à doses relativement faibles. Les observations mettaient en évidence ponctuellement la présence d'amas plus denses pouvant s'apparenter à des nanoparticules, mais dont l'analyse élémentaire localisée par sonde EDX n'a pas permis d'identifier l'or, alors que les dosages d'or à l'échelle des tissus étudiés s'avéraient significatifs. Un point à souligner concerne la préparation des échantillons pour observations en MET et les analyses EDX qui en découlent. La fixation chimique et l'inclusion en résine utilisent un cocktail de substances diverses, dont la nécessité pour la qualité de l'observation n'est pas à remettre en cause, mais dont l'interaction avec le contaminant peut être suspectée. Dans notre cas, l'osmium, en tant qu'agent contrastant, peut sembler être *a priori* un facteur d'interférence pour les analyses EDX en raison de sa proximité avec l'or sur la classification périodique. Mais des tests réalisés en substituant cet élément ne se sont pas avérés plus concluants, car les coupes deviennent difficiles à observer, et qu'en conséquence, le ciblage de la zone d'intérêt pour le faisceau EDX devient trop difficile. Par ailleurs, en raison d'une probable transformation, il est aussi limitant de ne chercher finalement, dans les coupes histologiques, qu'une nanoparticule de taille et de forme identique à celles qui ont été introduites dans le système et préalablement caractérisées dans un milieu d'eau ultra-pure.

D'autres techniques comme la micro- et nano-tomographie, basées sur la détection des éléments chimiques au regard de leurs densités, permettent la détection des nanoparticules dans les matrices biologiques. La spectroscopie d'absorption des rayons X en synchrotron constitue également une technique pour renseigner la spéciation des nanoparticules dans les tissus biologiques. Si la puissance analytique des techniques précédemment citées n'est pas à démontrer, il n'en demeure pas moins qu'elles sont lourdes à mettre en place et nécessitent une mise au point pour l'adaptation aux études environnementales. Ces types d'équipement restent rares, donc peu disponibles, et nécessitent un savoir-faire important (HANDY et al. 2008).

La caractérisation des nanoparticules dans les matrices biologiques apparaît donc pour l'heure comme une limitation majeure à l'avancée de la

compréhension des transferts et des effets de ces contaminants dans un contexte environnemental. À noter que très récemment, Li et al. (2017) ont réussi à identifier et quantifier la taille de nanoparticules d'or dans des tissus grâce au couplage de la spectrométrie de masse et de l'ablation laser.

6.3.2 L'insoluble question de l'origine des réponses biologiques observées

Ce point découle directement du paragraphe précédent, à savoir la caractérisation physico-chimique des nanoparticules. En effet, la connaissance de l'origine des réponses biologiques observées chez les organismes prend tout son sens dans le cadre de la problématique des nanoparticules. En effet, pour l'exposition aux nanoparticules, il est difficile de distinguer la toxicité associée à la particule elle-même, de l'influence de leur dissolution partielle ou de leur enrobage, mais aussi des impuretés issues de leur synthèse ou encore de tout autre biotransformation qu'elles auraient pu subir. C'est pourquoi il convient, comme le suggèrent certains (BOUR et al. 2015a ; PETERSEN et al. 2014), de considérer que les effets observés sont à associer à un ensemble comprenant les nanoparticules, l'enrobage, les ions libérés et les impuretés. Par ailleurs, les résultats de ce travail semblent aussi souligner que les potentielles modifications induites par l'internalisation des nanoparticules chez les organismes doivent également être prises en compte pour la compréhension des réponses biologiques aux nanoparticules.

Pour essayer de distinguer un effet lié à la forme nanoparticulaire, certaines expérimentations comparent les effets observés chez les organismes en présence de nanomatériaux et en présence du même matériau à l'état non-particulaire (souvent la forme ionique). Or, pour que cette comparaison soit exacte, en toute logique, seule la taille devrait différer. Néanmoins, cela s'avère quasiment impossible dans les faits comme le souligne certains auteurs (BOUR et al. 2015a ; HANDY et al. 2012). Et par ailleurs, si cela semble relativement envisageable pour certains designs expérimentaux, dans le cas des études trophiques telles que celles à trois maillons trophiques, ce type d'initiative apparaît comme difficilement réalisable en raison d'un nombre d'organismes nécessaires déjà importants « seule-

ment » pour la modalité nanoparticulaire.

6.3.3 Représentativité(s) environnementale(s) ?

En partant du postulat que les interactions trophiques constituent une des relations majeures entre les organismes d'un écosystème, et qu'en outre cette voie semble autoriser une capacité importante de transfert pour les nanomatériaux, ce travail tendait à intégrer, pour partie, la complexité environnementale. L'objectif et la nécessité de tendre vers des scénarios environnementaux « réalistes », afin de générer une évaluation pertinente des risques associés aux nanomatériaux pour les écosystèmes, dépassent très largement le cadre de ce travail. Le choix des doses d'exposition constitue l'une des premières interrogations lors de la conception des expériences. Épineuse question dès lors que les concentrations environnementales ne sont pas connues et que par ailleurs les seuils de détection analytique peuvent aussi s'avérer limitants. Mais les modalités d'expositions s'avèrent tout autant d'importance majeure dans le cadre de la problématique du transfert trophique des nanomatériaux.

Ainsi, il convient à la communauté scientifique de s'interroger dans quelle mesure l'ensemble des études expérimentales de la littérature sont-elles généralisables aux milieux naturels ? Et de déterminer quels sont les outils pertinents pour permettre une évaluation intégrative des effets générés par les nanoparticules sur les organismes vivants ?

6.4 Perspectives de recherche

Les résultats de ce travail suggèrent la nécessité de poursuivre les expérimentations selon les propositions suivantes.

Parmi les limitations évoquées précédemment, s'agissant de ce travail et des études en environnement en général, le besoin de mieux caractériser la spéciation des nanoparticules est évident. Pour ce travail, les investigations pour les analyses EDX ont exclusivement porté sur l'analyse de tissus de poissons. Par ailleurs, dans le cadre de l'ANR « CITTOXIC-Nano », une collaboration a été initiée pour la réalisation d'analyses de tomographie sur des poissons entiers. Ces tests préliminaires, bien qu'encourageants, ne

se sont pas avérés concluants. Ils nécessitent d'importantes mises au point pour les matrices biologiques alors qu'ils sont relativement bien maîtrisés dans des matrices simples (eau ultra-pure, *etc.*). Afin de poursuivre les efforts en ce sens, et avancer dans la mise au point de ces techniques, il serait nécessaire de reprendre ces analyses dans un milieu dont la complexité est intermédiaire, c'est à dire entre la solution d'eau ultra-pure et le tissu biologique. Par exemple, cela pourrait être la solution algues - nanoparticules à l'origine du *continuum* trophique et dont la composition chimique est connue. Cela permettrait notamment d'identifier l'environnement chimique des nanoparticules dans un milieu contenant, entre autres, de la matière organique.

Ensuite, l'allongement des durées d'exposition constitue également un intérêt certain afin d'accroître la compréhension des expositions chroniques, qui constituent des scénarios environnementaux réalistes. Les expositions de 21 jours réalisées pour ce travail sont plus longues comparativement à ce qui est généralement pratiqué dans la littérature. Cette durée de 21 jours a systématiquement permis de mettre en évidence une réponse biologique à l'exposition aux nanoparticules. Néanmoins, en nanotoxicologie, où l'avancée des connaissances sur le sujet est incontestablement supérieure, il a été montré des effets à plus long-terme, notamment jusqu'à deux mois après l'injection de nanoparticules (BALASUBRAMANIAN et al. 2010). Ainsi, il convient de s'appuyer sur ces résultats de toxicologie pour éventuellement renseigner des effets similaires dans un contexte environnemental. Et cela permettrait par ailleurs de mettre en évidence des mécanismes d'acclimatation à la pression de contamination des nanoparticules, comme cela a été montré à l'échelle de cultures cellulaires (FALAGAN-LOTSCH et al. 2016).

À défaut d'avoir pour l'instant des moyens analytiques pour caractériser correctement la physico-chimie des nanomatériaux dans les organismes, des outils biologiques puissants existent et se sont démocratisés ces dernières années pour les études d'impacts.

Ce travail a porté pour partie sur une étude d'effets sans *a priori*, par une approche de séquençage haut-débit de l'ARN, dont l'intérêt est une nouvelle fois avéré ici. Par ailleurs, dans le cas du « *continuum* » trophique, les analyses de transcriptomique *a priori* ont révélé des modulations dans l'expression de certains des gènes sélectionnés, mais les résultats laissent à

penser que la réponse à une exposition « naturelle » est possiblement différente. Il serait par conséquent tout particulièrement intéressant d'analyser ultérieurement, par séquençage haut-débit de l'ARN, les foies, cerveaux et intestins de ces anguilles. Cela permettrait (1) de renseigner les effets générés chez les organismes pour lesquels un transfert a été montré et, (2) d'inclure les effets des nanoparticules ayant subi une potentielle modification en raison d'un transfert trophique en amont.

En parallèle, l'étude du protéome commence à se développer en routine. Ce type d'étude permet d'appréhender les processus biologiques dans un niveau d'intégration final pour l'expression des gènes ; les protéines étant à l'origine du fonctionnement physiologique de la cellule.

Enfin, parce qu'elle est à l'interface entre le bol alimentaire et la première barrière biologique en contact avec les nanoparticules des organismes exposés par voie trophique, la microflore intestinale devrait faire l'objet d'investigations. En effet, la fonctionnalité de l'intestin est en lien direct avec l'activité de la microflore qui le colonise. Chez l'humain, la masse du microbiome intestinal a été évaluée à 1kg et semble impliquer jusqu'à 5000 espèces (BERGIN et WITZMANN 2013). L'ensemble de ces organismes joue un rôle important dans les processus de digestion et dans les fonctions immunologiques du tissu intestinal (BERGIN et WITZMANN 2013). L'altération du microbiome semble par ailleurs influencer la santé de l'hôte (BOUWMEESTER et al. 2017 ; MARCHESI et al. 2016). Des souris exposées par voie orale à des particules à raison de 10 à 13 mg g⁻¹ jour⁻¹ ont montré une altération de la composition microbienne dans le côlon, une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et une diminution des concentrations de butyrate (BOUWMEESTER et al. 2017). À l'heure actuelle, les effets des nanomatériaux sur le microbiome sont encore très peu étudiés, et ce même en toxicologie (BOUWMEESTER et al. 2017). Ainsi, selon l'hypothèse qu'une modification du microbiome intestinal en raison de l'ingestion de nanoparticules pourrait engendrer des effets chez l'hôte, il semble nécessaire de conduire des études selon cette hypothèse dans un contexte environnemental. À noter que la considération de ce type d'interaction microbiome-hôte permettrait de mieux comprendre les effets constatés chez les organismes exposés en l'absence d'un transfert évident.

CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Chapitre 7

Bibliographie

CHAPITRE 7. BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- AGIUS, C. et ROBERTS, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26.9, 499–509. DOI : 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x.
- ALBANESE, A. et CHAN, W. C. W. (2011). Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano* 5.7, 5478–5489. DOI : 10.1021/nn2007496.
- ALIVISATOS, A. P. (1996). Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* 271.5251, 933–937.
- ANSES (2014). Evaluation des risques liés aux nanomatériaux - Enjeux et mise à jour des connaissances. *Rapport d'expertise collective*, 1–196.
- ANSES (2017). Avis de l'Anses, Saisine n°2017-SA-0020, relatif à une demande d'avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane, 1–17.
- ANTOSH, M. P., WIJESINGHE, D. D., SHRESTHA, S., LANOU, R., HUANG, Y. H., HASSELBACHER, T., FOX, D., NERETTI, N., SUN, S., KATENKA, N., COOPER, L. N., ANDREEV, O. A. et RESHETNYAK, Y. K. (2015). Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.17, 5372–6. DOI : 10.1073/pnas.1501628112.
- ARAÚJO, R., MEIRA, A. C. et FIÚZA, A. (2015). The use of nanoparticles in soil and water remediation processes. *Materials Today : Proceedings* 2.1, 315–320. DOI : 10.1016/j.matpr.2015.04.055.
- ATES, M., ARSLAN, Z., DEMIR, V., DANIELS, J. et FARAH, I. O. (2014). Accumulation and Toxicity of CuO and ZnO Nanoparticles Through Waterborne and Dietary Exposure of Goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology* 30, 119–128. DOI : 10.1002/tox.
- AVISE, J. (2003). *Catadromous eels of the North Atlantic : A review of molecular genetic findings relevant to natural history, population structure, speciation, and phylogeny*. Springer-Verlag Tokyo, p. 31–48.
- BAALOUSHA, M., YANG, Y., VANCE, M. E., COLMAN, B. P., MCNEAL, S., XU, J., BLASZCZAK, J., STEELE, M., BERNHARDT, E. et HOCELLA, M. F. (2016). Outdoor urban nanomaterials : The emergence of a new, integrated, and critical field of

BIBLIOGRAPHIE

- study. *Science of the Total Environment* 557-558, 740–753. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2016.03.132.
- BAI, C. (2001). Progress of nanoscience and nanotechnology in China. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 3, 251–256.
- BAI, W., ZHANG, Z., TIAN, W., HE, X., MA, Y., ZHAO, Y. et CHAI, Z. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo : A physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12.5, 1645–1654. DOI : 10.1007/s11051-009-9740-9.
- BAILEY, R. E., SMITH, A. M. et NIE, S. (2004). Quantum dots in biology and medicine. *Physica E* 25, 1–12. DOI : 10.1016/j.physe.2004.07.013.
- BAILLON, L., PIERRON, F., COUDRET, R., NORMENDEAU, E., CARON, A., PELUHET, L., LABADIE, P., BUDZINSKI, H., DURRIEU, G., SARRACO, J., ELIE, P., COUTURE, P., BAUDRIMONT, M. et BERNATCHEZ, L. (2015). Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology* 24.1, 71–84. DOI : 10.1007/s10646-014-1356-x.
- BALANSKY, R., LONGOBARDI, M., GANCHEV, G., ILTCHEVA, M., NEDYALKOV, N., ATANASOV, P., TOSHKOVA, R., DE FLORA, S. et IZZOTTI, A. (2013). Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 751-752.1, 42–48. DOI : 10.1016/j.mrfmmm.2013.08.006.
- BALASUBRAMANIAN, S. K., JITTIWAT, J., MANIKANDAN, J., ONG, C. N., YU, L. E. et ONG, W. Y. (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31.8, 2034–2042. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2009.11.079.
- BARON, L., GOMBAULT, A., FANNY, M., VILLERET, B., SAVIGNY, F., GUILLOU, N., PANEK, C., LE BERT, M., LAGENTE, V., RASSENDREN, F., RITEAU, N. et COUILLIN, I. (2015). The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell death & disease* 6.2, 1629. DOI : 10.1038/cddis.2014.576.
- BATTIN, T. J., BESEMER, K., BENGTSSON, M. M., ROMANI, A. M. et PACKMANN, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 14.4, 251–263. DOI : 10.1038/nrmicro.2016.15.
- BAUDRIMONT, M., ANDREI, J., MORNET, S., GONZALEZ, P., MESMER-DUDONS, N., GOURVES, P., JAFFAL, A., DEDOURGE-GEFFARD, O., GEFFARD, A., GEFFARD, O., GARRIC, J. et FEURTET-MAZEL, A. (2017). Trophic transfer and effects of gold nanoparticles (AuNPs) in *Gammarus fossarum* from contaminated periphytic biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–11. DOI : 10.1007/s11356-017-8400-3.
- BAUDRIMONT, M., METIVAUD, J., MAURY-BRACHET, R., RIBEYRE, F. et BOUDOU, A. (1997). Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic

BIBLIOGRAPHIE

- mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16.10, 2096–2105. DOI : 10.1002/etc.5620161016.
- BELPAIRE, C. et GOEMANS, G. (2007). Eels : Contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES Journal of Marine Science* 64.7, 1423–1436. DOI : 10.1093/icesjms/fsm121.
- BELPAIRE, C., GOEMANS, G., GEERAERTS, C., QUATAERT, P. et PARMENTIER, K. (2008). Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science* 65.8, 1483–1491. DOI : 10.1093/icesjms/fsn112.
- BENJAMINI, Y. et HOCHBERG, Y. (1995). Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* 57.1, 289–300. DOI : 10.2307/2346101.
- BERGIN, I. et WITZMANN, F. A. (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route : evidence and knowledge gaps. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* 3. DOI : 10.1504/IJBNN.2013.054515.Nanoparticle.
- BERNSTEIN, J. et STREICHER, E. (1965). The Blood-Brain Barrier of Fish. *Experimental Neurology* 11, 464–473.
- BERTIN, L. (1951). *Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses*. Paris Payo, p. 1–188.
- BETTINI, S., BOUTET-ROBINET, E., CARTIER, C., COMÉRA, C., GAULTIER, E., DUPUY, J., NAUD, N., TACHÉ, S., GRYSAN, P., REGUER, S., THIERIET, N., RÉFRÉGIERS, M., THIAUDIÈRE, D., CRAVEDI, J.-P., CARRIÈRE, M., AUDINOT, J.-N., PIERRE, F. H., GUZYLACK-PIRIOU, L. et HOUDEAU, E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific Reports* 7. January, 40373. DOI : 10.1038/srep40373.
- BLASER, S. A., SCHERINGER, M., MACLEOD, M. et HUNGERBÜHLER, K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver : Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* 390.2-3, 396–409. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2007.10.010.
- BLOSI, M., ALBONETTI, S., GATTI, F., BALDI, G. et DONDI, M. (2012). Au-Ag nanoparticles as red pigment in ceramic inks for digital decoration. *Dyes and Pigments* 94.2, 355–362. DOI : 10.1016/j.dyepig.2012.01.006.
- BOER, J. de, VALK, F. van der, KERKHOFF, M. et HAGEL, P. (1994). 8-year study on the elimination of PCBs and other organochlorine compound from eel under nature conditions. *Environmental Science & Technology* 28.13, 2242–2248.
- BOGDAN, J., JOANNA, P. et ZARZY, J. (2017). Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment : a Review. *Nanoscale Research Letters* 12.225, 1–15. DOI : 10.1186/s11671-017-2007-y.

BIBLIOGRAPHIE

- BOGDANOV, A. A., GUPTA, S., KOSHKINA, N., CORR, S. J., ZHANG, S., CURLEY, S. A. et HAN, G. (2015). Gold nanoparticles stabilized with MPEG-Grafted Poly(l-lysine) : in vitro and in vivo evaluation of a potential theranostic agent. *Bioconjugate Chemistry* 26.1, 39–50. DOI : 10.1021/bc5005087.
- BOISSELIER, E. et ASTRUC, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine : preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews* 38.6, 1759. DOI : 10.1039/b806051g.
- BONHOMMEAU, S., LE PAPE, O., GASCUEL, D., BLANKE, B., TRÉGUIER, A. M., GRIMA, N., VERMARD, Y., CASTONGUAY, M. et RIVOT, E. (2009). Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model. *Journal of Fish Biology* 74.9, 1891–1914. DOI : 10.1111/j.1095-8649.2009.02298.x.
- BONHOMMEAU, S., CASTONGUAY, M., RIVOT, E., SABATI, R., BONHOMMEAU, S., CASTONGUAY, M., RIVOT, E., SABATI, R. et PAPE, O. L. (2010). The duration of migration of Atlantic *Anguilla* larvae. *Fish and Fisheries* 11.3, 289–306.
- BOULDIN, J. L., INGLE, T. M., SENGUPTA, A., ALEXANDER, R., HANNIGAN, R. E. et BUCHANAN, R. a. (2008). Aqueous toxicity and food chain transfer of Quantum DOTs in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27.9, 1958–63. DOI : 10.1897/07-637.1.
- BOUR, A., MOUCHET, F., SILVESTRE, J., GAUTHIER, L. et PINELLI, E. (2015a). Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity : A review. *Journal of Hazardous Materials* 283, 764–777. DOI : 10.1016/j.jhazmat.2014.10.021.
- BOUR, A., MOUCHET, F., VERNEUIL, L., EVARISTE, L., SILVESTRE, J., PINELLI, E. et GAUTHIER, L. (2015b). Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels - Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 120, 230–236. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2014.07.012.
- BOUWMEESTER, H., ZANDE, M. van der et JEPSON, M. A. (2017). Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1. DOI : 10.1002/wnan.1481.
- BOWMAN, D. M. et HODGE, G. A. (2006). Nanotechnology : Mapping the wild regulatory frontier. *Futures* 38.9, 1060–1073. DOI : 10.1016/j.futures.2006.02.017.
- BOYES, W. K., CHEN, R., CHEN, C. et YOKEL, R. A. (2012). The neurotoxic potential of engineered nanomaterials. *NeuroToxicology* 33.4, 902–910. DOI : 10.1016/j.neuro.2011.12.013.
- BRAYE, D., NEGRE, L., SIDO, B. et DUBOIS, D. (2009). *Rapport n° 552 (2008-2009), au nom de la commission de l'économie, du développement durable et de l'aménagement du territoire*. Rapp. tech.

BIBLIOGRAPHIE

- BRISSE, A. et MORNET, S. (2013). Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins, application to the high-density labeling of cell membranes. 1.19.
- BROWN, D. M., DONALDSON, K., BORM, P. J., SCHINS, R. P., DEHNHARDT, M., GILMOUR, P., JIMENEZ, L. A. et STONE, V. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 286.2, 344–353. DOI : 10.1152/ajplung.00139.2003.
- BROWN, D. M., KINLOCH, I. A., BANGERT, U., WINDLE, A. H., WALTER, D. M., WALKER, G. S., SCOTCHFORD, C. A., DONALDSON, K. et STONE, V. (2007). An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 45.9, 1743–1756. DOI : 10.1016/j.carbon.2007.05.011.
- BUFFET, P.-E., RICHARD, M., CAUPOS, F., VERGNOUX, A., PERREIN-ETTAJANI, H., LUNA-ACOSTA, A., AKCHA, F., AMIARD, J. C., AMIARD-TRIQUET, C., GUIBBOLINI, M., RISSO-DE FAVERNEY, C., THOMAS-GUYON, H., REIP, P., DYBOWSKA, A., BERHANU, D., VALSAMI-JONES, E. et MOUNEYRAC, C. (2012). A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environmental Science and Technology* 47, 1620–1628. DOI : 10.1021/es303513r.
- BUFFET, P.-E., ZALOUK-VERGNOUX, A., CHATEL, A., BERTHET, B., MÉTAIS, I., PERREIN-ETTAJANI, H., POIRIER, L., LUNA-ACOSTA, A., THOMAS-GUYON, H., FAVERNEY, C. R.-d., GUIBBOLINI, M., GILLILAND, D., VALSAMI-JONES, E. et MOUNEYRAC, C. (2014). A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species : The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment* 470-471, 1151–1159. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2013.10.114.
- CABALLERO-GUZMAN, A. et NOWACK, B. (2016). A critical review of engineered nanomaterial release data : Are current data useful for material flow modeling? *Environmental Pollution* 213, 502–517. DOI : 10.1016/j.envpol.2016.02.028.
- CADÉE, G. et HEGEMAN, J. (1974). Primary production of phytoplankton in the Dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* 8.2-3, 240–259. DOI : 10.1016/0077-7579(74)90019-2.
- CAMPAGNOLO, L., MASSIMIANI, M., MAGRINI, A., CAMAIONI, A. et PIETROIUSTI, A. (2012). Physico-Chemical Properties Mediating Reproductive and Developmental Toxicity of Engineered Nanomaterials. *Current Medicinal Chemistry* 19, 4488–4494. DOI : 10.2174/092986712803251566.

BIBLIOGRAPHIE

- CARDINALE, B. J., BIER, R. et KWAN, C. (2012). Effects of TiO₂ nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae. *Journal of Nanoparticle Research* 14.8, 913. DOI : 10.1007/s11051-012-0913-6.
- CARDOSO, E., REZIN, G. T., ZANONI, E. T., DE SOUZA NOTOYA, F., LEFFA, D. D., DAMIANI, A. P., DAUMANN, F., RODRIGUEZ, J. C. O., BENAVIDES, R., SILVA, L. da, ANDRADE, V. M. et DA SILVA PAULA, M. M. (2014). Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 766-767, 25–30. DOI : 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.009.
- CARNOVALE, C., BRYANT, G., SHUKLA, R. et BANSAL, V. (2016). Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity. *Progress in Materials Science* 83, 152–190. DOI : 10.1016/j.pmatsci.2016.04.003.
- CEDERVALL, T., HANSSON, L. A., LARD, M., FROHM, B. et LINSE, S. (2012). Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS ONE* 7.2, 1–6. DOI : 10.1371/journal.pone.0032254.
- CHAE, Y., KIM, S. W. et AN, Y.-j. (2016). Chemosphere In vivo visual evaluation of nanoparticle transfer in a three-species terrestrial food chain. *Chemosphere* 151, 101–107. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2016.02.075.
- CHAN, W. C. W., MAXWELL, D. J., GAO, X., BAILEY, R. E., HAN, M. et NIE, S. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 46, 9–11.
- CHANDRAN, P., RIVIERE, J. E. et MONTEIRO-RIVIERE, N. A. (2017). Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells. *Nanotoxicology* 11.4, 507–519. DOI : 10.1080/17435390.2017.1314036.
- CHAUDHURI, R. G. et PARIJA, S. (2012). Core/Shell Nanoparticles : Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chemical Reviews* 112, 2373–2433. DOI : 10.1021/cr100449n.
- CHEN, Y.-S., HUNG, Y.-C., LIN, L.-W., LIAU, I., HONG, M.-Y. et HUANG, G. S. (2010). Size-dependent impairment of cognition in mice caused by the injection of gold nanoparticles. *Nanotechnology* 21.48, 485102. DOI : 10.1088/0957-4484/21/48/485102.
- CHEN, Y. et LIU, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64.7, 640–665. DOI : 10.1016/j.addr.2011.11.010.
- CHICHOVA, M., SHKODROVA, M., VASILEVA, P., KIRILOVA, K. et DONCHEVA-STOIMENOVA, D. (2014). Influence of silver nanoparticles on the activity of rat liver mitochondrial ATPase. *Journal of Nanoparticle Research* 16.2243. DOI : 10.1007/s11051-014-2243-3.

BIBLIOGRAPHIE

- CHO, W. S., CHO, M., JEONG, J., CHOI, M., HAN, B. S., SHIN, H. S., HONG, J., CHUNG, B. H., JEONG, J. et CHO, M. H. (2010). Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245.1, 116–123. DOI : 10.1016/j.taap.2010.02.013.
- CHO, W. S., KIM, S., HAN, B. S., SON, W. C. et JEONG, J. (2009). Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology Letters* 191.1, 96–102. DOI : 10.1016/j.toxlet.2009.08.010.
- CHO, W.-S., KANG, B.-C., LEE, J. K., JEONG, J., CHE, J.-H. et SEOK, S. H. (2013). Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology* 10.1, 9. DOI : 10.1186/1743-8977-10-9.
- CHOI, J. Y., RAMACHANDRAN, G. et KANDLIKAR, M. (2009). The impact of toxicity testing costs on nanomaterial regulation. *Environmental Science and Technology* 43.9, 3030–3034. DOI : 10.1021/es802388s.
- COBLEY, C. M., CHEN, J., CHO, E. C., WANG, L. V. et XIA, Y. (2011). Gold nanostructures : a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 40.1, 44–56. DOI : 10.1039/B821763G.
- COHIGNAC, V., LANDRY, M., BOCZKOWSKI, J. et LANONE, S. (2014). Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials* 4.3, 548–582. DOI : 10.3390/nano4030548.
- COLMAN, B. P., ARNAOUT, C. L., ANCIAUX, S., GUNSCH, C. K., HOHELLA, M. F., KIM, B., LOWRY, G. V., MCGILL, B. M., REINSCH, B. C., RICHARDSON, C. J., UNRINE, J. M., WRIGHT, J. P., YIN, L. et BERNHARDT, E. S. (2013). Low Concentrations of Silver Nanoparticles in Biosolids Cause Adverse Ecosystem Responses under Realistic Field Scenario. *PLoS ONE* 8.2. DOI : 10.1371/journal.pone.0057189.
- COMMISSION, E. (2011a). Commission recommendation on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union*.
- COMMISSION, E. (2011b). *Successful European Nanotechnology Research*. Directorate-General for Research et Innovation.
- CONNER, S. D. et SCHMID, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422.March, 37–43. DOI : 10.1038/nature01451.
- CONWAY, J. R., HANNA, S. K., LENIHAN, H. S. et KELLER, A. A. (2014). Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environmental Science & Technology* 48, 1517–1524. DOI : 10.1021/es404549u.
- CORTI, C. W., HOLLIDAY, R. J. et THOMPSON, D. T. (2007). Progress towards the commercial application of gold catalysts. *Topics in Catalysis* 44.1-2, 331–343. DOI : 10.1007/s11244-007-0307-7.

BIBLIOGRAPHIE

- CROTEAU, M.-N., DYBOWSKA, A. D., LUOMA, S. N. et VALSAMI-JONES, E. (2011). A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5.1, 79–90. DOI : 10.3109/17435390.2010.501914.
- CUPAIOLI, F. A., ZUCCA, F. A., BORASCHI, D. et ZECCA, L. (2014). Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Progress in Neurobiology* 119-120, 20–38. DOI : 10.1016/j.pneurobio.2014.05.002.
- CZAJKA, M., SAWICKI, K., SIKORSKA, K., POPEK, S., KRUSZEWSKI, M. et KAPKA-SKRZYPCZAK, L. (2015). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in Vitro* 29.5, 1042–1052. DOI : 10.1016/j.tiv.2015.04.004.
- DANIEL, M. C. M. et ASTRUC, D. (2004). Gold Nanoparticles : Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chemical Reviews* 104, 293–346. DOI : 10.1021/cr030698.
- DE JONG, W. H., BURGER, M. C., VERHEIJEN, M. A. et GEERTSMA, R. E. (2010). Detection of the presence of gold nanoparticles in organs by transmission electron microscopy. *Materials* 3.9, 4681–4694. DOI : 10.3390/ma3094681.
- DE JONG, W. H., HAGENS, W. I., KRYSZEK, P., BURGER, M. C., SIPS, A. J. A. M. et GEERTSMA, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29.12, 1912–1919. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2007.12.037.
- DE OLIVEIRA, G. M. T., KIST, L. W., PEREIRA, T. C. B., BORTOLOTO, J. W., PAQUETE, F. L., DE OLIVEIRA, E. M. N., LEITE, C. E., BONAN, C. D., DE SOUZA BASSO, N. R., PAPALEO, R. M. et BOGO, M. R. (2014). Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C* 162.1, 77–84. DOI : 10.1016/j.cbpc.2014.03.010.
- DEDEH, A., CIUTAT, A., LECROART, P., TREGUER-DELAPIERRE, M. et BOURDINEAUD, J. P. (2016). Cadmium sulfide nanoparticles trigger DNA alterations and modify the bioturbation activity of tubificidae worms exposed through the sediment. *Nanotoxicology* 10.3, 322–331. DOI : 10.3109/17435390.2015.1071444.
- DEDEH, A., CIUTAT, A., TREGUER-DELAPIERRE, M. et BOURDINEAUD, J.-P. (2014). Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment. *Nanotoxicology* 5390, 1–10. DOI : 10.3109/17435390.2014.889238.
- DEL MONTE, U. (2005). Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. *Medical Hypotheses* 64.4, 818–825. DOI : 10.1016/j.mehy.2004.08.028.
- DI GUGLIELMO, C., DE LAPUENTE, J., PORREDON, C., RAMOS-LÓPEZ, D., SENDRA, J. et BORRÀS, M. (2012). In Vitro Safety Toxicology Data for Evaluation of Gold

BIBLIOGRAPHIE

- Nanoparticles–Chronic Cytotoxicity, Genotoxicity and Uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 12.8, 6185–6191. DOI : 10.1166/jnn.2012.6430.
- DOBOR, J., VARGA, M. et ZÁRAY, G. (2012). Biofilm controlled sorption of selected acidic drugs on river sediments characterized by different organic carbon content. *Chemosphere* 87.2, 105–110. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2011.11.067.
- DOBROVOLSKAIA, M. A. et McNEIL, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology* 2, 469–478.
- DONALDSON, K., AITKEN, R., TRAN, L., STONE, V., DUFFIN, R., FORREST, G. et ALEXANDER, A. (2006). Carbon nanotubes : A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences* 92.1, 5–22. DOI : 10.1093/toxsci/kfj130.
- DONALDSON, K., MURPHY, F. a., DUFFIN, R. et POLAND, C. a. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium : a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and fibre toxicology* 7, 5. DOI : 10.1186/1743-8977-7-5.
- DOSTERT, C., PÉTRILLI, V., BRUGGEN, R. V., STEELE, C., MOSSMAN, B. T. et Tschopp, J. (2008). Asbestos and Silica. *Science* 674.May, 674–677. DOI : 10.1126/science.1156995.
- DREADEN, E. C., ALKILANY, A. M., HUANG, X., MURPHY, C. J. et EL-SAYED, M. A. (2012). The golden age : gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 41.7, 2740–2779. DOI : 10.1039/C1CS15237H.
- DREXLER, E. (1986). *Engines of Creation - The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor.
- DURIF, C. (2003). La migration d’avalaison de l’anguille européenne (*Anguilla anguilla*) : Caractérisation des fractions dévalantes, phénomène de migration et franchissement d’obstacle. Thèse de doct., 350.
- ELDER, A., GELEIN, R., SILVA, V., FEIKERT, T., OPANASHUK, L., CARTER, J., POTTER, R., MAYNARD, A., ITO, Y., FINKELSTEIN, J. et OBERDÖRSTER, G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environmental Health Perspectives* 114.8, 1172–1178. DOI : 10.1289/ehp.9030.
- ELEFThERiADOU, M., PYRGIOTAKIS, G. et DEMOKRITOU, P. (2017). ScienceDirect Nanotechnology to the rescue : using nano-enabled approaches in microbiological food safety and quality. *Current Opinion in Biotechnology* 44, 87–93. DOI : 10.1016/j.copbio.2016.11.012.
- ELLENBOGEN, T., SEO, K. et CROZIER, K. B. (2012). Chromatic Plasmonic Polarizers for Active Visible Color Filtering and Polarimetry. *Nano Letters* 12, 1026–1031. DOI : 10.1021/nl204257g.

BIBLIOGRAPHIE

- EMA, M., KOBAYASHI, N., NAYA, M., HANAI, S. et NAKANISHI, J. (2010). Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology* 30.3, 343–352. DOI : 10.1016/j.reprotox.2010.06.002.
- US-EPA (2008). TSCA Inventory Status of Nanoscale Substances – General Approach. 5.C, 1–7.
- EUROPEAN-COMMISSION (2008). Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH). CA/59/2008.
- FALAGAN-LOTSCH, P., GRZINCIC, E. M. et MURPHY, C. J. (2016). One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.47, 13318–13323. DOI : 10.1073/pnas.1616400113.
- FARADAY, M. (1857). The Bakerian Lecture : Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 147, 145–181. DOI : 10.1098/rstl.1857.0011.
- FARKAS, J., CHRISTIAN, P., URREA, J. A. G., ROOS, N., HASSELLÖV, M., TOLLEFSEN, K. E. et THOMAS, K. V. (2010). Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 96.1, 44–52. DOI : 10.1016/j.aquatox.2009.09.016.
- FAULK, W. et TAYLOR, G. (1971). Communication to the editors. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8.11, 1081–1083. DOI : 10.1016/0019-2791(71)90496-4.
- FERNANDES, C., SONI, U. et PATRAVALE, V. (2010). Nano-interventions for neurodegenerative disorders. *Pharmacological Research* 62.2, 166–178. DOI : 10.1016/j.phrs.2010.02.004.
- FERRY, J. L., CRAIG, P., HEXEL, C., SISCO, P., FREY, R., PENNINGTON, P. L., FULTON, M. H., SCOTT, I. G., DECHO, A. W., KASHIWADA, S., MURPHY, C. J. et SHAW, T. J. (2009). Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature nanotechnology* 4.7, 441–444. DOI : 10.1038/nnano.2009.157.
- FESWICK, A., GRIFFITT, R. J., SIEBEIN, K. et BARBER, D. S. (2013). Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquatic Toxicology* 130, 210–218. DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.002>.
- FEUNTEUN, E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*) : An impossible bargain. *Ecological Engineering* 18.5, 575–591. DOI : 10.1016/S0925-8574(02)00021-6.
- FEYNMAN, R. P. (1959). There's Plenty of Room at the Bottom. In : *Engineering and Science*.

BIBLIOGRAPHIE

- FLEMMING, H. (2016). The perfect slime – and the “dark matter” of biofilms. In : *The Perfect Slime : microbial extracellular polymeric substances (EPS)*. Chap. 1.
- FLEMMING, H. et WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* 8.9, 623–33. DOI : 10.1038/nrmicro2415.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S. A. et KJELLEBERG, S. (2016). Biofilms : an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14.9, 563–575. DOI : 10.1038/nrmicro.2016.94.
- FLETCHER, C. M. (1948). Pneumoconiosis of coal-miners. *British Medical Journal*, 1065–1074.
- FOUQUERAY, M., DUFILS, B., VOLLAT, B., CHAURAND, P., BOTTA, C., ABACCI, K., LABILLE, J., ROSE, J. et GARRIC, J. (2012). Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route. *Environmental Pollution* 163. April 2012, 55–61. DOI : 10.1016/j.envpol.2011.11.035.
- FRAGA, S., BRANDAO, A., SOARES, M. E., MORAIS, T., DUARTE, J. A., PEREIRA, L., SOARES, L., NEVES, C., PEREIRA, E., BASTOS, M. d. L. et CARMO, H. (2014). Short- and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous administration. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10.8, 1757–1766. DOI : 10.1016/j.nano.2014.06.005.
- FREESE, C., UBOLDI, C., GIBSON, M. I., UNGER, R. E., WEKSLER, B. B., ROMERO, I. a., COURAUD, P.-O. et KIRKPATRICK, C. J. (2012). Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres : comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* 9.1, 1. DOI : 10.1186/1743-8977-9-23.
- FREESTONE, I., MEEKS, N., SAX, M. et HIGGITT, C. (2007). The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin* 40, 270–277.
- FRENK, S., BEN-MOSHE, T., DROR, I., BERKOWITZ, B. et MINZ, D. (2013). Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types. *PLoS ONE* 8.12, 1–12. DOI : 10.1371/journal.pone.0084441.
- FRÖHLICH, E. E. et FRÖHLICH, E. (2016). Cytotoxicity of nanoparticles contained in food on intestinal cells and the gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 17.4. DOI : 10.3390/ijms17040509.
- FU, C., LIU, T., LI, L., LIU, H., CHEN, D. et TANG, F. (2013). The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials* 34, 2565–2575. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2012.12.043.
- GAO, G., ZE, Y., LI, B., ZHAO, X., ZHANG, T., SHENG, L., HU, R., GUI, S., SANG, X., SUN, Q., CHENG, J., CHENG, Z., WANG, L., TANG, M. et HONG, F. (2012). Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by

BIBLIOGRAPHIE

- long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* 243, 19–27. DOI : 10.1016/j.jhazmat.2012.08.049.
- GAO, N., SUN, H., DONG, K., REN, J. et QU, X. (2015). Gold-nanoparticle-based multifunctional amyloid- β inhibitor against Alzheimer's disease. *Chemistry - A European Journal* 21.2, 829–835. DOI : 10.1002/chem.201404562.
- GARCÍA-CAMBERO, J. P., NÚÑEZ GARCÍA, M., LÓPEZ, G. D., HERRANZ, A. L., CUEVAS, L., PÉREZ-PASTRANA, E., CUADAL, J. S., CASTELLTORT, M. R. et CALVO, A. C. (2013). Converging hazard assessment of gold nanoparticles to aquatic organisms. *Chemosphere* 93.6, 1194–1200. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2013.06.074.
- GARCÍA-NEGRETE, C. A., BLASCO, J., VOLLAND, M., ROJAS, T. C., HAMPEL, M., LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A., JIMÉNEZ DE HARO, M. C., SOTO, M. et FERNÁNDEZ, A. (2013). Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. *Environmental Pollution* 174, 134–141. DOI : 10.1016/j.envpol.2012.11.014.
- GAUTIER, C., CUNNINGHAM, A., SI-AHMED, L., ROBERT, G. et BÜRGI, T. (2010). Pigments based on silica-coated gold nanorods : Synthesis, colouring strength, functionalisation, extrusion, thermal stability and colour evolution. *Gold Bulletin* 43.2, 94–104. DOI : 10.1007/BF03214974.
- GE, Y. et PRIESTER, J. (2013). Potential Mechanisms and Environmental Controls of TiO₂ Nanoparticle Effects on Soil Bacterial Communities. *Environmental ...* 47.24, 14411–7. DOI : 10.1021/es403385c.
- GE, Y., SCHIMEL, J. P. et HOLDEN, P. A. (2011). Evidence for Negative Effects of TiO₂ and ZnO Nanoparticles on Soil Bacterial Communities. *Environmental Pollution* 45, 1659–1664. DOI : 10.1021/es103040t.
- GE, Y., SCHIMEL, J. P. et HOLDEN, P. A. (2012). Identification of Soil Bacteria Susceptible to TiO₂ and ZnO. *Applied and Environmental Microbiology* 78.18, 6749–6758. DOI : 10.1128/AEM.00941-12.
- GEERAERTS, C. et BELPAIRE, C. (2010). The effects of contaminants in European eel : A review. *Ecotoxicology* 19.2, 239–266. DOI : 10.1007/s10646-009-0424-0.
- GEFFROY, B., LADHAR, C., CAMBIER, S., TREGUER-DELAPIERRE, M., BRÈTHES, D. et BOURDINEAUD, J.-P. (2012). Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure : The role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6.2, 144–160. DOI : 10.3109/17435390.2011.562328.
- GEITNER, N. K., MARINAKOS, S. M., GUO, C., O'BRIEN, N. et WIESNER, M. R. (2016). Nanoparticle surface affinity as a predictor of trophic transfer. *Environmental Science & Technology* 50.13, 6663–6669. DOI : 10.1021/acs.est.6b00056.
- GERLOFF, K., ALBRECHT, C., BOOTS, A. W., FÖRSTER, I. et SCHINS, R. P. F. (2009). Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intes-

BIBLIOGRAPHIE

- tinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3.December, 355–64. DOI : 10 . 3109 / 17435390903276933.
- GHOSH, P., HAN, G., DE, M., KIM, C. K. et ROTELLO, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60.11, 1307–1315. DOI : 10. 1016/ j. addr .2008. 03. 016.
- GIERSIG, M. et MULVANEY, P. (1993). Preparation of Ordered Colloid Monolayers by Electrophoretic Deposition. *Langmuir* 9.12, 3408–3413. DOI : 10 . 1021 / 1a00036a014.
- GILROY, K. D., NERETINA, S. et SANDERS, R. W. (2014). Behavior of gold nanoparticles in an experimental algal-zooplankton food chain. *Journal of Nanoparticle Research* 16.5. DOI : 10. 1007/ s11051- 014- 2414- 2.
- GINNEKEN, V. J. van et MAES, G. E. (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction : A literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15.4, 367–398. DOI : 10. 1007/ s11160- 006- 0005- 8.
- GLENN, J. B., WITE, S. A. et KLAINÉ, S. J. (2012). Interactions of gold nanoparticles with freshwater aquatic macrophytes are size and species dependent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31.1, 194–201. DOI : 10. 1002/ etc. 728.
- GLIGA, A. R., SKOGLUND, S., WALLINDER, I. O., FADEEL, B. et KARLSSON, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells : the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and fibre toxicology* 11, 11. DOI : 10. 1186/ 1743- 8977- 11- 11.
- GOMES, T., PEREIRA, C. G., CARDOSO, C., PINHEIRO, J. P., CANCIO, I. et BEBIANNO, M. J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 118-119, 72–79. DOI : 10. 1016/ j. aquatox .2012. 03. 017.
- GONDIKAS, A. P., KAMMER, F. V. D., REED, R. B., WAGNER, S., RANVILLE, J. F. et HOFMANN, T. (2014). Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters : a one-year survey at the old Danube recreational lake. *Environmental Science & Technology* 48, 5415–5422. DOI : dx .doi .org/ 10. 1021/ es405596y.
- GONZALEZ, E., ARBIOL, J. et PUNTES, V. F. (2011). Carving at the Nanoscale : Sequential Galvanic Exchange and Kirkendall Growth at Room Temperature. *Science* 334.6061, 1377–1380. DOI : 10. 1126/ science . 1212822.
- GOODMAN, C. M., MCCUSKER, C. D., YILMAZ, T. et ROTELLO, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry* 15.4, 897–900. DOI : 10. 1021/ bc049951i.
- GOTTSCHALK, F., NOWACK, B. et GAWLIK, B. (2010). Report on Exposure Scenarios and Release of Nanomaterials to the Environment. *Nanex Project*.
- GOYA, G. F., MARCOS-CAMPOS, I., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., SÁEZ, B., GODINO, J., ASÍN, L., LAMBEA, J., TABUENCA, P., MAYORDOMO, J. I., LARRAD, L., IBARRA, M. R.

BIBLIOGRAPHIE

- et TRES, A. (2008). Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biology International* 32.8, 1001–1005. DOI : 10.1016/j.cellbi.2008.04.001.
- GRABHERR, M. G., HAAS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELLI, E., HACOHEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., PALMA, F. di, BIRREN, B. W., NUSBAUM, C., LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N. et REGEV, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29.7, 644–652. DOI : 10.1038/nbt.1883.
- GRIFFITT, R. J., LAVELLE, C. M., KANE, A. S., DENSLOW, N. D. et BARBER, D. S. (2013). Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 130-131, 192–200. DOI : 10.1016/j.aquatox.2013.01.010.
- GU, Y. J., CHENG, J., LIN, C. C., LAM, Y. W., CHENG, S. H. et WONG, W. T. (2009). Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 237.2, 196–204. DOI : 10.1016/j.taap.2009.03.009.
- GUNAWARDENA, J., EGODAWATTA, P., AYOKO, G. A. et GOONETILLEKE, A. (2013). Atmospheric deposition as a source of heavy metals in urban stormwater. *Atmospheric Environment* 68, 235–242. DOI : 10.1016/j.atmosenv.2012.11.062.
- GUO, Z., MARTUCCI, N. J., MORENO-OLIVAS, F., TAKO, E. et MAHLER, G. J. (2017). Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine. *NanoImpact* 5, 70–82. DOI : 10.1016/j.impact.2017.01.002.
- HADRUP, N., SHARMA, A. K., POULSEN, M. et NIELSEN, E. (2015). Toxicological risk assessment of elemental gold following oral exposure to sheets and nanoparticles - A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 72.2, 216–221. DOI : 10.1016/j.yrtph.2015.04.017.
- HAN, D., TIAN, Y., ZHANG, T., REN, G. et YANG, Z. (2011). Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats. *International journal of nanomedicine* 6, 1453–1461. DOI : 10.2147/IJN.S18507.
- HANDY, R. D., OWEN, R. et VALSAMI-JONES, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials : Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17.5, 315–325. DOI : 10.1007/s10646-008-0206-0.
- HANDY, R. D., VAN DEN BRINK, N., CHAPPELL, M., MÜHLING, M., BEHRA, R., DUŠINSKÁ, M., SIMPSON, P., AHTIAINEN, J., JHA, A. N., SEITER, J., BEDNAR, A., KENNEDY, A., FERNANDES, T. F. et RIEDIKER, M. (2012). Practical considerations for conduc-

BIBLIOGRAPHIE

- ting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials : What have we learnt so far? *Ecotoxicology* 21.4, 933–972. DOI : 10.1007/s10646-012-0862-y.
- HANUS, M. J. et HARRIS, A. T. (2013). Progress in Materials Science Nanotechnology innovations for the construction industry. *Progress in Materials Science* 58.7, 1056–1102. DOI : 10.1016/j.pmatsci.2013.04.001.
- HARPER, S., USENKO, C., HUTCHISON, J. E., MADDUX, B. L. S. et TANGUAY, R. L. (2008). In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *Journal of Experimental Nanoscience* 3.3, 195–206. DOI : 10.1080/17458080802378953.
- HARTMANN, N. B., ENGELBREKT, C., ZHANG, J., ULSTRUP, J., KUSK, K. O. et BAUN, A. (2012). The challenges of testing metal and metal oxide nanoparticles in algal bioassays : titanium dioxide and gold nanoparticles as case studies. *Nanotoxicology* 7.6, 1082–1094. DOI : 10.3109/17435390.2012.710657.
- HEINLAAN, M., KAHRU, A., KASEMETS, K., ARBEILLE, B., PRENSIER, G. et DUBOURGUIER, H. C. (2011). Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles : A transmission electron microscopy study. *Water Research* 45.1, 179–190. DOI : 10.1016/j.watres.2010.08.026.
- HENICS, T. et WHEATLEY, D. N. (1999). Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death : A view on new perspectives and features. *Biology of the Cell* 91.7, 485–498. DOI : 10.1016/S0248-4900(00)88205-2.
- HERRAEZ, M. P. et ZAPATA, A. G. (1986). Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12.1–4, 117–126. DOI : [http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427\(86\)90116-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427(86)90116-9).
- HILLYER, J. F. et ALBRECHT, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90.12, 1927–1936. DOI : 10.1002/jps.1143.
- HITOMI, J., KATAYAMA, T., EGUCHI, Y., KUDO, T., TANIGUCHI, M., KOYAMA, Y., MANABE, T., YAMAGISHI, S., BANDO, Y., IMAIZUMI, K., TSUJIMOTO, Y. et TOHYAMA, M. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *Journal of Cell Biology* 165.3, 347–356. DOI : 10.1083/jcb.200310015.
- HOLBROOK, R. D., MURPHY, K. E., MORROW, J. B. et COLE, K. D. (2008). Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nature nanotechnology* 3.6, 352–355. DOI : 10.1038/nnano.2008.110.
- HOLDEN, P. A., NISBET, R. M., LENIHAN, H. S., MILLER, R. J., CHERR, G. N., SCHIMMEL, J. P. et GARDEA-TORRESDEY, J. L. (2012). Ecological Nanotoxicology : Integrating Nanomaterial Hazard Considerations Across. *Accounts of Chemical Research* 46, 813–822. DOI : 10.1021/ar300069t.

BIBLIOGRAPHIE

- HONG, J., HONG, F., ZE, Y. et ZHANG, Y. Q. (2016). The nano-TiO₂ exposure can induce hepatic inflammation involving in a JAK-STAT signalling pathway. *Journal of Nanoparticle Research* 18.6, 1–9. DOI : 10.1007/s11051-016-3472-4.
- HORST, A. M., NEAL, A. C., MIELKE, R. E., SISLIAN, P. R., SUH, W. H., STUCKY, G. D. et HOLDEN, P. A. (2010). Dispersion of TiO₂ Nanoparticle Agglomerates by. *Applied and Environmental Microbiology* 76.21, 7292–7298. DOI : 10.1128/AEM.00324-10.
- HOU, K., WEN, X., YAN, P., TANG, A. et YANG, H. (2017). Tin Oxide-Carbon-Coated Sepiolite Nanofibers with Enhanced Lithium-Ion Storage Property. *Nanoscale Research Letters* 12.215, 1–10. DOI : 10.1186/s11671-017-1979-y.
- HOUDY, P., LAHMANI, M. et MARANO, F. (2011). *Nanoethics and Nanotoxicology*. Sous la dir. de SPRINGER, p. 1–644. DOI : 10.1007/978-3-642-20177-6.
- HSIAO, J. C. et FONG, K. (2004). Making big money from small technology. *Nature* 428.6979, 218–220.
- HU, H., GUO, Q., WANG, C., MA, X., HE, H., OH, Y., FENG, Y., WU, Q. et GU, N. (2015). Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. *Journal of Applied Toxicology* 35.10, 1122–1132. DOI : 10.1002/jat.3150.
- HUERTA-GARCÍA, E., PÉREZ-ARIZTI, J. A., MÁRQUEZ-RAMÍREZ, S. G., DELGADO-BUENROSTRO, N. L., CHIRINO, Y. I., IGLESIAS, G. G. et LÓPEZ-MARURE, R. (2014). Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free radical biology & medicine* 73C, 84–94. DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026.
- IAVICOLI, I., FONTANA, L., LESO, V. et BERGAMASCHI, A. (2013). The effects of nanomaterials as endocrine disruptors. *International Journal of Molecular Sciences* 14.8, 16732–16801. DOI : 10.3390/ijms140816732.
- JACKSON, B., BUGGE, D., RANVILLE, J. et CHEN, C. (2012). Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Science & Technology* 46.10, 5550–5556. DOI : 10.1021/es202864r.
- JANG, D., OH, J. H., LEE, J.-m., KIM, D., JANG, D., OH, J. H., LEE, J.-m. et KIM, D. (2009). Enhanced efficiency of laser shock cleaning process by geometrical confinement of laser-induced plasma. *Journal of Applied Physics* 106. DOI : 10.1063/1.3160315.
- JARVIS, T. A., MILLER, R. J., LENIHAN, H. S. et BIELMYER, G. K. (2013). Toxicity of ZnO nanoparticles to the copepod *Acartia tonsa*, exposed through a phytoplankton diet. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32.6, 1264–1269. DOI : 10.1002/etc.2180.

BIBLIOGRAPHIE

- JEONG, G. N., JO, U. B., RYU, H. Y., KIM, Y. S., SONG, K. S. et YU, I. J. (2010). Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Archives of Toxicology* 84.1, 63–69. DOI : 10.1007/s00204-009-0469-0.
- JI, Z. Q., SUN, H., WANG, H., XIE, Q., LIU, Y. et WANG, Z. (2006). Biodistribution and tumor uptake of C60(OH)_x in mice. *Journal of Nanoparticle Research* 8.1, 53–63. DOI : 10.1007/s11051-005-9001-5.
- JIANG, Z. Y., HUANG, R. B., XIE, S. Y., XIE, Z. X. et ZHENG, L. S. (2001). Synthesis of Silver Selenide Bicomponent Nanoparticles by a Novel Technique : Laser-Solid-Liquid Ablation. *Journal of Solid State Chemistry* 160, 430–434. DOI : 10.1006/jssc.2001.9270.
- JUDY, J. D., UNRINE, J. M. et BERTSCH, P. M. (2011). Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science & Technology* 45.2, 776–781. DOI : 10.1021/es103031a.
- KAEGI, R., ULRICH, A., SINNET, B., VONBANK, R., WICHSER, A., ZULEEG, S., SIMMLER, H., BRUNNER, S., VONMONT, H., BURKHARDT, M. et BOLLER, M. (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* 156.2, 233–239. DOI : 10.1016/j.envpol.2008.08.004.
- KAEGI, R., SINNET, B., ZULEEG, S., HAGENDORFER, H., MUELLER, E., VONBANK, R., BOLLER, M. et BURKHARDT, M. (2010). Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution* 158.9, 2900–2905. DOI : 10.1016/j.envpol.2010.06.009.
- KAHRU, A. et DUBOURGUIER, H. C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269.2-3, 105–119. DOI : 10.1016/j.tox.2009.08.016.
- KAHRU, A. et IVASK, A. (2013). Mapping the dawn of nanoecotoxicological research. *Accounts of Chemical Research* 46.3, 823–833. DOI : 10.1021/ar3000212.
- KASHIWADA, S. (2006). Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives* 114.11, 1697–1702. DOI : 10.1289/ehp.9209.
- KATZ, E. et WILLNER, I. (2004). Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems : Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie - International Edition* 43.45, 6042–6108. DOI : 10.1002/anie.200400651.
- KAWAMURA, G., NOGAMI, M. et MATSUDA, A. (2013). Shape-controlled metal nanoparticles and their assemblies with optical functionalities. *Journal of Nanomaterials*, 1–17. DOI : 10.1155/2013/631350.
- KHAN, F. R., KENNAWAY, G. M., CROTEAU, M. N., DYBOWSKA, A., SMITH, B. D., NOGUEIRA, A. J., RAINBOW, P. S., LUOMA, S. N. et VALSAMI-JONES, E. (2014). In vivo retention of ingested Au NPs by daphnia magna : No evidence for trans-

BIBLIOGRAPHIE

- epithelial alimentary uptake. *Chemosphere* 100, 97–104. doi : 10.1016/j.chemosphere.2013.12.051.
- KHAN, F. R., MISRA, S. K., GARC, J., SMITH, B. D., STREKOPYTOV, S., RAINBOW, P. S., LUOMA, S. N. et VALSAMI-JONES, E. (2012). Bioaccumulation Dynamics and Modeling in an Estuarine Invertebrate Following Aqueous Exposure to Nanosized and Dissolved Silver. *Environmental Science & Technology* 46, 7621–7628. doi : 10.1021/es301253s.
- KIMLING, J., MAIER, M., OKENVE, B., KOTAIDIS, V., BALLOT, H. et PLECH, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B* 110.95 mL, 15700–15707. doi : 10.1021/jp061667w.
- KING, R. B., MCMAHON, S. J., HYLAND, W. B., JAIN, S., BUTTERWORTH, K. T., PRISE, K. M., HOUNSELL, A. R. et MCGARRY, C. K. (2017). An overview of current practice in external beam radiation oncology with consideration to potential benefits and challenges for nanotechnology. *Cancer Nanotechnology* 8.3, 1–12. doi : 10.1186/s12645-017-0027-z.
- KLAINE, S. J., KOELMANS, A. A., HORNE, N., CARLEY, S., HANDY, R. D., KAPUSTKA, L., NOWACK, B. et KAMMER, F. von der (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31.1, 3–14. doi : 10.1002/etc.733.
- KOLOSNAJ-TABI, J., JUST, J., HARTMAN, K. B., LAOUDI, Y., BOUDJEMAA, S., ALLOYEAU, D., SZWARC, H., WILSON, L. J. et MOUSSA, F. (2015). Anthropogenic carbon nanotubes found in the airways of parisian children. *EBioMedicine* 2.11, 1697–1704. doi : 10.1016/j.ebiom.2015.10.012.
- KOMATSU, T., TABATA, M., KUBO-IRIE, M., SHIMIZU, T., SUZUKI, K. ichiro, NIHEI, Y. et TAKEDA, K. (2008). The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicology in Vitro* 22.8, 1825–1831. doi : 10.1016/j.tiv.2008.08.009.
- KREUTER, J. (1994). Drug targeting with nanoparticles. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 19.3, 253–256. doi : 10.1007/BF03188928.
- KREYLING, W. G., HIRN, S., MÖLLER, W., SCHLEH, C., WENK, A., CELIK, G., LIPKA, J., SCHÄFFLER, M., HABERL, N., JOHNSTON, B. D., SPERLING, R., SCHMID, G., SIMON, U., PARAK, W. J. et SEMMLER-BEHNKE, M. (2014). Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano* 8.1, 222–233. doi : 10.1021/nn403256v.
- KRISHNA PRIYA, K., RAMESH, M., SARAVANAN, M. et PONPANDIAN, N. (2015). Ecological risk assessment of silicon dioxide nanoparticles in a freshwater fish *Labeo rohita* : Hematology, ionoregulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120, 295–302. doi : 10.1016/j.ecoenv.2015.05.032.
- KROEMER, G. et JÄÄTTELÄ, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews. Cancer* 5.11, 886–897. doi : 10.1038/nrc1738.

BIBLIOGRAPHIE

- KUFER, T. et SANSONETTI, P. J. (2011). NLR functions beyond pathogen recognition. *Nature Immunology* 12.2, 121–128. DOI : 10.1038/ni.1985.
- KUMAR, S., GANDHI, K. S. et KUMAR, R. (2007). Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 46.10, 3128–3136. DOI : 10.1021/ie060672j.
- LADHAR, C., GEFFROY, B., CAMBIER, S., TREGUER-DELAPIERRE, M., DURAND, E., BRÈTHES, D. et BOURDINEAUD, J.-P. (2013). Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on Danio rerio zebrafish at very low contamination pressure. *Nanotoxicology* 8.6, 676–685. DOI : 10.3109/17435390.2013.822116.
- LAI, D. Y. (2012). Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century : A paradigm for moving forward. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology* 4.1, 1–15. DOI : 10.1002/wnan.162.
- LARGUINHO, M., CORREIA, D., DINIZ, M. S. et BAPTISTA, P. V. (2014). Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels. *Journal of Nanoparticle Research* 16.8, 1–11. DOI : 10.1007/s11051-014-2549-1.
- LARSON, J. K., CARVAN III, M. J., TEEGUARDEN, J. G., WATANABE, G., TAYA, K., KRYS-TOFIK, E. et HUTZ, R. J. (2014). Low-Dose gold nanoparticles exert subtle endocrine-modulating effects on the ovarian steroidogenic pathway ex vivo independent of oxidative stress. *Nanotoxicology* 8.8, 856–866. DOI : 10.3109/17435390.2013.837208.
- LEE, W.-M., YOON, S.-J., SHIN, Y.-J. et AN, Y.-J. (2015). Trophic transfer of gold nanoparticles from Euglena gracilis or Chlamydomonas reinhardtii to Daphnia magna. *Environmental Pollution* 201, 10–16. DOI : 10.1016/j.envpol.2015.02.021.
- LEITE, P. E. C., PEREIRA, M. R., SANTOS, C. A. d. N., CAMPOS, A. P. C., ESTEVES, T. M. et GRANJEIRO, J. M. (2015). Gold nanoparticles do not induce myotube cytotoxicity but increase the susceptibility to cell death. *Toxicology in Vitro* 29.5, 819–827. DOI : 10.1016/j.tiv.2015.02.010.
- LENGLET, R. (2014). *Nanotoxiques, une enquête*. Actes Sud.
- LI, C. H., SHYU, M. K., JHAN, C., CHENG, Y. W., TSAI, C. H., LIU, C. W., LEE, C. C., CHEN, R. M. et KANG, J. J. (2015). Gold nanoparticles increase endothelial paracellular permeability by altering components of endothelial tight junctions, and increase blood-brain barrier permeability in mice. *Toxicological Sciences* 148.1, 192–203. DOI : 10.1093/toxsci/kfv176.
- LI, C., LI, X., JIGAMI, J., HASEGAWA, C., SUZUKI, A. K., ZHANG, Y., FUJITANI, Y., NAGAOKA, K., WATANABE, G. et TAYA, K. (2016a). Inhalation Toxicology Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testosterone biosynthesis in adult male mice. *Inhalation Toxicology* 24.9, 599–608. DOI : 10.3109/08958378.2012.702140.

BIBLIOGRAPHIE

- LI, C., LI, X., SUZUKI, A. K., ZHANG, Y., FUJITANI, Y., NAGAOKA, K., WATANABE, G. et TAYA, K. (2013). Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *The Journal of reproduction and development* 59.2, 145–150. DOI : 10.1262/jrd.2012-145.
- LI, Q., WANG, Z., MO, J., ZHANG, G., CHEN, Y. et HUANG, C. (2017). Imaging gold nanoparticles in mouse liver by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Scientific Reports* 7.1, 2965. DOI : 10.1038/s41598-017-03275-x.
- LI, T., ALBEE, B., ALEMAYEHU, M., DIAZ, R., INGHAM, L., KAMAL, S., RODRIGUEZ, M. et WHALEY BISHNOI, S. (2010). Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398.2, 689–700. DOI : 10.1007/s00216-010-3915-1.
- LI, W., CHEN, C., YE, C., WEI, T., ZHAO, Y., LAO, F., CHEN, Z., MENG, H., GAO, Y., YUAN, H., XING, G., ZHAO, F., CHAI, Z., ZHANG, X., YANG, F., HAN, D., TANG, X. et ZHANG, Y. (2008). The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis. *Nanotechnology* 19.April, 145102. DOI : 10.1088/0957-4484/19/14/145102.
- LI, X., ZHOU, S. et FAN, W. (2016b). Effect of nano-Al₂O₃ on the toxicity and oxidative stress of copper towards *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13.6. DOI : 10.3390/ijerph13060575.
- LISON, D., VIETTI, G. et BRULE, S. van den (2014). Paracelsus in nanotoxicology. *Particle and Fibre Toxicology* 11.1, 35. DOI : 10.1186/s12989-014-0035-7.
- LIU, M., LI, Q., LIANG, L., LI, J., WANG, K., LI, J., LV, M., CHEN, N., SONG, H., LEE, J., SHI, J., WANG, L., LAL, R. et FAN, C. (2017). Real-time visualization of clustering and intracellular transport of gold nanoparticles by correlative imaging. *Nature Communications* 8.May 2016, 15646. DOI : 10.1038/ncomms15646.
- LIVAK, K. J. et SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25.4, 402–408. DOI : 10.1006/meth.2001.1262.
- LIZ-MARZÁN, L. M. (2004). Nanometals : Formation and color. *Materials Today* 7.2, 26–31. DOI : [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00080-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00080-X).
- LOVE, M. I., HUBER, W. et ANDERS, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15.12, 550. DOI : 10.1186/s13059-014-0550-8.
- LOVERN, S. B., OWEN, H. A. et KLAPER, R. (2008). Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 2.1, 43–48. DOI : 10.1080/17435390801935960.
- LOWRY, G. V., ESPINASSE, B. P., BADIREDDY, A. R., RICHARDSON, C. J., REINSCH, B. C., BRYANT, L. D., BONE, A. J., DEONARINE, A., CHAE, S., THEREZIEN, M., COLMAN, B. P., HSU-KIM, H., BERNHARDT, E. S., MATSON, C. W. et WIESNER, M. R. (2012a).

BIBLIOGRAPHIE

- Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environmental Science and Technology* 46.13, 7027–7036. DOI : 10.1021/es204608d.
- LOWRY, G. V., GREGORY, K. B., APTE, S. C. et LEAD, J. R. (2012b). Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science & Technology* 46, 6893–6899. DOI : dx.doi.org/10.1021/es300839e.
- LUJAN, N. K. et ARMBRUSTER, J. W. (2012). Morphological and functional diversity of the mandible in suckermouth armored catfishes (Siluriformes : Loricariidae). *Journal of Morphology* 273.1, 24–39. DOI : 10.1002/jmor.11003.
- LUNDQUIST, P. et ARTURSSON, P. (2016). Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine : Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* 106, 256–276. DOI : 10.1016/j.addr.2016.07.007.
- LUO, Y. H., CHANG, L. W. et LIN, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System : Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International* 2015. DOI : 10.1155/2015/143720.
- LÜRLING, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 39.2, 85–101. DOI : 10.1051/limn/2003014.
- LYNCH, K. M. et SMITH, W. A. (1935). Pulmonary asbestosis iii : Carcinoma of lung in asbesto-silicosis. *American Journal of Cancer* 24.1, 56–64. DOI : 10.1158/ajc.1935.56.
- MA, Y. J. et GU, H. C. (2007). Study on the endocytosis and the internalization mechanism of aminosilane-coated Fe₃O₄ nanoparticles in vitro. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 18.11, 2145–2149. DOI : 10.1007/s10856-007-3015-8.
- MAES, J., BELPAIRE, C. et GOEMANS, G. (2008). Spatial variations and temporal trends in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals. *Environmental Pollution* 153, 223–237. DOI : 10.1111/j.1600-0404.1995.tb01704.x.
- MAJUMDAR, S., PERALTA-VIDEA, J. R., TRUJILLO-REYES, J., SUN, Y., BARRIOS, A. C., NIU, G., MARGEZ, J. P. et GARDEA-TORRESDEY, J. L. (2016). Soil organic matter influences cerium translocation and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment* 569-570, 201–211. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2016.06.087.
- MARCHESI, J. R., ADAMS, D. H., FAVA, F., HERMES, G. D. A., HIRSCHFIELD, G. M., HOLD, G., QURAISHI, M. N., KINROSS, J., SMIDT, H., TUOHY, K. M., THOMAS, L. V., ZOETENDAL, E. G. et HART, A. (2016). The gut microbiota and host health : a

BIBLIOGRAPHIE

- new clinical frontier. *Gut* 65.2, 330–339. DOI : 10 . 1136 / gut jnl - 2015 - 309990.
- MARGOLIN, Y., ATEN, R. F., BEHRMAN, H. R. et BEHRMAN, H. R. (1990). Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology* 127.1, 245–250. DOI : 10. 1210/endo- 127- 1-245.
- MARTINON, F., BURNS, K. et TSCHOPP, J. (2002). The Inflammasome : A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- 1beta. *Molecular Cell* 10, 417–426.
- MAYNARD, A. D. (2011). Don't define nanomaterials. *Nature* 475, 31–31. DOI : 10. 1038/475031a.
- MCTEER, J., DEAN, A. P., WHITE, K. N. et PITTMAN, J. K. (2014). Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 8.3, 305–316. DOI : 10. 3109/17435390.2013. 778346.
- MEDVED, J., MATUŠ, P., BUJDOŠ, M. et KUBOVÁ, J. (2006). Gold and silver determination in Waters by SPHERON® Thiol 1000 preconcentration and ETAAS. *Chemical Papers* 60.1, 27–31. DOI : 10. 2478/s11696-006-0005-0.
- MÉTIVIER, R., BOURVEN, I., LABANOWSKI, J. et GUIBAUD, G. (2013). Interaction of erythromycin ethylsuccinate and acetaminophen with protein fraction of extracellular polymeric substances (EPS) from various bacterial aggregates. *Environmental Science and Pollution Research* 20.10, 7275–7285. DOI : 10. 1007/s11356-013-1738-2.
- MIE, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* 330.3, 377–445. DOI : 10. 1002/andp. 19083300302.
- MISHRA, A. R., ZHENG, J., TANG, X. et GOERING, P. L. (2016). Silver nanoparticle-induced autophagic-Lysosomal disruption and NLRP3-inflammasome activation in HepG2 cells is size-dependent. *Toxicological Sciences* 150.2, 473–487. DOI : 10. 1093/toxsci/kfw011.
- MOHAMED, H. R. H. (2015). Estimation of TiO₂ nanoparticle-induced genotoxicity persistence and possible chronic gastritis-induction in mice. *Food and Chemical Toxicology* 83, 76–83. DOI : 10. 1016/j. fct. 2015. 05. 018.
- MUELLER, N. C., BRAUN, J., BRUNS, J., CERNIK, M., RISSING, P., RICKERBY, D. et NOWACK, B. (2012). Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 550–558. DOI : 10. 1007/s11356-011-0576-3.
- NAJI, A., MUZEMBO, B. A., YAGYU, K.-I., BABA, N., DESCHASEAUX, F., SENSEBÉ, L. et SUGANUMA, N. (2016). Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells. *Scientific reports* 6.May, 26162. DOI : 10. 1038/srep26162.

BIBLIOGRAPHIE

- NAVARRO, E., BAUN, A., BEHRA, R., HARTMANN, N. B., FILSER, J., MIAO, A. J., QUIGG, A., SANTSCHI, P. H. et SIGG, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17.5, 372–386. DOI : 10.1007/s10646-008-0214-0.
- NEMMAR, A., HOET, P., VANQUICKENBORNE, B., DINSDALE, D., THOMEER, M., HOYLAERTS, M., VANBILLOEN, H., MORTELMANS, L. et NEMERY, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105.4, 411–414. DOI : 10.1161/hc0402.104118.
- NIE, W., DING, A., WANG, T., KERMINEN, V.-M., GEORGE, C., XUE, L., WANG, W., ZHANG, Q., PETA, T., YANG, X., FU, C. et KULMALA, M. (2014). Polluted dust promotes new particle formation and growth. *Scientific Report* 4.6634, 1–7. DOI : 10.1038/srep06634.
- NIIDOME, T., YAMAGATA, M., OKAMOTO, Y., AKIYAMA, Y., TAKAHASHI, H., KAWANO, T., KATAYAMA, Y. et NIIDOME, Y. (2006). PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release* 114.3, 343–347. DOI : 10.1016/j.jconrel.2006.06.017.
- NOËL, C., SIMARD, J.-C. et GIRARD, D. (2016). Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicology in Vitro* 31, 12–22. DOI : 10.1016/j.tiv.2015.11.003.
- NOGUEIRA, V., LOPES, I., ROCHA-SANTOS, T., SANTOS, A. L., RASTEIRO, G. M., ANTUNES, F., GONÇALVES, F., SOARES, A. M. V. M., CUNHA, A., ALMEIDA, A., GOMES, N. N. C. M. et PEREIRA, R. (2012). Impact of organic and inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure. *Science of the Total Environment* 424, 344–350. DOI : 10.1016/j.scitotenv.2012.02.041.
- NOWACK, B., BROUWER, C., GEERTSMA, R. E., HEUGENS, E. H. W., ROSS, B. L., TOUFEKTSIAN, M.-C., WIJNHOFEN, S. W. P. et AITKEN, R. J. (2013). Analysis of the occupational, consumer and environmental exposure to engineered nanomaterials used in 10 technology sectors. *Nanotoxicology* 7, 1152–1156. DOI : 10.3109/17435390.2012.711863.
- OBERDÖRSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., LUNTS, A., KREYLING, W. G. et COX, C. (2002). Extrapulmonary Translocation of Ultrafine Carbon Particles Following Whole-Body Inhalation Exposure of Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65, 1531–1543. DOI : 10.1080/00984100290071658.
- O'BRIEN, N. et CUMMINS, E. (2010). Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. *Journal of environmental science and health* 45.8, 992–1007. DOI : 10.1080/10934521003772410.
- OLDENBURG, S., AVERITT, R., WESTCOTT, S. et HALAS, N. (1998). Nanoengineering of optical resonances. *Chemical Physics Letters* 288, 243–247.

BIBLIOGRAPHIE

- OMSTEDT, G., LANGNER, J., OLIVARES, G. et METEOROLOGICAL, S. (2004). Model simulations of NO_x and ultrafine particles close to a Swedish highway. *Environmental Science & Technology* 38.24, 6730–6740. DOI : 10.1021/es0498134.
- OSBORNE, O. J., LIN, S., CHANG, C. H., JI, Z., YU, X., WANG, X., LIN, S., XIA, T. et NEL, A. (2015). Organ-Specific and Size-Dependent Ag Nanoparticle Toxicity in Gills and Intestines of Adult Zebrafish. *ACS Nano* 9.10, 9573–9584. DOI : 10.1021/acsnano.5b04583.
- PAN, J. F., BUFFET, P. E., POIRIER, L., AMIARD-TRIQUET, C., GILLILAND, D., JOUBERT, Y., PILET, P., GUIBBOLINI, M., RISSO DE FAVERNEY, C., ROMÉO, M., VALSAMI-JONES, E. et MOUNEYRAC, C. (2012). Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate : The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environmental Pollution* 168, 37–43. DOI : 10.1016/j.envpol.2012.03.051.
- PAN, Y., LEIFERT, A., RUAU, D., NEUSS, S., BORNEMANN, J., SCHMID, G., BRANDAU, W., SIMON, U. et JAHNEN-DECHENT, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5.18, 2067–2076. DOI : 10.1002/smll.200900466.
- PARK, E. J., LEE, G. H., YOON, C., JEONG, U., KIM, Y., CHO, M. H. et KIM, D. W. (2016). Biodistribution and toxicity of spherical aluminum oxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* 36.3, 424–433. DOI : 10.1002/jat.3233.
- PARK, E.-J., KIM, H., KIM, Y., YI, J., CHOI, K. et PARK, K. (2010). Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 275.1-3, 65–71. DOI : 10.1016/j.tox.2010.06.002.
- PEIJNENBURG, W. J. G. M., BAALOUSHA, M., CHEN, J., CHAUDRY, Q., KAMMER, V. D., KUHLBUSCH, T. A. J., LEAD, J., NICKEL, C., QUIK, J. T. K., RENKER, M., WANG, Z. et KOELMANS, A. A. (2015). Critical Reviews in Environmental Science and Technology A review of the properties and processes determining the fate of engineered nanomaterials in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 37–41. DOI : 10.1080/10643389.2015.1010430.
- PERALTA-VIDEA, J. R., ZHAO, L., LOPEZ-MORENO, M. L., DE, G., HONG, J. et GARDEA-TORRESDEY, J. L. (2011). Nanomaterials and the environment : A review for the biennium 2008 – 2010. *Journal of Hazardous Materials* 186.1, 1–15. DOI : 10.1016/j.jhazmat.2010.11.020.
- PETERSEN, E. J., AKKANEN, J., KUKKONEN, J. V. et WEBER, W. J. (2009). Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by daphnia magna. *Environmental Science and Technology* 43.8, 2969–2975. DOI : 10.1021/es8029363.
- PETERSEN, E. J., HENRY, T. B., ZHAO, J., MACCUSPIE, R. I., KIRSCHLING, T. L., DOBROVOLSKAIA, M. A., HACKLEY, V., XING, B. et WHITE, J. C. (2014). Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial

BIBLIOGRAPHIE

- ecotoxicity measurements. *Environmental Science and Technology* 48.8, 4226–4246. DOI : 10.1021/es4052999.
- PHALEN, R. F., MENDEZ, L. B. et OLDHAM, M. J. (2010). New developments in aerosol dosimetry. *Inhalation Toxicology* 22 Suppl 2. August, 6–14. DOI : 10.3109/08958378.2010.516031.
- PHAM, C. H., YI, J. et GU, M. B. (2012). Biomarker gene response in male Medaka (*Oryzias latipes*) chronically exposed to silver nanoparticle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 239–245. DOI : 10.1016/j.ecoenv.2011.11.034.
- PHINYO, K., PEKKOH, J. et PEERAPORNPIHAL, Y. (2017). Distribution and ecological habitat of *Scenedesmus* and related genera in some freshwater resources of Northern and North-Eastern Thailand. 18.3, 1092–1099. DOI : 10.13057/biodiv/d180329.
- PIERRON, F., BAUDRIMONT, M., BOSSY, A., BOURDINEAUD, J.-P., ETHES, D., ELIE, P. et MASSABUAU, J.-C. (2007). Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology* 81, 304–311. DOI : 10.1016/j.aquatox.2006.12.014.
- PIERRON, F., BAUDRIMONT, M., LUCIA, M., DURRIEU, G., MASSABUAU, J. C. et ELIE, P. (2008). Cadmium uptake by the European eel : Trophic transfer in field and experimental investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70.1, 10–19. DOI : 10.1016/j.ecoenv.2007.11.018.
- POLAND, C. A., DUFFIN, R., KINLOCH, I., MAYNARD, A., WALLACE, A. H. W., SEATON, A., STONE, V., BROWN, S., MACNEE, W. et DONALDSON, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology* 3.7, 423–428. DOI : 10.1038/nnano.2008.111.
- PORTER, A. L. et YOUTIE, J. (2009). Where does nanotechnology belong in the map of science? *Nat Nano* 4.9, 534–536.
- PRATO, M. (1997). [60] Fullerene chemistry for materials science applications. *Journal of Materials Chemistry* 7.1, 1097–1109.
- PRIESTER, J. H., GE, Y., MIELKE, R. E., HORST, A. M. et COLE, S. (2012). Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *PNAS* 109.37, 2451–2456. DOI : 10.1073/pnas.1205431109.
- PRIESTER, J. H., STOIMENOV, P. K., MIELKE, R. E., WEBB, S. M., EHRHARDT, C., ZHANG, J. I. N. P. et STUCKY, G. D. (2009). Effects of Soluble Cadmium Salts Versus CdSe Quantum Dots on the Growth of Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* 43, 2589–2594. DOI : 10.1021/es802806n.
- RAJ, S., SUMOD, U., JOSE, S. et SABITHA, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics : Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 4.3, 186. DOI : 10.4103/0975-7406.99016.

BIBLIOGRAPHIE

- RAMDHAN, D. H., ITO, Y., YANAGIBA, Y., YAMAGISHI, N., HAYASHI, Y., LI, C. M., TANEDA, S., SUZUKI, A. K., WATANABE, G., TAYA, K., KAMIJIMA, M. et NAKAJIMA, T. (2009). Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone. *Toxicology Letters* 191.2-3, 103–108. DOI : 10.1016/j.toxlet.2009.08.013.
- RAMSDEN, C. S., SMITH, T. J., SHAW, B. J. et HANDY, R. D. (2009). Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) : No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18.7, 939–951. DOI : 10.1007/s10646-009-0357-7.
- RAMSKOV, T., FORBES, V. E., GILLILAND, D. et SELCK, H. (2015). Accumulation and effects of sediment-associated silver nanoparticles to sediment-dwelling invertebrates. *Aquatic Toxicology* 166, 96–105. DOI : 10.1016/j.aquatox.2015.07.002.
- RECORDATI, C., DE MAGLIE, M., BIANCHESI, S., ARGENTIERE, S., CELLA, C., MATIELLO, S., CUBADDA, F., AURELI, F., D'AMATO, M., RAGGI, A., LENARDI, C., MILANI, P. et SCANZIANI, E. (2016). Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice : nano-specific and size-dependent effects. *Particle and fibre toxicology* 13.1, 12. DOI : 10.1186/s12989-016-0124-x.
- RENAULT, S., BAUDRIMONT, M., MESMER-DUDONS, N., GONZALEZ, P., MORNET, S. et BRISSON, A. (2008). Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species : a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bulletin* 41.2, 116–126. DOI : 10.1007/BF03216589.
- ROCO, M. C., MIRKIN, C. A. et HERSAM, M. C. (2011). Nanotechnology research directions for societal needs in 2020 : Summary of international study. *Journal of Nanoparticle Research* 13.3, 897–919. DOI : 10.1007/s11051-011-0275-5.
- ROSI N.L., M. C. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews* 105, 1547–1562. DOI : 10.1021/cr030067f.
- SADAUSKAS, E., JACOBSEN, N. R., DANSCHER, G., STOLTENBERG, M., VOGEL, U., LARSEN, A., KREYLING, W. et WALLIN, H. (2009). Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chemistry Central journal* 3.1, 16. DOI : 10.1186/1752-153X-3-16.
- SADIQ, I. M., PAKRASHI, S., CHANDRASEKARAN, N. et MUKHERJEE, A. (2011). Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species : *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research* 13.8, 3287–3299. DOI : 10.1007/s11051-011-0243-0.
- SALARI, M., MOUSAVI, S. M., MARASHI, P. et REZAEI, M. (2009). Synthesis of TiO₂ nanoparticles via a novel mechanochemical method. *Journal of Alloys and Compounds* 469, 386–390. DOI : 10.1016/j.jallcom.2008.01.112.

BIBLIOGRAPHIE

- SANJAY, S. S. et PANDEY, A. C. (2017). *A Brief Manifestation of Nanotechnology*. Sous la dir. de SPRINGER, p. 47–64. DOI : 10.1007/978-81-322-3655-9.
- SARA, H., RACHID, R., SALIM, G., AML, A., AMNA, A., AYA, S., NADJIBA, T., CHAHINEZ, T., ZINA, B., HAJER, C., SAMIRA, B., MOHAMED, K., MARIEM, A. et BELGACEM, D. (2016). Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 8.2, 161–167. DOI : 10.1007/s13530-016-0273-1.
- SCHAEUBLIN, N. M., BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHRAND, A. M., MILLER, J. M., HUTCHISON, J., SCHLAGER, J. J. et HUSSAIN, S. M. (2011). Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3, 410–420. DOI : 10.1039/c0nr00478b.
- SCHINS, R. P. F. et KNAAPEN, A. M. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1, February, 189–198. DOI : 10.1080/08958370701496202.
- SCHLEH, C., SEMMLER-BEHNKE, M., LIPKA, J., WENK, A., HIRN, S., SCHÄFFLER, M., SCHMID, G., SIMON, U. et KREYLING, W. G. (2012). Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* 6.1, 36–46. DOI : 10.3109/17435390.2011.552811.
- SÉBERT, P. (2003). *Fish adaptations to pressure*. Fish Adapt. Science Publisher, p. 73–95.
- SELA, H., COHEN, H., ELIA, P., ZACH, R., KARPAS, Z. et ZEIRI, Y. (2015). Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal of nanobiotechnology* 13.1, 71. DOI : 10.1186/s12951-015-0133-1.
- SELIKOFF, I. J. (1990). Historical developments and perspectives in inorganic fiber toxicity in man. *Environmental Health Perspectives* 88, 269–276. DOI : 10.1289/ehp.9088269.
- SENGUPTA, A. et KUMAR, C. (2015). *Introduction to Nano, Basics to Nanoscience and Nanotechnology*. Sous la dir. de SPRINGER.
- SHAHARE, B., YASHPAL, M. et SINGH, G. (2013). Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods* 23.3, 161–167. DOI : 10.3109/15376516.2013.764950.
- SHAMSIPUR, M. et RAMEZANI, M. (2008). Selective determination of ultra trace amounts of gold by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta* 75.1, 294–300. DOI : 10.1016/j.talanta.2007.11.009.
- SHARMA, H. S., ALI, S. F., HUSSAIN, S. M., SCHLAGER, J. J. et SHARMA, A. (2009). Influence of Engineered Nanoparticles from Metals on the Blood-Brain Barrier Permeability, Cerebral Blood Flow, Brain Edema and Neurotoxicity. An Ex-

BIBLIOGRAPHIE

- perimental Study in the Rat and Mice Using Biochemical and Morphological Approaches. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9.8, 5055–5072. doi : 10.1166/jnn.2009.GR09.
- SHENG, L., WANG, L., SU, M., ZHAO, X., HU, R., XIAOHONG, Y., HONG, J., LIU, D., XU, B., ZHU, Y., WANG, H. et HONG, F. (2009). Mechanism of TiO₂ Nanoparticle-Induced Neurotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology* 24.3, 296–303. doi : 10.1002/tox.22031.
- SHI, X., BUSSCHE, A. von dem, HURT, R. H., KANE, A. B. et GAO, H. (2011). Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nature nanotechnology* 6.11, 714–9. doi : 10.1038/nnano.2011.151.
- SHIPLEY, H. J., ENGATES, K. E. et GUETTNER, A. M. (2011). Study of iron oxide nanoparticles in soil for remediation of arsenic. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 2387–2397. doi : 10.1007/s11051-010-9999-x.
- SHRESTHA, B., ACOSTA-MARTINEZ, V., COX, S. B., GREEN, M. J., LI, S. et CAÑAS-CARRELL, J. E. (2013). An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning. *Journal of Hazardous Materials* 261, 188–197. doi : 10.1016/j.jhazmat.2013.07.031.
- SHRIVASTAVA, R., RAZA, S., YADAV, A., KUSHWAHA, P. et FLORA, S. J. S. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and chemical toxicology* 37.3, 336–47. doi : 10.3109/01480545.2013.866134.
- SHUKLA, R., BANSAL, V., CHAUDHARY, M., BASU, A., BHONDE, R. R. et SASTRY, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment : A microscopic overview. *Langmuir* 21.23, 10644–10654. doi : 10.1021/la0513712.
- SHVEDOVA, A. A., KISIN, E. R., MERCER, R., MURRAY, A. R., JOHNSON, V. J., POTAPOVICH, A. I., TYURINA, Y. Y., GORELIK, O., AREPALLI, S., SCHWEGLER-BERRY, D., HUBBS, A. F., ANTONINI, J., EVANS, D. E., KU, B.-K., RAMSEY, D., MAYNARD, A., KAGAN, V. E., CASTRANOVA, V. et BARON, P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, 698–708. doi : 10.1152/ajplung.00084.2005.
- SIDDIQI, N. J., ABDELHALIM, M. A. K., EL-ANSARY, A. K., ALHOMIDA, A. S. et ONG, W. Y. (2012). Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *Journal of Neuroinflammation* 9.1, 656. doi : 10.1186/1742-2094-9-123.
- SIMON, D. F., DOMINGOS, R. F., HAUSER, C., HUTCHINS, C. M., ZERGES, W. et WILKINSON, K. J. (2013). Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomo-*

BIBLIOGRAPHIE

- nas reinhardtii. *Applied and Environmental Microbiology* 79.16, 4774–4785. DOI : 10.1128/AEM.00998-13.
- SINGH, S., SHI, T., DUFFIN, R., ALBRECHT, C., BERLO, D. van, HÖHR, D., FUBINI, B., MARTRA, G., FENOGLIO, I., BORM, P. J. A. et SCHINS, R. P. F. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂ : Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222.2, 141–151. DOI : 10.1016/j.taap.2007.05.001.
- SONAVANE, G., TOMODA, K. et MAKINO, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration : Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 66.2, 274–280. DOI : 10.1016/j.colsurfb.2008.07.004.
- SONG, E., GAUDIN, A., KING, A. R., SEO, Y. E., SUH, H. W., DENG, Y., CUI, J., TIETJEN, G. T., HUTTNER, A. et SALTZMAN, W. M. (2017). Surface chemistry governs cellular tropism of nanoparticles in the brain. *Nature Communications* 8.May, 15322. DOI : 10.1038/ncomms15322.
- SPÄTH, R., FLAMMING, H. C. et WUERTZ, S. (1998). Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology* 37.4-5, 207–210. DOI : 10.1016/S0273-1223(98)00107-3.
- STAMM, H. (2011). Risk factors : Nanomaterials should be defined. *Nature* 476.7361, 399. DOI : 10.1038/476399c.
- STELZER, R. et HUTZ, R. J. (2009). Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation. *The Journal of reproduction and development* 55.6, 685–690. DOI : 10.1262/jrd.20241.
- STERN, S. T., ADISESHAIAH, P. P. et CRIST, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and fibre toxicology* 9.1, 20. DOI : 10.1186/1743-8977-9-20.
- STOEGER, T., TAKENAKA, S., FRANKENBERGER, B., RITTER, B., KARG, E., MAIER, K., SCHULZ, H. et SCHMID, O. (2009). Deducing in vivo toxicity of combustion-derived nanoparticles from a cell-free oxidative potency assay and Metabolic activation of organic compounds. *Environmental Health Perspectives* 117.1, 54–60. DOI : 10.1289/ehp.11370.
- STONE, V. et DONALDSON, K. (2006). Nanotoxicology : Signs of stress. *Nature Nanotechnology* 1.1, 23–24. DOI : 10.1038/nnano.2006.69.
- SUNG, J. H., JI, J. H., PARK, J. D., YOON, J. U., KIM, D. S., JEON, K. S., SONG, M. Y., JEONG, J., HAN, B. S., HAN, J. H., CHUNG, Y. H., CHANG, H. K., LEE, J. H., CHO, M. H., KELMAN, B. J. et YU, I. J. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences* 108.2, 452–461. DOI : 10.1093/toxsci/kfn246.

BIBLIOGRAPHIE

- TANGAA, S. R., SELCK, H., WINTHER-NIELSEN, M. et KHAN, F. R. (2016). Trophic transfer of metal-based nanoparticles in aquatic environments : a review and recommendations for future research focus. *Environ. Sci. : Nano* 3.5, 966–981. DOI : 10.1039/C5EN00280J.
- TANIGUCHI, N. (1974). On the basic concept of « nanotechnology ». *Japan Society of Precision Engineering*.
- TASSINARI, R., CUBADDA, F., MORACCI, G., AURELI, F., D'AMATO, M., VALERI, M., DE BERARDIS, B., RAGGI, A., MANTOVANI, A., PASSERI, D., ROSSI, M. et MARANGHI, F. (2014). Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat : focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* 8.6, 654–62. DOI : 10.3109/17435390.2013.822114.
- TEDESCO, S., DOYLE, H., REDMOND, G. et SHEEHAN, D. (2008). Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 66.1, 131–133. DOI : 10.1016/j.marenvres.2008.02.044.
- TEDESCO, S., DOYLE, H., BLASCO, J., REDMOND, G. et SHEEHAN, D. (2010a). Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 151.2, 167–174. DOI : 10.1016/j.cbpc.2009.10.002.
- TEDESCO, S., DOYLE, H., BLASCO, J., REDMOND, G. et SHEEHAN, D. (2010b). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 100.2, 178–186. DOI : 10.1016/j.aquatox.2010.03.001.
- TESCH, F. (2003). *The Eel*. Sous la dir. de J. THORPE, p. 1–418. DOI : 10.1111/j.0022-1112.2004.00509a.x.
- TIAN, L., LIN, B., WU, L., LI, K., LIU, H., YAN, J., LIU, X. et XI, Z. (2015). Neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles : age-related differences and interaction. *Scientific reports* 5, 16117. DOI : 10.1038/srep16117.
- TIEDE, K., BOXALL, A., TEAR, S., LEWIS, J., DAVID, H. et HASSELLOV, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives & Contaminants : Part A* 25.7, 795–821. DOI : 10.1080/02652030802007553.
- TIEDE, K., HASSELLÖV, M., BREITBARTH, E., CHAUDHRY, Q. et BOXALL, A. B. A. (2009). Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1216.3, 503–509. DOI : 10.1016/j.chroma.2008.09.008.
- TOLAYMAT, T., EL, A., GENAIDY, A., ABDELRAHEEM, W. et SEQUEIRA, R. (2017). Analysis of metallic and metal oxide nanomaterial environmental emissions. *Journal of Cleaner Production* 143, 401–412. DOI : 10.1016/j.jclepro.2016.12.094.
- TRAN, D., BOUDOU, A. et MASSABUAU, J.-C. (2002). Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound

BIBLIOGRAPHIE

- cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21.2, 327–33. DOI : 10.1002/etc.5620210214.
- TRIPATHI, R. M., SHRIVASTAV, A. et SHRIVASTAV, B. R. (2015). Biogenic gold nanoparticles : As a potential candidate for brain tumor directed drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 43.5, 311–317. DOI : 10.3109/21691401.2014.885445.
- TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C. et HILLER, J. (1951). A Study of the Nucleation and Growth Processes IN the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* 11.c, 55–75. DOI : 10.1039/DF9511100055.
- UNFRIED, K., ALBRECHT, C., KLOTZ, L.-O., VON MIKECZ, A., GREYER-BECK, S., SCHINS, R. P. F., VON, A., GREYER-BECK, S. et SCHINS, R. P. F. (2007). Cellular responses to nanoparticles : Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1.1, 52–71. DOI : 10.1080/00222930701314932.
- UNRINE, J. M., SHOULTS-WILSON, W., ZHURBICH, O., BERTSCH, P. et TSYUSKO, O. V. (2012). Trophic Transfer of Au Nanoparticles from Soil along a Simulated Terrestrial Food Chain. *Environmental Science & Technology* 46, 9753–9760. DOI : 10.1021/es3025325.
- UNRINE, J., HUNYADI, S., TSYUSKO, O., RAO, W., SHOULTS-WILSON, W. et BERTSCH, P. (2010). Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Bio-distribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science & Technology* 44.21, 8308–8313. DOI : 10.1021/es101885w.
- VECCHIO, G., GALEONE, A., BRUNETTI, V., MAIORANO, G., RIZZELLO, L., SABELLA, S., CINGOLANI, R. et POMPA, P. P. (2012a). Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8.1, 1–7. DOI : 10.1016/j.nano.2011.11.001.
- VECCHIO, G., GALEONE, A., BRUNETTI, V., MAIORANO, G., SABELLA, S., CINGOLANI, R. et POMPA, P. P. (2012b). Concentration-dependent, size-independent toxicity of citrate capped AuNPs in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7.1. DOI : 10.1371/journal.pone.0029980.
- VERGÈS, E. (2010). *La régulation des nanotechnologies, clair-obscur normatif. Régime juridique d'identification et de suivi des nanoparticules et des nanomatériaux : enjeux et obstacles liés à la maîtrise sociale de l'infiniment petit*. Larcier, p. 175.
- VERMA, A. et STELLACCI, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6.1, 12–21. DOI : 10.1002/smll.200901158.
- VON DER KAMMER, F., OTTOFUELLING, S. et HOFMANN, T. (2010). Assessment of the physico-chemical behavior of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environments using multi-dimensional parameter testing. *Environmental Pollution* 158.12, 3472–3481. DOI : 10.1016/j.envpol.2010.05.007.

BIBLIOGRAPHIE

- WALTERS, C. et POOL, E. (2016). *Nanotoxicology : A Review*. Technology. Open Access book, p. 46–63. DOI : 10.5772/64754.
- WANG, B., FENG, W. Y., WANG, M., SHI, J. W., ZHANG, F., OUYANG, H., ZHAO, Y. L., CHAI, Z. F., HUANG, Y. Y., XIE, Y. N., WANG, H. F. et WANG, J. (2007). Transport of intranasally instilled fine Fe₂O₃ particles into the brain : Micro-distribution, chemical states, and histopathological observation. *Biological Trace Element Research* 118.3, 233–243. DOI : 10.1007/s12011-007-0028-6.
- WANG, C. H. et TZENG, W. N. (2000). The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel leptocephali : A mechanism of larval segregative migration. *Fisheries Research* 46.1-3, 191–205. DOI : 10.1016/S0165-7836(00)00146-6.
- WANG, C., BAI, Y., LI, H., LIAO, R., LI, J., ZHANG, H., ZHANG, X., ZHANG, S., YANG, S.-T. et CHANG, X.-L. (2015). Surface modification-mediated biodistribution of 13C-fullerene C60 in vivo. *Particle and Fibre Toxicology* 13.1, 14. DOI : 10.1186/s12989-016-0126-8.
- WANG, Y. Y., CAI, K. F. A. et YAO, X. (2009). Journal of Solid State Chemistry Facile synthesis of PbTe nanoparticles and thin films in alkaline aqueous solution at room temperature. *Journal of Solid State Chemistry* 182.12, 3383–3386. DOI : 10.1016/j.jssc.2009.10.004.
- WANG, Z., YIN, L., ZHAO, J. et XING, B. (2016). Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Research* 95, 250–259. DOI : 10.1016/j.watres.2016.03.027.
- WERLIN, R., PRIESTER, J. H., MIELKE, R. E., KRÄMER, S., JACKSON, S., STOIMENOV, P. K., STUCKY, G. D., CHERR, G. N., ORIAS, E. et HOLDEN, P. A. (2011). Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nature Nanotechnology* 6.1, 65–71. DOI : 10.1038/nnano.2010.251.
- WESTERHOFF, P., LEE, S., YANG, Y., GORDON, G. W., HRISTOVSKI, K., HALDEN, R. U. et HERCKES, P. (2015). Characterization, Recovery Opportunities, and Valuation of Metals in Municipal Sludges from U.S. Wastewater Treatment Plants Nationwide. *Environmental Science & Technology* 49.16, 9479–9488. DOI : 10.1021/es505329q.
- WHITESIDES, G. M. (2003). The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* 21.10, 1161–1165. DOI : 10.1038/nbt872.
- WHITFIELD, G. B., MARMONT, L. S. et HOWELL, P. L. (2015). Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology* 6.MAY, 1–21. DOI : 10.3389/fmicb.2015.00596.

BIBLIOGRAPHIE

- WILHELM, C., LAVIALLE, F., PÉCHOUX, C., TATISCHEFF, I. et GAZEAU, F. (2008). Intracellular trafficking of magnetic nanoparticles to design multifunctional biovesicles. *Small* 4.5, 577–582. DOI : 10.1002/smll.200700523.
- WINTER, M., BEER, H. D., HORNUNG, V., KRAMER, U., SCHINS, R. P. et FORSTER, I. (2011). Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* 5.3, 326–340. DOI : 10.3109/17435390.2010.506957.
- WISE, J. P., GOODALE, B. C., WISE, S. S., CRAIG, G. A., PONGAN, A. F., WALTER, R. B., THOMPSON, W. D., NG, A. K., ABOUEISSA, A. E. M., MITANI, H., SPALDING, M. J. et MASON, M. D. (2010). Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology* 97.1, 34–41. DOI : 10.1016/j.aquatox.2009.11.016.
- WITSCHGER, O. et FABRIÈS, J. (2005). Particules ultrafines et santé au travail : 1-caractéristiques et effets potentiels sur la santé - hygiène et sécurité du travail. *Cahiers de notes documentaires INRS*.199, 21–35.
- WIWANITKIT, V., SEREEMASPUN, A. et ROJANATHANES, R. (2009). Effect of gold nanoparticles on spermatozoa : the first world report. *Fertility and Sterility* 91.1, 9–10. DOI : 10.1016/j.fertnstert.2007.08.021.
- WRIGHT, P. (2016). Potential risks and benefits of nanotechnology : perceptions of risk in sunscreens. *Medical Journal of Australia* 204.June, 369–371. DOI : 10.5694/mja15.01128.
- WRITER, J. H., BARBER, L. B., RYAN, J. N. et BRADLEY, P. M. (2011). Biodegradation and attenuation of steroidal hormones and alkylphenols by stream biofilms and sediments. *Environmental Science and Technology* 45.10, 4370–4376. DOI : 10.1021/es2000134.
- XIA, T., ROME, L. et NEL, A. (2008). Particles slip cell security. *Nature Materials* 7.July, 7–8.
- XU, L., DAN, M., SHAO, A., CHENG, X., ZHANG, C., AYOKEL, R. A., TAKEMURA, T., HANAGATA, N., NIWA, M. et WATANABE, D. (2015). Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *International Journal of Nanomedicine* 10, 6105–6119. DOI : 10.2147/IJN.S85265.
- YAMAGISHI, N., ITO, Y., RAMDHAN, D. H., YANAGIBA, Y., HAYASHI, Y., WANG, D., LI, C. M., TANEDA, S., SUZUKI, A. K., TAYA, K., WATANABE, G., KAMIJIMA, M. et NAKAJIMA, T. (2012). Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats. *Inhalation toxicology* 24.8, 459–467. DOI : 10.3109/08958378.2012.688225.
- YAO, M., HE, L., McCLEMENTS, D. J. et XIAO, H. (2015). Uptake of Gold Nanoparticles by Intestinal Epithelial Cells : Impact of Particle Size on Their Absorption, Accumulation, and Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63.36, 8044–8049. DOI : 10.1021/acs.jafc.5b03242.

BIBLIOGRAPHIE

- YEO, M. K. et NAM, D. H. (2013). Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm : A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environmental Pollution* 178, 166–172. DOI : 10.1016/j.envpol.2013.03.040.
- YOO, S.-h., LIU, L. et PARK, S. (2009). Journal of Colloid and Interface Science Nanoparticle films as a conducting layer for anodic aluminum oxide template-assisted nanorod synthesis. *Journal of Colloid And Interface Science* 339.1, 183–186. DOI : 10.1016/j.jcis.2009.07.049.
- YOSHIDA, S., HIYOSHI, K., ICHINOSE, T., TAKANO, H., OSHIO, S., SUGAWARA, I., TAKEDA, K. et SHIBAMOTO, T. (2008). Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology* 32, 337–342. DOI : 10.1111/j.1365-2605.2008.00865.x.
- ZANDE, M. V. D., VANDEBRIEL, R. J., DOREN, E. V., KRAMER, E., RIVERA, Z. H., SERRANO-ROJERO, C. S., GREMMER, E. R., MAST, J., PETERS, R. J. B., HOLLMAN, P. C. H., HENDRIKSEN, P. J. M., MARVIN, H. J. P., PEIJNENBURG, A. A. C. M., BOUWMEESTER, H., ZANDE, M. van der, VANDEBRIEL, R. J., VAN DOREN, E., KRAMER, E., HERRERA RIVERA, Z., SERRANO-ROJERO, C. S., GREMMER, E. R., MAST, J., PETERS, R. J. B., HOLLMAN, P. C. H., HENDRIKSEN, P. J. M., MARVIN, H. J. P., PEIJNENBURG, A. A. C. M. et BOUWMEESTER, H. (2012). Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure - ACS Nano (ACS Publications).pdf. *ACS Nano* 6.8, 7427–7442. DOI : 10.1021/nn302649p.
- ZE, Y., HU, R., WANG, X., SANG, X., ZE, X., LI, B., SU, J., WANG, Y., GUAN, N., ZHAO, X., GUI, S., ZHU, L., CHENG, Z., CHENG, J., SHENG, L., SUN, Q., WANG, L. et HONG, F. (2014). Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 102.2, 470–478. DOI : 10.1002/jbm.a.34705.
- ZHANG, L., XIE, H., LIU, Y. et WANG, J. (2017). Toxicology : Open Access Research of an Iron Oxide Nanoparticles and Potential Application. 3.3, 1–7. DOI : 10.4172/2476-2067.1000130.
- ZHANG, P., HE, X., MA, Y., LU, K., ZHAO, Y. et ZHANG, Z. (2012). Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89.5, 530–535. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2012.05.044.
- ZHANG, X. D., WU, D., SHEN, X., LIU, P. X., YANG, N., ZHAO, B., ZHANG, H., SUN, Y. M., ZHANG, L. A. et FAN, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 6, 2071–2081. DOI : 10.2147/IJN.S21657.
- ZHAO, C. M. et WANG, W. X. (2010). Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 44.19, 7699–7704. DOI : 10.1021/es101484s.

BIBLIOGRAPHIE

- ZHAO, P., LI, N. et ASTRUC, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews* 257.3-4, 638–665. DOI : 10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- ZHOU, W. et COLEMAN, J. J. (2016). Semiconductor quantum dots. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 20.6, 352–360. DOI : 10.1016/j.cossms.2016.06.006.
- ZHU, X., CHANG, Y. et CHEN, Y. (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78.3, 209–215. DOI : 10.1016/j.chemosphere.2009.11.013.
- ZI, Y. et WANG, Z. L. (2017). Nanogenerators : An emerging technology towards nanoenergy. *APL Materials* 074103.5, 1–13.