



HAL
open science

Impacts des nanoplastiques et microplastiques sur les premiers stades de vie (gamètes, embryons, larves) de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Kevin Tallec

► **To cite this version:**

Kevin Tallec. Impacts des nanoplastiques et microplastiques sur les premiers stades de vie (gamètes, embryons, larves) de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0103 . tel-02996550

HAL Id: tel-02996550

<https://theses.hal.science/tel-02996550>

Submitted on 9 Nov 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : « *Biologie Marine* »

Par

Kevin TALLEC

Impacts des nanoplastiques et microplastiques sur les premiers stades de vie (gamètes, embryons, larves) de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 18 décembre 2019

Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR ; UMR 6539)

Rapporteurs avant soutenance :

Maria João BEBIANNO
Professeure, Université de l'Algarve

Xavier COUSIN
Chargé de recherches, INRA, MARBEC

Composition du Jury :

Maria João BEBIANNO
Professeure, Université de l'Algarve

Xavier COUSIN
Chargé de recherches, INRA, UMR MARBEC

Claire HELLIO – Présidente du Jury
Professeure, Université de Bretagne Occidentale
UMR LEMAR

Stéphanie REYNAUD
Chargée de recherches, CNRS, UMR IPREM

Pascal FAVREL
Professeur, Université de Caen, UMR BOREA

Directeur de thèse : Arnaud HUVET
Chargé de recherches, Ifremer, UMR LEMAR

Membre invité : Ika PAUL-PONT
Chargée de recherches, CNRS, UMR LEMAR

Remerciements

Je souhaite remercier Luis Tito de Morais, Pierre Boudry et Elodie Fleury de m'avoir accueilli au sein du LEMAR, du PFOM et du LPI, respectivement. Je remercie Ifremer et la Région Bretagne d'avoir financé cette thèse ainsi que l'ANR Nanoplastics pour le financement des expérimentations et de mes déplacements à l'étranger afin de présenter mes travaux.

Je remercie Maria João Bebianno, Stéphanie Reynaud, Claire Hellio, Pascal Favrel et Xavier Cousin d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie Catherine Mouneyrac, Rossana Sussarellu, Carole Di Poi, Myrina Boulais, Guillaume Brotons, Caroline Fabioux et Philippe Soudant d'avoir accepté d'être dans mon comité de thèse. Merci à vous pour vos idées et vos encouragements.

Je remercie Evan Ward de m'avoir accueilli dans son équipe à l'Université du Connecticut pendant 2 mois. Cette collaboration a été très enrichissante scientifiquement et humainement.

Il est déjà temps de remercier mes deux directeurs de thèse, mes deux chefs, mes deux boss, Arnaud Huvet (Arnaud-sama) et Ika Paul-Pont (Ika-sensei). Merci pour ces trois belles années en votre compagnie, merci de m'avoir fait confiance pour ce magnifique sujet de thèse, merci pour votre soutien constant, merci de m'avoir fait grandir scientifiquement/humainement et merci pour votre bienveillance. J'ai pris beaucoup de plaisir à réfléchir, à travailler et à rigoler avec vous. Je suis fier d'avoir été votre petit padawan, mes mots ne représenteront jamais toute mon admiration pour vous car je pense sincèrement avoir pu profiter d'un encadrement exceptionnel, jalosé par la plupart de mes collègues thésards.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes du LEMAR et de la station d'Argenton qui ont accepté de travailler avec moi pendant ces trois ans. Je remercie particulièrement Nelly Le Goïc et Christophe Lambert qui ont toujours répondu présents et qui ont répondu à mes millions de « j'ai une petite question » depuis mon stage de master 2.

Je remercie mes quatre stagiaires, Océane Blard, Ilaria Bernardini, Charlotte Bourdon et Quentin Millière pour m'avoir aidé pendant cette thèse.

Merci à Anne-Laure Cassone d'avoir corrigé l'orthographe de ce manuscrit et d'avoir été aux petits soins avec moi !

Merci à l'ensemble de mes amis du laboratoire pour toutes ces soirées, ces parties de ping-pong, ces séances d'escalade et de sport chez Momo et ces moments de bonne humeur qui font que devoir quitter cet endroit est une très grande épreuve.

Merci à la team Suze pour ces moments de détente à parler foot. La ligue des champions est pour nous cette année.

Merci à mes amis concarnois d'être toujours présents malgré mes absences à répétition. Chaque moment avec vous est essentiel à mon équilibre.

Un immense merci à mes parents, mon petit frère, ma petite sœur et l'ensemble de ma famille qui ont toujours été présents pour que je ne manque de rien. Ces longues études ont toujours eu le même but : vous rendre fier.

Mon dernier merci est pour toi Justine. Merci d'avoir été à mes côtés pendant cette thèse et de me supporter tous les jours.

INTRODUCTION GENERALE & OBJECTIFS DE LA THESE.....	9
ETAT DE L'ART – ORIGINES, ENJEUX ET RISQUES DES DECHETS PLASTIQUES.	19
1) LES POLYMERES.....	20
2) LES PLASTIQUES : CONTAMINANTS EMERGEANTS.....	23
3) LES RISQUES DES DEBRIS PLASTIQUES POUR LA BIOSPHERE	41
MODELE BIOLOGIQUE – L'HUÎTRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>.....	55
1) CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'HUÎTRE CREUSE	56
2) REPRODUCTION ET CYCLE DE VIE.....	62
INFLUENCE DE PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LE COMPORTEMENT DE NANOPLASTIQUES MODELES.....	71
PREAMBULE	72
ABSTRACT.....	75
1) INTRODUCTION.....	76
2) MATERIALS AND METHODS.....	78
3) RESULTS	80
4) DISCUSSION.....	87
A RETENIR	92
TOXICITE DES NANO- ET MICROPLASTIQUES SUR TROIS ETAPES SENSIBLES DU DEVELOPPEMENT PELAGIQUE DE L'HUÎTRE	95
PREAMBULE	96
ABSTRACT.....	99
1) INTRODUCTION.....	100
2) MATERIALS AND METHODS.....	102
3) RESULTS	106
4) DISCUSSION.....	111
5) SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	116
A RETENIR	118
REPONSES DES SPERMATOZOÏDES ET OVOCYTES FACE AUX NANOPLASTIQUES.....	121
PREAMBULE	122

PARTIE 1: NANOPOLYSTYRENE BEADS AFFECT MOTILITY AND REPRODUCTIVE SUCCESS OF OYSTER'S SPERMATOOZOA (<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>).....	124
ABSTRACT.....	124
1) INTRODUCTION.....	125
2) MATERIALS AND METHODS.....	127
3) RESULTS.....	134
4) DISCUSSION.....	143
5) CONCLUSION.....	146
6) SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	147
PARTIE 2 : TOXICITE DES NANO-PS SUR LES OVOCYTES.....	153
1) INTRODUCTION.....	153
2) MATERIEL ET METHODES.....	153
3) RESULTATS.....	155
4) DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL.....	158
A RETENIR.....	162
EXPOSITION EMBRYONNAIRE AUX NANOPLASTIQUES (PS-NH₂) SUR DEUX GENERATIONS D'HUÎTRES : CONSEQUENCES SUR LES PERFORMANCES LARVAIRES ET ADULTES.....	165
PREAMBULE.....	166
ABSTRACT.....	168
1) INTRODUCTION.....	169
2) MATERIALS AND METHODS.....	172
3) RESULTS.....	179
4) DISCUSSION.....	186
5) SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	192
A RETENIR.....	196
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	199
1) LES EFFETS DES MNP SUR LES JEUNES STADES DE <i>C. GIGAS</i>	201
2) COMMENT S'APPROCHER DE LA REALITE ENVIRONNEMENTALE ?.....	209
3) REFLEXION PERSONNELLE.....	217
BILAN DE LA THESE.....	219
REFERENCES.....	223

INTRODUCTION GENERALE & OBJECTIFS DE LA THESE

Les régions côtières sont à l'interface entre les zones continentales, estuariennes et marines. Elles représentent $1,6 \times 10^6$ km de linéaire de rivage, soit 7% de la surface totale des océans. Elles sont à l'origine de services écosystémiques que l'on peut classer en quatre catégories (UNEP, 2006): (1) Approvisionnement, *e.g.* nourriture, produits naturels utilisables par l'Homme ; (2) Régulation, *e.g.* protection contre les tempêtes et inondations ; (3) Culturel, *e.g.* éco-tourisme ; (4) Soutien, *e.g.* production primaire, cycle des nutriments. Cependant, ces régions sont des écosystèmes sensibles et fragiles. Du fait de la proximité avec les activités humaines, ce sont des zones particulièrement sujettes aux perturbations d'origines anthropiques (*e.g.* changements globaux, hydrocarbures, pesticides, nanomatériaux, métaux lourds) (UNEP, 2006).

Parmi les nombreuses espèces résidant dans ces régions côtières, les suspensivores benthiques sont parmi les plus étudiés par la communauté scientifique en raison de leurs rôles majeurs dans le cycle des nutriments et la régulation de la production primaire (Gili & Coma, 1998). Dans ce groupe de taxons, on retrouve les mollusques bivalves qui se caractérisent par la présence de deux valves symétriques ou asymétriques selon les espèces. Le nombre important d'études portant sur ces organismes est lié à quatre caractéristiques. Premièrement, les mollusques marins remplissent des rôles écologiques essentiels dans les régions côtières, *e.g.* modulation des biomasses phytoplanctoniques, création des micro-habitats *via* les récifs (espèces ingénieures de l'écosystème). Deuxièmement, ils ont un rôle économique et nutritionnel (*e.g.* riches en omega-3) souligné par une augmentation dans la production globale (capture + aquaculture) de 93 % entre 1950 et 2016 (Guillen et al., 2018 ; FAOStat, 2019). Troisièmement, les bivalves sont des archives environnementales. Il est possible de récupérer des données paléo-environnementales physiques, chimiques et biologiques (*e.g.* température de l'eau, pH, efflorescences et dynamiques phytoplanctoniques) enregistrées à l'intérieur de leur coquille pour permettre la reconstruction des paléo-climats (Schöne & Gillikin, 2013; Thébault & Chauvaud, 2013). Enfin, certains bivalves (*e.g.* huîtres, moules) sont des espèces sentinelles (Aguirre-Rubí et al., 2019; Thomas et al., 2018). En effet, leur forte activité de filtration à des fins respiratoire et nutritionnelle engendre la rétention (bioaccumulation) des polluants dissous et particuliers présents dans la colonne d'eau (*e.g.* métaux lourds, polluants organiques, micro/nanoparticules, résidus médicamenteux) (Li et al., 2019; Rocha et al., 2015; Viarengo &

Canesi, 1991; Yusof et al., 2004). Ainsi, l'analyse des tissus permet de mesurer le taux de pollution/contamination dans la région étudiée au moment du prélèvement du fait de leur sessilité ou de leur très faible capacité de déplacement selon les espèces (notion également importante en tant qu'archives environnementales). De plus, ces espèces sont des sentinelles car elles résistent/tolèrent de larges gammes de stress environnementaux permettant leur utilisation dans des milieux fortement anthropisés. Ces caractéristiques permettent leur utilisation dans les réseaux d'observation des contaminants aquatiques (chimiques et biologiques) à l'échelle nationale (*e.g.* Réseau d'Observation de la Contamination Chimique [ROCCH], Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines [REPHY], Observatoire Conchylicole [RESCO] ; France), européenne (*e.g.* Convention OSPAR ; Directive cadre stratégie pour le milieu marin [DCSMM]) et internationale (*e.g.* Mussel Watch Program ; Etats-Unis).

Aujourd'hui, un contaminant émergent est le sujet d'une forte attention par la communauté scientifique et plus globalement les sociétés humaines : les déchets plastiques. Les matériaux plastiques présentent une production exponentielle depuis la fin de la seconde guerre mondiale (1950 = 2 millions de tonnes [Mt]; 2017 = 348 Mt) (Bouwmeester et al., 2015; PlasticsEurope, 2018). Ce succès est associé aux caractéristiques générales des plastiques car ils sont malléables, résistants, légers, peu onéreux et présentent une bonne isolation thermique et électrique. Ils sont donc polyvalents et permettent une utilisation dans des domaines variés (*e.g.* électronique, agriculture, emballage alimentaire, automobile) (Barnes et al., 2009; Thompson et al., 2009). Cependant, la gestion de la fin de vie des plastiques n'est pas à la hauteur de leur utilisation. Depuis 1950, la production globale de plastiques a été estimée à 8300 Mt, dont environ 79 % ont été déposés ou abandonnés dans l'environnement ou dans des décharges où ils ont tendance à s'accumuler en raison de leur très lente dégradation (plusieurs décennies à plusieurs siècles) (Geyer et al., 2017).

Les déchets plastiques, comme l'ensemble des contaminants anthropiques, ont pour destination finale les océans par le biais de différents vecteurs (*e.g.* rejets accidentels ou volontaires, ruissellement, rivières/fleuves, transport atmosphérique) (Figure 1). En 2010, selon les estimations de Jambeck et al. (2015), entre 13 200 et 34 800 t de déchets plastiques entraient de façon journalière dans le compartiment marin. Ces estimations devraient augmenter d'un ordre de grandeur d'ici 2025 sans la mise en place d'une meilleure gestion

des déchets (Jambeck et al., 2015). En 2014, environ 250 000 t de débris plastiques flottaient à la surface de l'océan ouvert selon les estimations d'Eriksen et al. (2014).

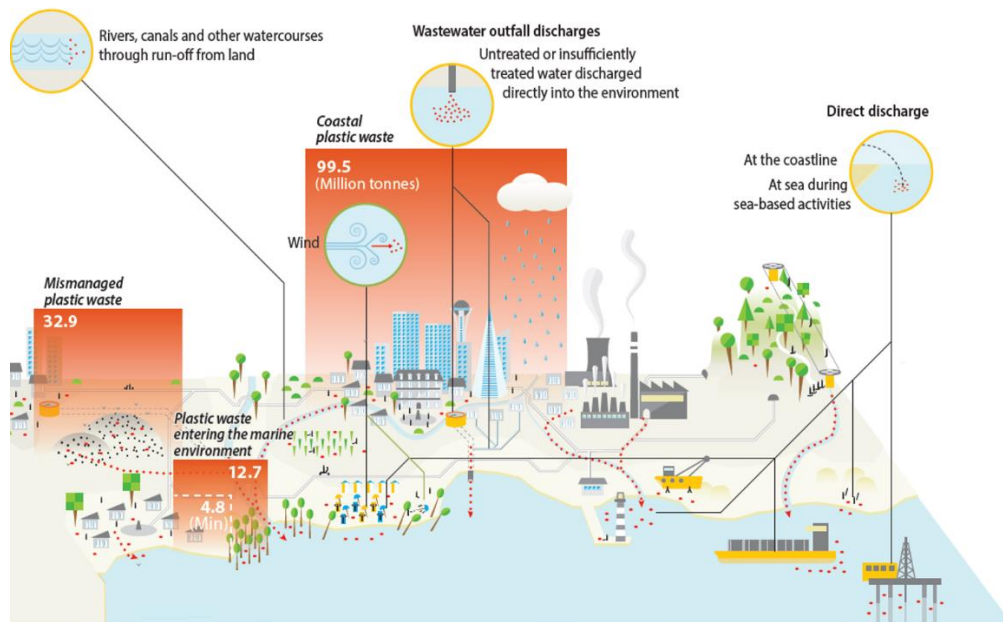


Figure 1. Principales voies d'entrée des débris plastiques dans les océans. D'après Grid-Arendal & UNEP (2016).

Alors que la présence de débris plastiques est remarquée à la surface des océans depuis les années 70, un nouveau paramètre apparaît en 2004 lorsque Richard Thompson met en évidence la présence de déchets microscopiques, invisibles à l'œil nu, les microplastiques (MP ; < 5 mm) (Rochman et al., 2019; Thompson et al., 2004). Ces MP sont utilisés directement par les industriels (MP primaires) ou proviennent de la fragmentation de plus gros déchets sous l'effet de l'eau (hydrolyse), de la lumière (photodégradation ; processus majeur), des turbulences océaniques (fragmentation mécanique) et des organismes vivants (biodégradation) (MP secondaires) (Andrady, 2011; Cole et al., 2011). En 2014, les particules inférieures à 5 mm constituaient 92 % des $525 \cdot 10^{10}$ débris plastiques présents à la surface des océans (Eriksen et al., 2014). Néanmoins, ces particules plastiques ne restent pas indéfiniment dans les eaux de surface. Selon leurs propriétés (*e.g.* densité, propriétés chimiques de surface) et leurs interactions avec les organismes vivants au cours du vieillissement dans l'eau de mer (*e.g.* ingestion, interactions avec les communautés phytoplanctoniques et bactériennes), la distribution des MP peut fluctuer dans la colonne d'eau, devenant disponibles pour une large gamme de taxons benthiques et pélagiques (Galloway et al., 2017; Paul-Pont et al., 2018;

Rummel et al., 2017). Les MP et possibles contaminants associés en leur cœur (additifs) et à leur surface hydrophobe (*e.g.* polluants organiques persistants – POPs, pathogènes) peuvent alors interagir avec les appendices buccaux et/ou les mécanismes de respiration et d’ingestion des organismes marins. Des effets néfastes de ces interactions sont donc suspectés/anticipés à différentes échelles par la communauté scientifique (Galloway et al., 2017; Galloway & Lewis, 2016; Rochman et al., 2015) (Figure 2).

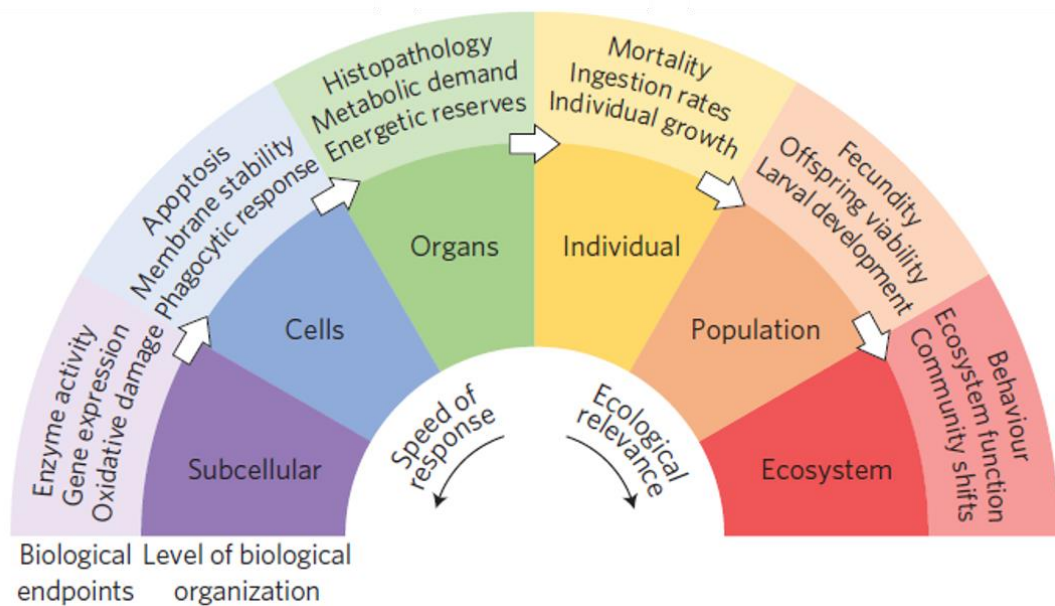


Figure 2. Effets suspectés des MP sur la biodiversité marine selon les données obtenues en laboratoire. D’après Galloway et al. (2017).

Récemment, une nouvelle classe de débris a été proposée : les nanoplastiques (ici définis comme : $1 \text{ nm} < \text{NP} < 100 \text{ nm}$) (Hartmann et al., 2019). Tout comme les MP, il existe des NP primaires (*e.g.* cosmétiques, vecteurs médicamenteux, sous-produits d’activités industrielles) (Hernandez et al., 2017; Lusher et al., 2017a; Zhang et al., 2012) et secondaires produits par photodégradation, action mécanique ou encore biodégradation d’après des données expérimentales (Dawson et al., 2018; Ekvall et al., 2019; Gigault et al., 2016; Lambert & Wagner, 2016). Théoriquement, une particule sphérique de $5 \mu\text{m}$ devrait donner par fragmentation 10^{14} particules de 100 nm (Wagner & Reemtsma, 2019). Du fait de l’augmentation de l’abondance des débris lorsque l’on descend dans les classes de taille (plus de 80% des débris font entre 10 et $100 \mu\text{m}$), les concentrations environnementales des NP

sont attendues à des niveaux supérieurs par rapport aux MP (Cole & Galloway, 2015; Erni-Cassola et al., 2017; Peeken et al., 2018; Wagner & Reemtsma, 2019). A ce jour, aucune donnée quantitative n'est disponible au sujet de la contamination des milieux terrestres et aquatiques par les NP. Seulement une étude portant sur l'analyse de la fraction colloïdale du Gyre Subtropical Atlantique Nord suggère la présence de NP car des empreintes chimiques de polymères sont retrouvées dans cette fraction (Ter Halle et al., 2017). La quantification et l'analyse des NP dans des échantillons environnementaux représentent un challenge analytique pour toute la communauté (Gigault et al., 2018; Koelmans et al., 2015; Mintenig et al., 2018; Schwaferts et al., 2019). Toutefois, l'analyse en laboratoire des risques liés aux NP a déjà commencé depuis plusieurs années avec pour première conclusion une toxicité supérieure des NP en comparaison des MP (Jeong et al., 2016, 2017; Lee et al., 2013). En effet, comme pour les autres nanoparticules, à cette échelle les propriétés du matériel sont complètement différentes (*e.g.* augmentation du ratio surface/volume, de la résistance et de la réactivité) (Klaine et al., 2012). Ces nouvelles caractéristiques rendent possible le passage à travers les membranes et les interactions avec les macromolécules, ce qui augmente les risques de lésions et de dommages chez les organismes exposés (Klaine et al., 2012; Mattsson et al., 2015a; Nel et al., 2006; Rocha et al., 2015; Wright & Kelly, 2017).

La toxicité potentielle des nanoparticules est dépendante de leur comportement dans l'environnement (Lowry et al., 2012). Théoriquement, les NP ont un comportement de type brownien¹. Dans la réalité, le comportement d'un NP dans un milieu donné est lié à trois types de transformations : (i) Physiques (homo- et hétéroagrégation) ; (ii) Chimiques (interactions macromoléculaires affectant la surface des particules (*e.g.* adsorption de polysaccharides, de la matière organique, de protéines, de polluants) ; (iii) Biologiques (interactions avec les micro-organismes et organismes vivants) (Lowry et al., 2012). Ces transformations sont dépendantes des propriétés de la particule (*e.g.* taille, forme, charge de surface) et des paramètres environnementaux (*e.g.* communauté microbienne, matière organique, salinité, pH) (Alimi et al., 2018; Lowry et al., 2012; Mattsson et al., 2015a).

En raison de leur proximité avec les activités anthropiques, les régions côtières – et la biodiversité associée – sont les premières zones du compartiment marin à faire face à l'apport

¹ Mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide, dicté par les chocs entre la particule et les molécules d'eau.

massif de déchets plastiques. Sur les littoraux français comme mondiaux, une des espèces emblématiques des mollusques bivalves est l'huître creuse *Crassostrea gigas*, considérée comme une espèce sentinelle et ingénieuse (Grabowski et al., 2012; Thomas et al., 2018). Une récente étude a mis en évidence la sensibilité de cette espèce aux MP par une exposition en laboratoire d'huîtres adultes à des microsphères de polystyrène (2 et 6 μm) pendant 8 semaines. Les MP ont induit chez *C. gigas* une perturbation de l'allocation énergétique durant la gamétogénèse, se traduisant par une réduction drastique de la quantité et qualité des gamètes et un retard de développement pour la descendance issue des parents exposés (Sussarellu et al., 2016). A la lumière de ces travaux, la compréhension de la toxicité des MNP (micro- et nanoplastiques) sur l'ensemble du cycle de vie de *C. gigas* apparaît comme essentielle afin d'évaluer le risque pour l'espèce. L'huître base sa reproduction sur une fécondation externe, *i.e.* émission des gamètes dans le milieu sous des paramètres environnementaux (*e.g.* température, photopériode, quantité de nourriture). Ainsi, les jeunes stades (gamètes, embryons et larves) sont libres dans la colonne d'eau et donc en contact direct avec les contaminants anthropiques en zone côtière, incluant les potentiels contaminants particulaires de type MNP. A ce jour, la seule étude portant sur l'effet des MP (1 et 10 μm ; 100 MP.mL⁻¹) sur la croissance larvaire de *C. gigas* n'a révélé aucun effet après 8 jours d'exposition (Cole & Galloway, 2015). Néanmoins, la toxicité potentiellement accrue des particules nanométriques (NP) du fait de leur ratio surface/volume et de leur réactivité mérite d'être évaluée en comparaison avec les particules micrométriques (MP) sur l'ensemble des stades libres (gamètes, embryons, larves). En l'absence de données robustes sur les concentrations des petits MP et NP dans les écosystèmes marins, l'approche méthodologique la plus pertinente consiste à déterminer les seuils de toxicité *via* des expériences en dose-réponse, avant d'explorer plus finement les mécanismes sous-jacents à leur toxicité *via* une approche intégrative englobant différentes échelles d'organisation du vivant : écophysiologique, tissulaire, cellulaire et moléculaire.

L'approche de ce travail de thèse repose sur le couplage pluridisciplinaire de différents domaines scientifiques (biologiques, physico-chimiques) synthétisé dans notre article publié en 2018 (Paul-Pont et al., 2018) pour optimiser la qualité des expériences en milieu contrôlé et ainsi évaluer les effets des MNP sur les jeunes stades de l'huître creuse. Ainsi, cette thèse s'articule autour de quatre grands objectifs (Figure 3).

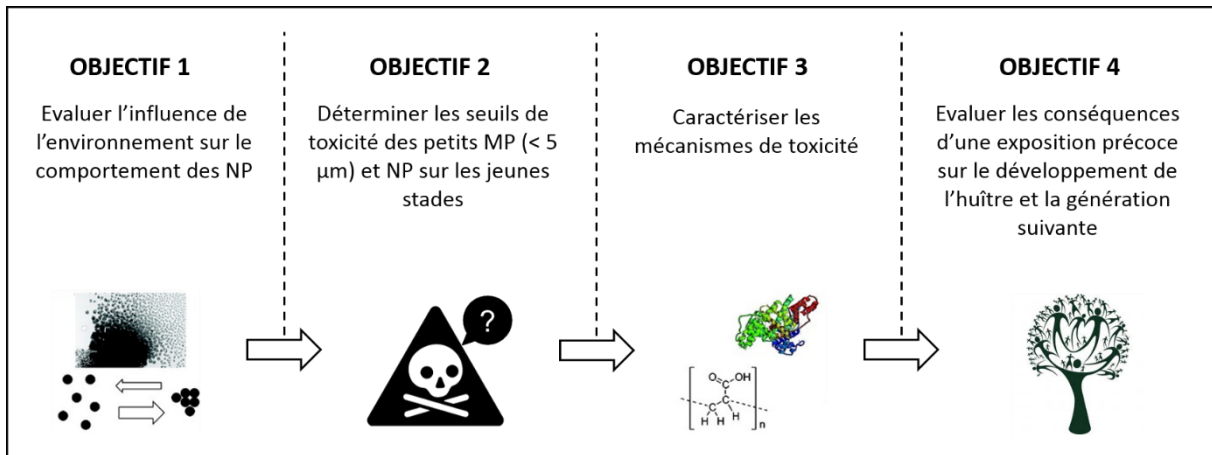


Figure 3. Objectifs de la thèse

Afin de répondre à ces questionnements ventilés en 4 objectifs, ce travail de thèse est structuré en sept chapitres. Le **Chapitre 1** est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les déchets plastiques, leur devenir dans les océans et leur toxicité pour les organismes marins. Le **Chapitre 2** est une présentation du modèle biologique de l'étude, l'huître creuse *C. gigas*. Les caractéristiques générales, ses rôles écologiques, les processus impliqués dans la reproduction et le développement planctonique y sont présenté(e)s. Le **Chapitre 3** présente les résultats obtenus lors de l'analyse de l'influence des paramètres environnementaux (*i.e.* salinité, matière organique) sur le comportement de trois types de NP possédant différentes caractéristiques de surface (sans groupement de surface, groupements aminés $-NH_2$, groupements carboxylés $-COOH$) (Objectif 1). Ce chapitre est sous la forme d'un article publié en 2019 dans *Chemosphere*. Le **Chapitre 4** est consacré à la détermination des seuils de toxicité de cinq types de particules plastiques, deux MP (2 μm et 500 nm) et trois NP (50 nm ; sans groupement, groupements $-NH_2$, groupements $-COOH$), sur trois étapes sensibles du développement de l'huître : (i) la fécondation, (ii) l'embryogénèse, (iii) la métamorphose (Objectif 2). Ce chapitre est sous la forme d'un article publié en 2018 dans *Environmental Pollution*. Le **Chapitre 5** synthétise l'ensemble des résultats portant sur la caractérisation des effets (cellulaires, comportementaux, membranaires) impliqués dans la toxicité des NP (50 nm, groupements $-NH_2$ et $-COOH$) sur les cellules gamétiques et leur pouvoir reproducteur (Objectifs 2 et 3). Ce chapitre est composé de deux parties, la première qui fait l'objet d'un article en préparation pour une soumission dans *Nanotoxicology* concernant les spermatozoïdes et la seconde qui montre les résultats préliminaires obtenus pour les ovocytes. Le **Chapitre 6** a pour objectif d'explorer les conséquences d'une exposition

précoce aux NP sur le développement larvaire de l'huître, ainsi que sur la croissance et la reproduction de ces individus une fois atteint l'âge adulte (Objectifs 3 et 4). Enfin, le dernier chapitre, le **Chapitre 7**, présente une discussion générale des résultats obtenus, associée à un ensemble de perspectives mettant en lumière les nouveaux questionnements issus de ce travail de thèse.

CHAPITRE 1

ETAT DE L'ART – ORIGINES, ENJEUX ET RISQUES DES DECHETS PLASTIQUES

1) LES POLYMERES

a) Origine et historique

i. Description d'un plastique

Par définition, les matériaux plastiques proviennent de la polymérisation de monomères (répétition identique : homopolymères ; répétition de monomères variés : copolymères) formant une structure complexe caractérisée par un poids moléculaire élevé (GESAMP 2015). Cette répétition de monomères est considérée comme l'ossature du composé car durant le processus de fabrication d'un objet plastique, les polymères sont associés une à plusieurs fois à des composés chimiques, les additifs (*e.g.* plastifiants, antioxydants, stabilisants, pigments, retardateurs de flamme), afin de modifier les propriétés et d'améliorer les performances du composé (*e.g.* résistance aux chocs, température, pression, changement de couleur) (Bittner et al., 2014; Hermabessiere et al., 2017) (Figure 1).

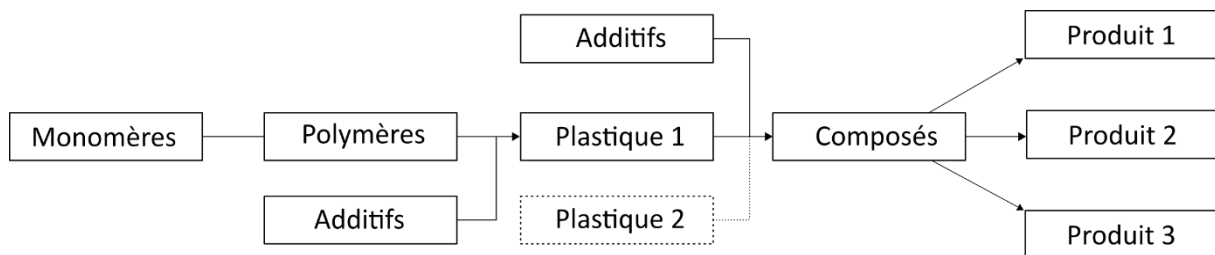


Figure 1. Représentation schématique de la production de produits plastiques. Modifié d'après Bittner et al. (2014).

Les polymères ont une origine fossile (polymères synthétiques) ou naturelle (polymères biosourcés) (Cole et al., 2011; UNEP, 2015). Les polymères biosourcés (*e.g.* cellulose, amidon, soie, caoutchouc) sont utilisés depuis plusieurs siècles par les sociétés humaines tandis que le premier polymère industriel synthétique, la parkesine, fût créé en 1855 par Alexander Parkes, faisant office de pionnier dans la plasturgie. Les développements de procédés chimiques au début du XX^{ème} siècle ont permis la production industrielle de nouveaux polymères synthétiques tels que le polychlorure de vinyle (PVC) en 1931, le polyamide (PA) et le polystyrène (PS) en 1935, ou encore le polyéthylène (PE) en 1939. Aujourd'hui, bien qu'une trentaine de polymères synthétiques soient classés comme « communs » en raison de leurs fortes utilisations journalières dans des activités industrielles et domestiques, sept polymères

dominant la production ($\approx 80\%$ en Europe) : le polyéthylène (PE), polypropylène (PP), polystyrène classique (PS) et expansé (EPS), le polychlorure de vinyle (PVC), le polyéthylène téréphtalate (PET) et enfin le polyuréthane (PUR) (PlasticsEurope, 2018).

ii. Nomenclature des polymères

Les polymères sont divisés en deux grandes catégories, les thermoplastiques (TP) et les thermodurcissables (TD), qui diffèrent par des structures chimiques accordant des propriétés macroscopiques propres à chacune de ces classes (UNEP, 2015). Les TP présentent l'avantage d'être toujours malléables sous l'effet de la température après leur moulage, *i.e.* sous l'effet de la chaleur le matériau se ramollit puis reprend de sa solidité lors de la baisse de température. Ils représentent 90 % de la production. Le PE, PS, EPS, PVC, PP et PET sont des TP. Les TD sont réticulés et résistent ainsi aux fortes températures, empêchant tout remoulage après production. Dans cette catégorie, on peut retrouver le PUR ou encore les résines époxy.

b) Production et utilisation

La production de plastiques n'a cessé d'augmenter depuis la fin de la seconde guerre mondiale afin de répondre aux demandes des sociétés humaines, faisant entrer l'humanité dans « l'Âge des Plastiques » (Barnes et al., 2009; Brandon et al., 2019; Thompson et al., 2009). La production augmente annuellement de 8,7 %, atteignant 348 millions de tonnes (Mt) en 2017 contre 2 Mt en 1950 (PlasticsEurope, 2018) (Figure 2). Il est à noter que les valeurs données par PlasticsEurope sont sous-estimées car la production de certaines fibres synthétiques (*e.g.* PA, PET) n'est pas prise en compte dans les rapports annuels. Actuellement, la plasturgie utilise entre 4 et 6 % des ressources pétrolières, les principaux producteurs étant la Chine (29 %), l'ALENA (États-Unis, Mexique, Canada ; 18 %) et l'Union Européenne (19 %) (Lusher et al., 2017a; PlasticsEurope, 2018). A ce rythme, la production mondiale atteindra 2 000 Mt en 2050 et utilisera 20 % des ressources pétrolières (Lusher et al., 2017a; Suaria et al., 2016). Le succès des plastiques leur confère un rôle majeur dans les économies régionales. La plasturgie représente 60 000 entreprises, 1,5 millions d'emplois et 355 milliards d'euros de chiffre d'affaires en 2017 rien que pour l'Union Européenne (PlasticsEurope, 2018).

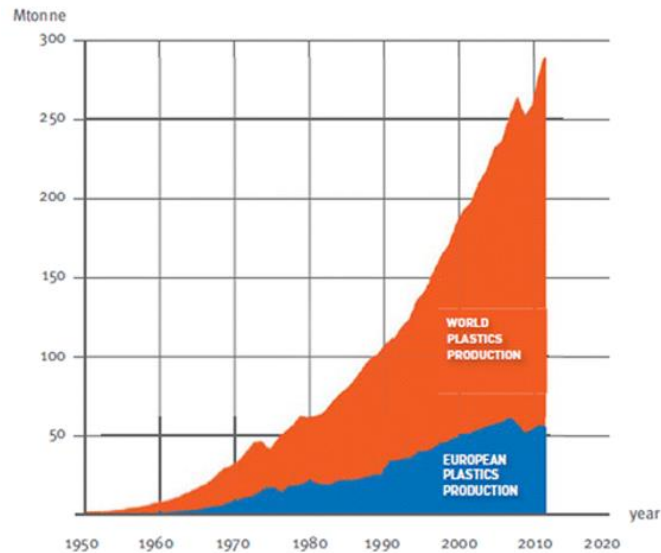


Figure 2. Evolution de la production mondiale (orange) et européenne (bleu) entre 1950 et 2012. D’après Bouwmeester et al. (2015).

Les caractéristiques des composés plastiques, *i.e.* résistants (chocs, température, pression), inertes, durables, légers, malléables et peu onéreux, les rendent extrêmement polyvalents et permettent la production d’objets/emballages divers et variés (Ryan, 2015) (Figure 3). Ainsi, les plastiques ont remplacé la plupart des matériaux anciennement utilisés par l’Homme. Le ciment et l’acier dans le secteur du bâtiment et des travaux publics font office de survivants face à la domination de la plasturgie dans les autres domaines (*e.g.* emballage, équipement médicale, électronique) (Geyer et al., 2017).

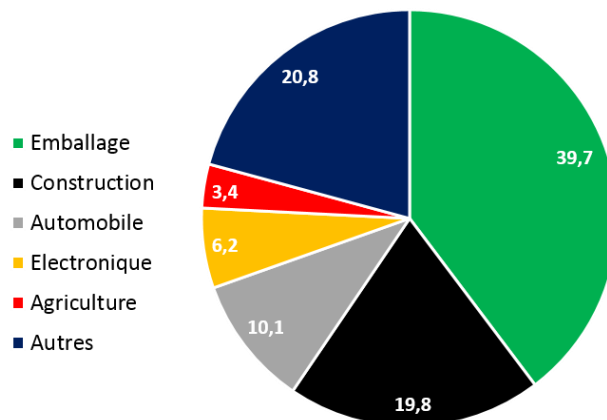


Figure 3. Pourcentage d’utilisation des matériaux plastiques par domaine d’activité au sein de l’Union Européenne. La catégorie « Autres » correspond aux plastiques utilisés dans différents champs d’application (*e.g.* équipement médical, produits ménagers). D’après les données de PlasticsEurope (2018).

2) LES PLASTIQUES : CONTAMINANTS EMERGEANTS

a) Une gestion des déchets problématique

En dépit du succès annoncé des plastiques il y a 70 ans, les moyens pour gérer la production, l'utilisation et donc la fin de vie des déchets n'ont pas été anticipés (Thompson et al., 2009). Dans le modèle économique actuel, le coût de production avantageux des plastiques ne reflète pas le coût élevé du recyclage ou de l'élimination des déchets car il n'est pas à la charge du producteur ou du consommateur (Newman et al., 2015). De plus, le mode de vie des sociétés modernes n'est pas en adéquation avec une politique visant à limiter la production de déchets plastiques. Ainsi, plus de 50 % des plastiques produits sont à usage unique ou à durée de vie courte (*e.g.* emballages, sacs alimentaires) et seulement 20 % sont à durée de vie longue (*e.g.* tuyaux, revêtement et aux autres éléments de construction) (Brooks et al., 2018; Hopewell et al., 2009). Les 30 % restant concernent les plastiques à durée de vie intermédiaire notamment utilisés dans l'électronique, l'automobile ou la création d'ameublement. Sur les 8 300 Mt de plastiques produits depuis 1950, il est estimé que seulement 2 600 Mt sont encore en service (Geyer et al., 2017).

A ce jour, il existe trois possibilités pour un plastique en fin de vie : (1) Incinération (seule méthode de destruction complète) avec ou sans valorisation de l'énergie produite en électricité et chauffage ; (2) Recyclage et récupération de la matière première ; (3) Dépôt dans des décharges ou dans l'environnement (Geyer et al., 2017). A titre d'exemple, la France – considéré comme un pays en avance sur la gestion des déchets plastiques – a produit 4,5 Mt de déchets plastiques (66,6 kg par habitant) en 2016 avec seulement 22 % de recyclage (1 Mt dont 40 % exportés en Asie), 36 % enfouis, 40 % incinérés et 2 % déposés dans les décharges et/ou environnement (WWF, 2019). Au total depuis 1950, 79 % des plastiques produits ont été déposés en décharge ou dans l'environnement (Geyer et al., 2017).

Le dépôt (accidentel ou volontaire) de déchets plastiques dans l'environnement est hautement problématique, aucun des principaux polymères utilisés par la plasturgie n'est biodégradable², ils ont donc tendance à s'accumuler. Cette accumulation est déjà suffisante pour permettre d'utiliser les plastiques comme marqueur de l'Anthropocène (Brandon et al.,

² Dégradation sous l'action de micro-organismes jusqu'à l'obtention de molécules simples assimilables par les végétaux.

2019; Zalasiewicz et al., 2016). En 2015, 47 % (60-99 Mt) des déchets plastiques mondiaux ont été déposés dans l'environnement (Lebreton & Andrady, 2019). Cependant, selon les régions du globe, la fraction de déchets mal gérés est particulièrement inégale (Lebreton & Andrady, 2019). L'Europe et l'Amérique du Nord relarguent entre 1 et 10 % (0,3 – 3.3 Mt) de leur production de déchets tandis que ces pourcentages sont largement supérieurs en Asie (63 % ; 52 Mt) et en Afrique (85 % ; 17 Mt). Il est néanmoins important de noter qu'une partie des déchets produits en Europe et en Amérique du Nord est exportée en Asie et Afrique pour le traitement de leur fin de vie (Brooks et al., 2018). Par exemple, la Chine a réceptionné 45 % de l'intégralité des déchets produits depuis 1992 (Brooks et al., 2018). Face à la croissance des populations humaines et donc de la demande, la quantité de déchets plastiques produits pourrait atteindre 380 Mt en 2060 (Lebreton & Andrady, 2019). Selon les trois scénarios³ définis par ces auteurs, la quantité relarguée annuellement à partir de 2060 atteindrait une valeur moyenne de 213 Mt dans le cas le plus extrême avec l'Afrique et l'Asie comme principaux contributeurs (Figure 4).

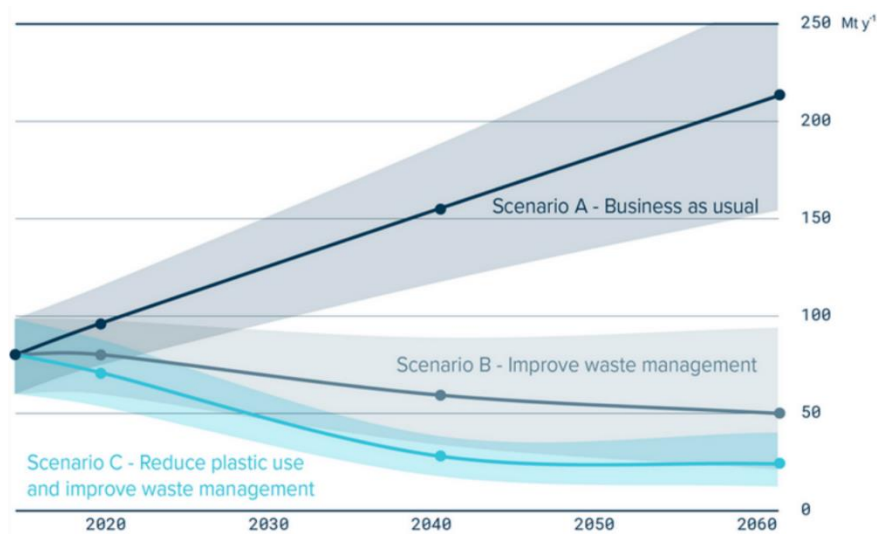


Figure 4. Projections selon trois scénarios de la quantité de déchets plastiques rejetés dans l'environnement d'ici 2060. A : Aucune modification dans le rythme de production ; B : Amélioration de la gestion des déchets ; C : Amélioration de la gestion des déchets et réduction de l'utilisation des plastiques. D'après Lebreton & Andrady (2019).

³ A : Aucune modification dans le rythme de production et utilisation des plastiques ; B : Amélioration de la gestion des déchets dont un investissement dans de nouvelles infrastructures valorisant les déchets plastiques ; C : Amélioration de la gestion des déchets et réduction dans l'utilisation (réduction de la demande et interdiction des plastiques à usage unique).

b) L'océan : réceptacle final des déchets anthropiques

Les déchets rejetés dans l'environnement ne sont pas statiques. Alors qu'une partie des débris s'accumule dans les sols et peut interagir avec la diversité terrestre (de Souza Machado et al., 2018a; Hurley & Nizzetto, 2018; Rillig et al., 2017, 2018), la majorité est acheminée le long du continuum terre-mer jusqu'aux océans (Figure 5) (Barnes et al., 2009; Thompson et al., 2009). Les premières observations de débris plastiques océaniques remontent aux années 70 (Carpenter & Smith, 1972; Rothstein, 1973). Depuis, les débris s'accumulent dans toutes les zones marines et représentent plus de 70 % des débris anthropiques (Derraik, 2002; Hardesty et al., 2017; Lusher et al., 2017a; Thompson et al., 2004). Pour l'année 2010, entre 4,7 et 12,8 Mt de déchets plastiques sont entrées dans les océans d'après les estimations de Jambeck et al. (2015). Ces auteurs prévoient une augmentation d'un ordre de grandeur d'ici 2025 sans le développement de plans de gestion adaptés. La répartition mondiale des zones de rejets océaniques et le transport *via* les courants entraînent une distribution ubiquitaire des débris plastiques au sein de toutes les régions océaniques y compris les zones dépourvues d'activités humaines. Ainsi, des plastiques sont retrouvés sur les plages (Costa et al., 2010; Lavers & Bond, 2017), dans les estuaires (Browne et al., 2011), le long des côtes (Browne et al., 2011; Frère et al., 2017), dans l'océan ouvert (Cózar et al., 2014; Eriksen et al., 2014), dans les mers ouvertes et fermées (Cózar et al., 2015; Lechner et al., 2014; Suaria et al., 2016), dans les régions polaires (Bergmann et al., 2017; Cózar et al., 2017; Lusher et al., 2015), dans la glace de mer (Obbard et al., 2014; Peeken et al., 2018), dans les récifs coralliens (Lamb et al., 2018) et dans les zones abyssales (Van Cauwenberghe et al., 2013; Woodall et al., 2014).

Les sources de débris plastiques sont divisées en deux grandes catégories, les sources terrestres (*e.g.* activités industrielles, agriculture, tourisme, catastrophes naturelles) et les sources maritimes (*e.g.* aquaculture, pêcheries, plateformes offshore, transport maritime) (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; Law, 2017) (Figure 5). Le déplacement des débris jusqu'à l'environnement marin implique plusieurs types de transport. D'une part, ils peuvent être libérés directement (intentionnellement ou non) par diverses activités (*e.g.* perte de marchandises pendant import/export, activités touristiques). D'autre part, les déchets déposés dans le milieu terrestre vont être évacués par le ruissellement, le vent ou le relargage direct à l'intérieur des rivières et fleuves aboutissant jusqu'aux océans (Figure 5). L'apport annuel de débris océaniques *via* les rivières est estimé entre 0,41 – 4 Mt (Schmidt et al., 2017)

et 1,15 – 2,41 Mt (Lebreton et al., 2017) selon les modèles mathématiques. Toutefois, l'apport par les rivières est dépendant des changements saisonniers (Lebreton et al., 2017). Par exemple, 70 % des débris présents dans les rivières anglaises pendant l'été sont exportés durant la période de crues hivernales (Hurley et al., 2018). Il est à noter que les fines particules que l'on retrouve dans l'océan pourraient provenir de retombées atmosphériques (Liu et al., 2019). A ce jour peu de données existent sur ces retombées mais elles sont estimées à 29 – 280, 175 – 313 et 296 - 434 particules.m⁻².jour⁻¹ dans la région parisienne (France), la région de Dongguan (Chine) et dans les Pyrénées (France), respectivement (Allen et al., 2019; Cai et al., 2017; Dris et al., 2015, 2016).

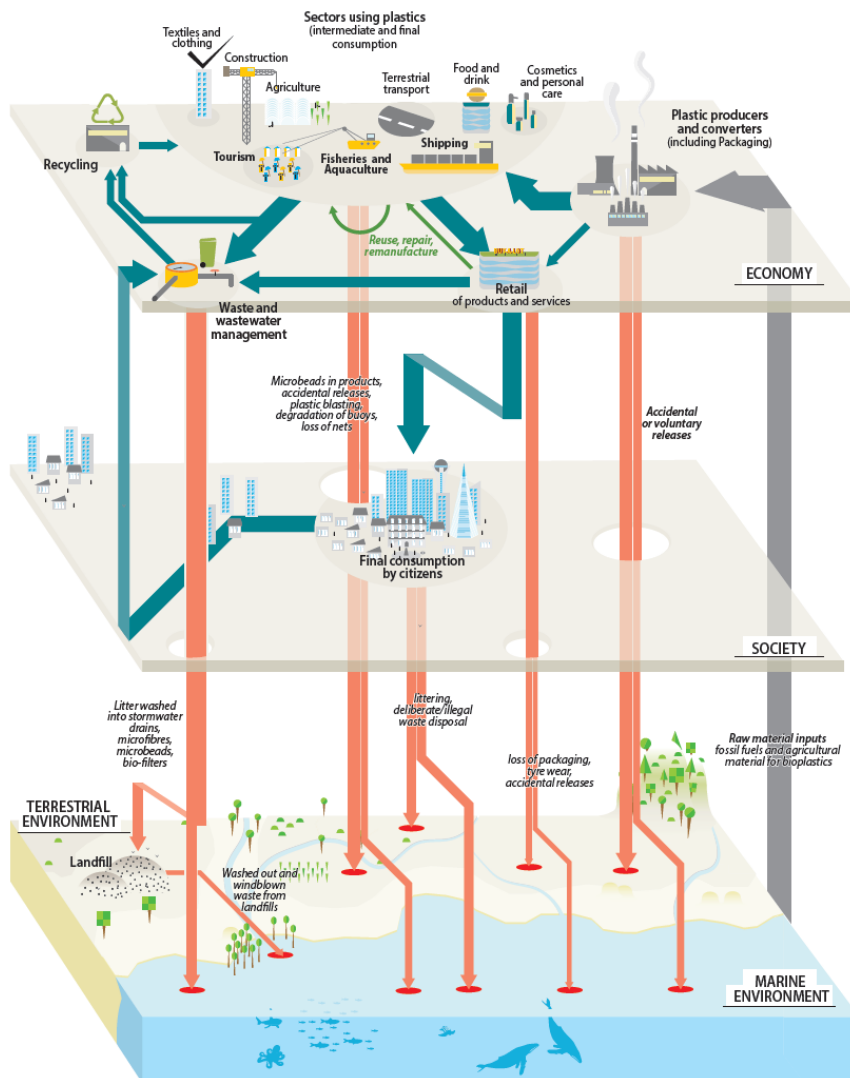


Figure 5. Présentation du parcours des déchets plastiques de la source à l'environnement marin. D'après GRID-Arendal & UNEP (2016).

c) Influence des déchets plastiques sur les sociétés humaines

A la différence de nombreux polluants chimiques, les débris plastiques font l'objet d'une attention particulière par les médias pour des raisons simples, ils proviennent de nos usages quotidiens, sont visibles, s'accumulent, et ont des répercussions sur plusieurs secteurs économiques (Gregory, 2009). Deux domaines sont principalement touchés par l'émission de déchets plastiques, le tourisme et la pêche/aquaculture (Newman et al., 2015). La principale perte économique est liée au nettoyage des côtes et/ou des infrastructures. En effet, la présence de débris sur les côtes diminue l'attrait touristique d'une région, influençant les économies locales (*e.g.* prix des hôtels et attractions) (Newman et al., 2015). Ainsi, pour ne pas subir une décroissance économique, les municipalités doivent nettoyer les plages et traiter les déchets, ce qui n'est pas négligeable et représente 19 millions d'euros par an pour le Royaume-Uni (Mouat et al., 2010). Concernant la pêche/aquaculture, des effets économiques sont principalement associés à la réparation du matériel endommagé par la présence de déchets et du nettoyage sur les sites d'exploitation ($\approx 156\ 000\ \text{€}\cdot\text{an}^{-1}$ en Ecosse) ou de la perte des ressources biologiques sous l'effet des débris (Mouat et al., 2010; Newman et al., 2015), sans compter une éventuelle dépréciation de la qualité perçue du produit. Par exemple, la présence de casiers de pêche abandonnés dans la mer des Salish (Etats-Unis) a fait diminuer de 4,7 % (586 000 €) la capture annuelle de crabes (Antonelis et al., 2011).

Malgré l'absence de données toxicologiques, l'usage abusif des plastiques alerte les scientifiques pour la santé humaine. Des particules plastiques sont retrouvées dans un grand nombre de produits alimentaires comme l'eau en bouteille (Mason et al., 2018), l'eau courante (Kosuth et al., 2018), le sel de table (Iñiguez et al., 2017; Karami et al., 2017; Kosuth et al., 2018), la bière (Kosuth et al., 2018), les conserves (Karami et al., 2018). Selon l'analyse de 159 échantillons d'eau courante, de 12 marques de bières et de 12 marques de sels de table, Kosuth et al. (2018) estiment que l'ingestion annuelle de particules plastiques à travers ces produits est de 5 800 *per capita*. De plus, à travers la contamination des produits de la mer, Van Cauwenberghe & Janssen (2014) ont estimé à 11 000 le nombre de particules plastiques ingérées annuellement par un gros consommateur européen de bivalves (72,1 g.jour⁻¹). Il existe également un risque d'ingestion par inhalation, notamment les microfibrilles synthétiques qui du fait de leur faible taille sont très volatiles et peuvent pénétrer facilement les voies respiratoires (Bergmann et al., 2019; Gasperi et al., 2018; Vianello et al., 2019). En

compilant les différentes voies possibles d'ingestion (*e.g.* nourriture, inhalation), un être humain consommerait entre 74 000 et 121 000 particules plastiques chaque année (Cox et al., 2019). Outre l'ingestion de particules, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) s'intéresse aux effets toxiques associés aux additifs incorporés dans les plastiques. En effet, les additifs représentent en moyenne 7 % de la masse d'un plastique (Geyer et al., 2017). Or, de nombreux plastiques sont directement en contact avec nos aliments (*e.g.* viandes, fromages, fruits et légumes, poissons) et les additifs pourraient migrer de l'emballage vers le produit (Qian et al., 2018). L'analyse de 120 emballages alimentaires a démontré la présence de plus de 100 composés chimiques dont 4 identifiés comme potentiellement dangereux (DEHA, DEHP, 2,4-DTBP, éthylène bis stéaramide) (Qian et al., 2018).

d) Nomenclature des débris plastiques

i. Critère de taille

Face à la diversité des plastiques qui s'accumulent et persistent dans les environnements terrestres et aquatiques, la communauté scientifique a classé et nommé ces débris selon un critère de taille. Ainsi, quatre terminologies sont utilisées : les macroplastiques (MaP), les mésoplastiques (MeP), les microplastiques (MP) et les nanoplastiques (NP) (GESAMP, 2015). Cependant, il n'y a pas encore de définitions clairement acceptées par l'intégralité de la communauté sur les limites de taille de ces quatre classes (GESAMP, 2015; Hartmann et al., 2019) (Figure 6). Dans un grand nombre de travaux, le terme « microplastique » réfère aux particules plastiques dont la taille est inférieure à 5 mm (Arthur et al., 2009) tandis que les termes méso- et macroplastiques sont utilisés pour des tailles supérieures plus disparates (Figure 6). Les limites de taille supérieure des NP sont aussi variables selon les disciplines/études considérées. Au moins trois définitions ont été proposées depuis 2014 pour les NP : (1) $< 20 \mu\text{m}$ en accord avec la taille utilisée pour définir le nanoplancton (Wagner et al., 2014) ; (2) 1 – 100 nm selon la définition des nanomatériaux (Koelmans et al., 2015; Mattsson et al., 2015a) ; (3) $< 1 \mu\text{m}$ du fait du changement radical de comportement des particules à l'échelle colloïdale (Gigault et al., 2018).

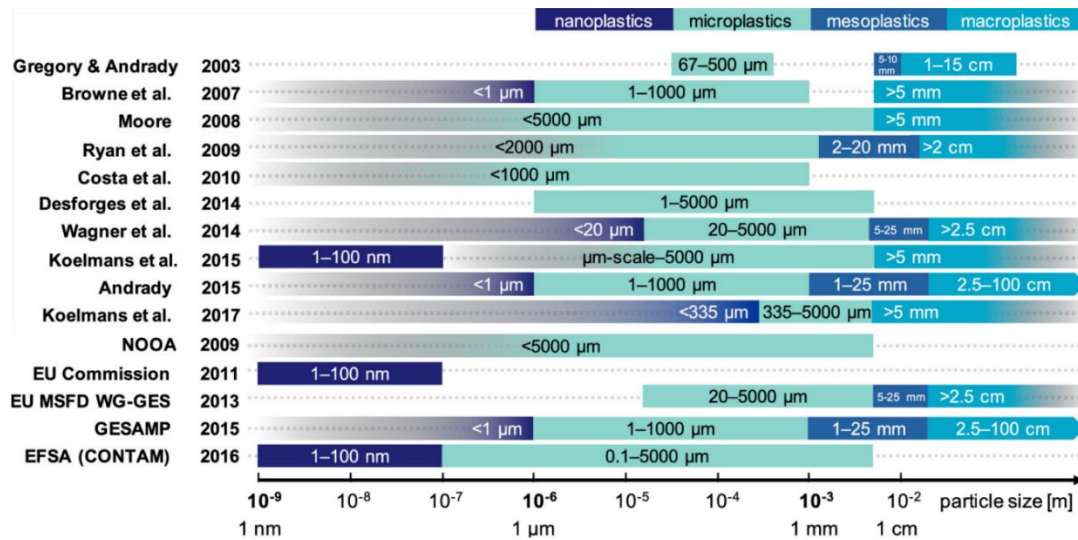


Figure 6. Exemples de terminologies proposées dans la littérature afin de définir les différentes classes des débris plastiques. D’après Hartmann et al. (2019).

Obtenir une définition claire et acceptée des différentes classes est essentielle pour plusieurs raisons. D’une part, sans standardisation des définitions les résultats scientifiques peuvent être difficilement comparables, mal-interprétés et/ou mal-communicés au sein même de la communauté scientifique. D’autre part, il est essentiel d’être précis sur les termes utilisés afin d’argumenter avec les décideurs pour entreprendre la mise en place de lois et de plans de gestion efficaces. Dans l’attente de l’adoption de définitions communes, le terme « microplastique » sera associé à l’ensemble des particules plastiques comprises entre 100 nm et 5 mm tandis que les « nanoplastiques » seront considérés comme les particules présentant au moins une dimension inférieure à 100 nm dans ce travail de thèse. Ce choix ne s’oppose pas aux autres définitions proposées (Wagner et al., 2014; Gigault et al., 2018) et se base sur les changements radicaux des propriétés et du comportement des particules à cette limite de taille (100 nm), qui favorisent les interactions avec les molécules biologiques et augmentent la dangerosité du composé (Klaine et al., 2012; Koelmans et al., 2015). D’un point de vue physiologique et toxicologique, des objets de part et d’autre de cette limite de taille entraînent en effet des mécanismes d’interactions et toxicité bien distincts (Jeong et al., 2016, 2017; Lee et al., 2013).

ii. Les micro- et nanoplastiques primaires et secondaires

ii.1 Les débris primaires

Les particules plastiques micro- et nanométriques produites et utilisées directement à ces tailles par les industries ainsi que les sous-produits issus de nos activités sont les micro- et nanoplastiques (MNP) primaires (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; Galloway et al., 2017; Hartmann et al., 2019; Paul-Pont et al., 2018).

Les débris primaires sont de forme et de taille hétérogènes. Parmi ces particules, on recense notamment les granulés de pré-production industriels (GPI) utilisés comme matière première par les plasturgistes. De plus, durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, l'industrie cosmétique a remplacé les exfoliants naturels (*e.g.* amandes, noyaux d'abricots) des produits cosmétiques (*e.g.* dentifrices, crèmes nettoyantes) par des microsphères et microfragments plastiques inférieur(e)s à 500 µm (Duis & Coors, 2016; Fendall & Sewell, 2009; Napper et al., 2015). En 2012, 6 % des produits cosmétiques européens contenaient des exfoliants plastiques (0,05-12 % de la masse du produit) (Duis & Coors, 2016). Récemment, des nanosphères de PE (18-66 nm) ont également été découvertes à l'intérieur de produits de beauté (trois types testés), avec une estimation de 3×10^{11} nanoparticules par gramme de crème (Hernandez et al., 2017). Pour des raisons évidentes (*e.g.* biocompatibilité, aseptisation aisée), les MNP sont également susceptibles d'être utilisés dans le domaine médical comme vecteurs médicamenteux (Ljubimova & Holler, 2012; Lusher et al., 2017a). Enfin, des plastiques primaires peuvent également être utilisés comme abrasifs industriels (Cole et al., 2011) et lubrifiants solides (*e.g.* nano-polytétrafluoroéthylène) pour limiter l'usure métallique en limitant les mécanismes de friction (Dubey et al., 2015, 2016). A ce jour, peu de données sont disponibles sur l'utilisation de NP primaires par les industries (et donc sur la quantité relarguée dans l'environnement).

Dans les sous-produits plastiques issus de nos usages, on retrouve les microfibres synthétiques utilisées dans le textile (un cycle de lavage peut produire plus de 1900 microfibres ; Browne et al., 2011), les résidus pneumatiques en caoutchouc (émission de 0,23-4,7 kg.an⁻¹.habitant⁻¹ en Norvège, Inde, Chine, Suède, Danemark, au Japon et aux Etats-Unis ; Kole et al., 2017), les résidus nanométriques d'impression 3D (émission de NP atteignant 2.10^{11} particules.min d'utilisation⁻¹; Stephens et al., 2013) ou les résidus provenant de la manutention des

matériaux plastiques (mise en suspension de 10^{12} particules.m⁻³ (<1 µm) lors de la découpe thermique de PS ; Zhang et al., 2012).

En dépit de l'amélioration des stations d'épuration (STEP ; > 90 % des MP retirés lors du traitement) (Carr et al., 2016; Magnusson et al., 2016; Magnusson & Norén, 2014; Murphy et al., 2016), la quantité de MP relargués dans l'environnement est importante en raison des volumes à traiter par les municipalités. Un passage journalier dans les eaux receveuses de 65.10^6 MP est observé malgré la rétention de 98,4 % des MP dans une STEP secondaire écossaise (population ≈ 650 000 habitants) (Murphy et al., 2016). En ce qui concerne les MNP piégés dans les boues d'épuration (0,06-0,43 Mt.an⁻¹ en Europe), ils sont incinérés ou majoritairement déversés dans le compartiment terrestre (Horton et al., 2017).

ii.2 Les débris secondaires

Dans l'environnement marin, des processus biotiques et abiotiques induisent un vieillissement puis une perte de l'intégrité des déchets plastiques (*i.e.* une diminution du poids moléculaire, changement de couleur, modification des propriétés de surface) menant à des processus d'érosion et de fragmentation jusqu'à des tailles micro- et nanométriques selon des données expérimentales (Andrady, 2011; Ekvall et al., 2019; Gewert et al., 2015; Gigault et al., 2016; Lambert & Wagner, 2016). Les particules issues de cette dégradation et fragmentation constituent les MNP secondaires (Andrady, 2011). Ces déchets secondaires représenteraient entre 97 et 99,9% de la contamination océanique (Hüffer et al., 2017).

Les rayonnements ultraviolets (UV) solaires et les mécanismes d'oxydation dans l'eau de mer sont les principales causes de la dégradation des polymères (Andrady, 2015). La photodégradation est composée de trois étapes : (i) initiation⁴ ; (ii) propagation⁵ ; (iii) finalisation⁶ (Andrady, 2011; Gewert et al., 2015). Suite à la photodégradation, d'autres mécanismes comme l'action des (micro-)organismes, des vagues/vents, de l'eau (hydrolyse) peuvent stimuler la fragmentation (GESAMP, 2015). En simulant expérimentalement ces actions mécaniques, les patrons de fragmentation mènent à des tailles nanométriques (Dawson et al., 2018 ; Ekvall et al., 2019 ; Gigault et al., 2016 ; Lambert & Wagner, 2016). Par

⁴ Scission des liaisons chimiques C-H du polymère sous l'effet de la lumière et production de radicaux libres.

⁵ Réactions entre les radicaux libres et l'oxygène engendrant la formation de radicaux peroxydés puis la scission des chaînes polymériques.

⁶ Obtention de produits inertes suite à la combinaison de deux radicaux.

exemple, après 56 jours à l'intérieur d'une chambre de vieillissement, une tasse en polystyrène a produit $1,26 \times 10^8$ particules (taille moyenne : 224 nm) (Lambert & Wagner, 2016).

La cinétique de dégradation va dépendre des conditions environnementales. Elle est plus rapide pour les plastiques déposés sur les plages que ceux présents en surface, dans la colonne d'eau ou au fond des océans (Andrady, 2011, 2015). Les faibles températures et teneurs en oxygène dans l'eau de mer ont tendance à ralentir les processus. De plus, en dessous de la couche euphotique, les vitesses de dégradation sont extrêmement lentes en raison de rayonnements UV inexistantes (Andrady, 2011; Ioakeimidis et al., 2016). Les schémas de dégradation peuvent également varier selon la forme/taille et les additifs (e.g. agents antioxydants) du déchet (Gewert et al., 2015; Ter Halle et al., 2016).

e) Les micro- et nanoplastiques dans les océans

i. Etat de la contamination en micro- et nanoplastiques

A l'échelle de l'océan ouvert, $15 - 51 \times 10^{12}$ débris plastiques flottent à la surface (van Sebille et al., 2015). Les particules inférieures à 5 mm représentent la très large majorité des débris (> 90 % du nombre d'items) (Eriksen et al., 2014). Les nombreuses données environnementales sur la contamination des eaux de surface et des sédiments par les MP sont compilées dans la base de données en accès libre « Litterbase » (<http://litterbase.awi.de/litter>). Un résumé non exhaustif de différentes concentrations environnementales en MP est disponible dans le Tableau 1. A ce jour, la glace de mer arctique est le milieu dans lequel la plus forte concentration en MP a été recensée avec $1,2 \times 10^7$ particules.m⁻³ pour des débris > 10 µm (Peeken et al., 2018). Selon de récentes prédictions, la quantité de MP dans la colonne d'eau pourrait dépasser 1000 mg.m⁻³ dans certaines régions océaniques (Asie du Sud-Est ; Pacifique Nord) à partir de 2060 (Isobe et al., 2019). Aucune donnée quantitative n'est disponible à ce jour pour la contamination en NP. Une seule étude suggère la présence de NP dans le Gyre subtropical de l'Atlantique Nord par la présence d'empreintes chimiques caractéristiques des polymères dans la fraction colloïdale (Ter Halle et al., 2017). Par conséquent la communauté scientifique n'a pas encore suffisamment de données pour avoir des certitudes sur l'origine, la formation et le comportement des NP océaniques. Dans la suite de cet état de l'art, les données sur les NP proviendront exclusivement de données expérimentales et/ou modélisées.

ii. Devenir des déchets plastiques dans les océans

L'analyse des échantillons de l'expédition MALASPINA (2010 ; 144 sites d'échantillonnage) a révélé une abondance des débris de petite taille (< 5 mm) largement inférieure aux prédictions (Cózar et al., 2014). En effet, les débris plastiques dans les eaux de surface de l'océan ouvert représentent seulement 1 % de la quantité de déchets déposés dans l'environnement marin en 2010 (4,8 – 12,7 Mt) sachant qu'entre 60 et 64 % atteignent l'océan ouvert (Jambeck et al., 2015; Lebreton et al., 2012; van Sebille et al., 2015). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la disparition de la quantité de plastiques des eaux de surface, combinant notamment nano-fragmentation, biofouling, sédimentation et interactions avec les réseaux trophiques (Figure 7). Ces processus restent à ce jour largement méconnus et peu documentés *in situ*.

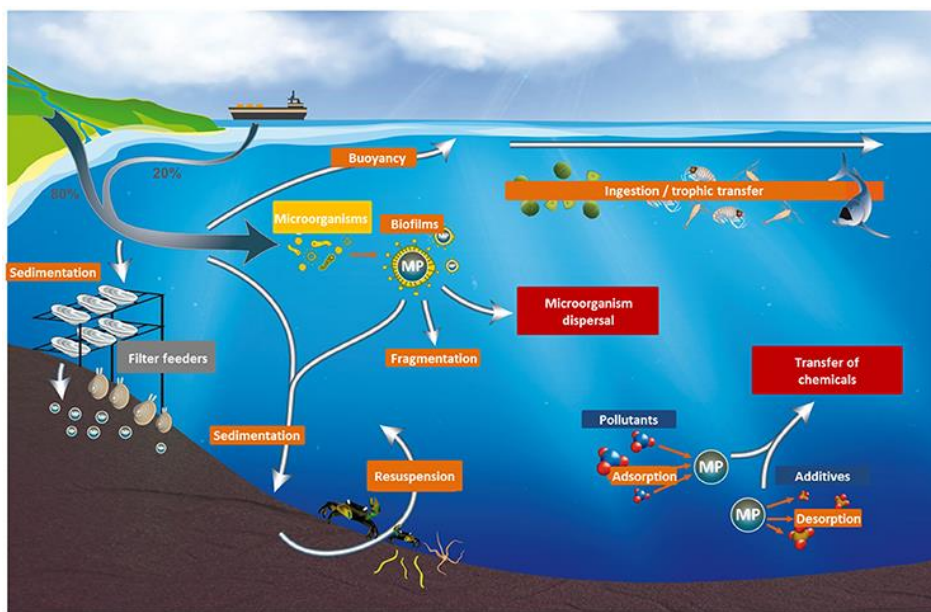


Figure 7. Devenir des microplastiques dans l'océan. D'après Paul-Pont et al. (2018).

Tableau 1. Exemples de concentrations environnementales en MP dans les eaux de surface, les sédiments et la glace de mer. Les données sont exprimées dans les unités originales et ont été transformées en concentration massique selon la méthode utilisée par Besseling et al. (2014) (profondeur de chalutage de 0,1 m et poids moyen d'un MP de 5 µg).

Compartiments	Sites d'étude	Concentrations en unités originales	Concentrations estimées (mg.L ⁻¹ pour les eaux de surface et mg.kg ⁻¹ pour le sédiment)	Tailles (µm)	Références
Eau de surface	Gyre Subtropical Pacifique Nord	3.10 ⁴ g.km ⁻²	0,0002	> 333 µm	Moore et al. (2001)
	Gyre Subtropical Pacifique Sud	3,69.10 ⁵ items.km ⁻²	0,0732	1 mm - 4,75 mm	Eriksen et al. (2013)
	Gyre Subtropical Pacifique Sud	9,69.10 ⁵ items.km ⁻²	0,511	1 mm - 4,75 mm	Eriksen et al. (2013)
	Californie (Etats-Unis)	0,009 g.m ⁻³	0,009	> 333 µm	Moore et al. (2002)
	Californie (Etats-Unis)	2,44 mg.m ⁻³	0,00244	> 333 µm	Lattin et al. (2004)
	Gyre Subtropical Pacifique Nord	0,209 mg.m ⁻³	0,0003	> 500 µm	Doyle et al. (2011)
	Méditerranée Nord-Ouest	2,28 mg.m ⁻²	0,0228	> 333 µm	Collignon et al. (2012)
	Gyre Subtropical Atlantique Nord	2,67 mg.m ⁻³	0,00267	> 150 µm	Reisser et al. (2015)
	Geojje Bay (Corée du Sud)	1,55.10 ⁴ items.m ⁻³	0,0778	> 333 µm	Kang et al. (2015)
	Côtes Suédoises	2,4.10 ³ items.m ⁻³	0,012	> 80 µm	Noren (2007)
	Côtes Européennes	501 items.m ⁻³	0,002505	10 - 1000 µm	Enders et al. (2015)
	Mer Adriatique	1,04.10 ⁴ g.km ⁻²	0,026081	> 700 µm	Suaria et al. (2016)
	Estuaire du Yangtze (Chine)	1,02.10 ⁴ items.m ⁻³	0,051	> 333 µm	Zhao et al. (2014)
	Pacifique Nord-Est	9,2.10 ³ items.m ⁻³	0,046	> 333 µm	Desforges et al. (2014)
	Côtes de Doha (Qatar)	3 items.m ⁻³	0,000015	> 120 µm	Castillo et al. (2016)
	Mer de Bohai (Chine)	1,23 items.m ⁻³	0,00000615	> 333 µm	Zhang et al. (2017)
	Rade de Brest (France)	0,24 items.m ⁻³	0,0000012	>333 µm	Frère et al. (2017)
	Svalbard (Norvège)	0,34 items.m ⁻³	0,0000017	> 333 µm	Lusher et al. (2015)
Sédiment	Belgique	390 items.kg ⁻¹	7,21	> 38 µm	Claessens et al. (2011)
	Arctique	6,6.10 ³ items.kg ⁻¹	32,975	1 - 275 µm	Bergmann et al (2017)
	Kalinigrad (Russie)	36,3 items.kg ⁻¹	0,1815	0,5 - 20 mm	Esiukova (2017)
	Lagune de Venise (Italy)	2,2.10 ³ items.kg ⁻¹	10,875	> 32 µm	Vianello et al. (2013)
	Mangrove (Singapour)	36,8 itemps.kg ⁻¹	0,184	1 µm - 5 mm	Nor & Obbard (2014)
	Floride (Etats-Unis)	116-215 itemps.L ⁻¹	0,58 - 1,075	250 µm - 4 mm	Graham & Thompson (2009)
	Rade de Brest (France)	0,97 itemps.kg ⁻¹	0,00485	> 333 µm	Frère et al. (2017)
Glace de mer	Arctique	1,2.10 ⁷ items.m ⁻³	60	> 10 µm	Peeken et al. (2018)

ii.1 Influence des propriétés des particules

Les polymères possèdent des densités variables (Tableau 2) qui vont influencer leur position originelle dans l'océan, du moins pour les particules micrométriques et les macro-déchets (Cole et al., 2011; Kooi et al., 2017). Les MP dont la taille est supérieure à 1 μm auront un comportement principalement gouverné par des processus de flottaison et de sédimentation (Klaine et al., 2008; Kooi et al., 2017; Rummel et al., 2017). Pour des MP équivalents en taille, la densité du polymère est le premier paramètre influençant son mouvement dans la colonne d'eau (Kooi et al., 2017). Ainsi, l'EPS (0,01 – 0,04 g/cm^3) a tendance à flotter alors que le PVC (1,16 – 1,58 g/cm^3) quitte rapidement la surface pour sédimenter vers le domaine benthique. Les particules nanométriques présentent un comportement naturellement différent, de nature colloïdale. Ceci expliquerait la présence de signaux chimiques associés à du PVC nanométrique dans les eaux de surface de Gyre Subtropical Atlantique Nord (Gigault et al., 2018; Ter Halle et al., 2017). Le mouvement brownien, *i.e* interactions avec les molécules d'eau, rend ainsi dynamique et aléatoire le comportement des NP. Les propriétés de surface des particules (*e.g.* charge, groupements chimiques associés) influencent également le comportement d'après des données expérimentales obtenues par l'utilisation de nano- et microsphères en polystyrène disponibles dans le commerce (Alimi et al., 2018; Badawy et al., 2010; Paul-Pont et al., 2018). Par exemple, en milieu contrôlé d'eau mer, des NP-COOH (50 nm ; charge -) forment instantanément des homoagrégats micrométriques (> 1 μm) qui vont sédimenter tandis que des NP-NH₂ (50 nm ; charge +) restent à une taille nanométrique (Della Torre et al., 2014; Wegner et al., 2012). Bien que l'analyse de MP collectés sur 47 plages différentes a révélé la présence d'une surface carboxylée en lien avec les processus d'oxydation que subissent les déchets dans l'environnement (Fotopoulou & Karapanagioti, 2012), de nouvelles études sont nécessaires pour évaluer l'évolution des propriétés de surface des MNP primaires à partir du dépôt dans l'environnement.

Tableau 2. Densité des principaux polymères retrouvés dans les océans. D'après Duis & Coors, 2016.

Polymères	Abréviations	Densités (g/cm ³)
Polyéthylène à faible densité	LDPE	0,89 - 0,93
Polyéthylène à haute densité	HDPE	0,94 - 0,98
Polypropylène	PP	0,83 - 0,92
Polyéthylène téréphtalate	PET	0,96 - 1,45
Polystyrène	PS	1,04 - 1,1
Polystyrène expansé	EPS	0,01 - 0,04
Polychlorure de vinyle	PVC	1,16 - 1,58
Polyamide	PA	1,02 - 1,16
Polyuréthane	PUR	1,2
Polyester	PES	1,24 - 2,3
Polytetrafluoroéthylène	PTFE	2,1 - 2,3
Polycarbonate	PC	1,20 - 1,22

ii.2 Implications du vieillissement dans l'environnement marin

Hormis l'influence des caractéristiques intrinsèques des particules (*e.g.* taille, polymère, propriétés de surface), une fois dans l'environnement les MNP subissent un vieillissement, terme utilisé pour englober tous les changements dans les propriétés des polymères au cours d'une période de temps donnée (White, 2006). Parmi ces changements, on peut retrouver une modification de la surface (Ter Halle et al., 2016), une colonisation par des micro-organismes (Rummel et al., 2017; Zettler et al., 2013), une adsorption de polluants (Chen et al., 2018a; Rochman et al., 2013) et métaux (Prunier et al., 2019; Rochman et al., 2014), un relargage des additifs et la fragmentation du déchet (Gewert et al., 2015).

Interactions macromoléculaires

La première étape du vieillissement est l'ensemble des interactions macromoléculaires entre MNP et composés présents dans le milieu environnant (*e.g.* matière organique, polluants organiques persistants [POPs], métaux, polysaccharides) (Galloway et al., 2017; Paul-Pont et al., 2018). Ces interactions modifient le revêtement de la particule, créant une enveloppe appelée « eco-corona ». Ce nouveau revêtement est formé de deux couches distinctes, la corona « résistante » composée de macromolécules à forte affinité avec la particule et la corona « douce » composée de macromolécules à faible affinité qui sont facilement échangées avec le milieu environnant (Galloway et al., 2017). Hormis l'importance du milieu considéré, la nature de la corona est hautement dépendante des propriétés de surface de la particule (*e.g.* taille, groupements de surface) (Lundqvist et al., 2008). Le rapport

surface/volume élevé des NP améliore leur réactivité en comparaison avec les MP (Galloway et al., 2017; Klaine et al., 2008). Ainsi, l'influence théorique de la corona devrait augmenter en descendant dans la taille de débris (Hüffer et al., 2017; Lowry et al., 2012). Il est à noter que les NP peuvent ainsi accumuler une plus grande quantité de POPs que les MP pour une même masse (Velzeboer et al., 2014). Durant la suite des processus de vieillissement, la composition de la corona pourrait influencer les interactions de la particule avec l'environnement qui l'entoure, notamment les communautés microbiennes (Galloway et al., 2017).

Formation d'un biofilm et hétéro-agrégation

Aucune information n'est encore disponible sur les interactions entre NP et micro-organismes, mais de récentes études ont démontré la présence d'assemblages spécifiques de micro-organismes associés aux MP (e.g. bactéries, microalgues, protozoaires, champignons), distincts de ceux présents dans le milieu environnant (De Tender et al., 2015, 2017; Frère et al., 2018; McCormick et al., 2014). Ces communautés spécifiques forment la "plastisphère" (Zettler et al., 2013). Le biofilm présent sur les MP a des conséquences physico-chimiques (i.e. augmentation de la densité) et influence le devenir et la biodisponibilité des débris (Rummel et al., 2017). Ainsi des particules de PE ou PP peuvent quitter la surface des océans suite à l'installation d'un biofilm (Rummel et al., 2017). La vitesse de formation du biofilm est dépendante de la taille des particules, i.e. les grandes particules (10 μm) présentent des fréquences de collision avec les microalgues plus élevées que les petites particules (1 μm), ce qui augmente plus rapidement la densité de la particule (Kooi et al., 2017). Le modèle théorique développé par Kooi et al. (2017), tenant compte de la formation d'un biofilm, montre un ralentissement dans les vitesses de sédimentation lorsque la taille des particules diminue (de 10 μm à 1 μm). Selon ce modèle, une particule de PVC ou de PS (1 μm) mettrait respectivement 278 et 4317 ans pour descendre 4000 m alors qu'une particule de 100 μm aurait besoin de 10 (PVC) et 159 (PS) jours. Cependant, les matrices exo-polysaccharidiques issues du biofilm permettraient aux MNP d'atteindre les fonds océaniques plus rapidement car elles favoriseraient l'intégration des MNP à l'intérieur d'agrégats marins composés de microalgues, de matières organiques ou encore de détritiques comme cela a été démontré en laboratoire pour les MP (Long et al., 2015, 2017; Michels et al., 2018; Porter et al., 2018) et NP (Ward & Kach, 2009). *In situ*, 70 % des agrégats marins étaient contaminés en MP ($1290 \pm 1510 \text{ MP}\cdot\text{m}^{-3}$; 90 % < 1000 μm) lors de prélèvements à Avery Point (Connecticut, Etats-Unis)

(Zhao et al., 2018). Cette hétéro-agrégation provoquerait des mouvements verticaux des MNP vers les zones profondes avec sédimentation sur les fonds benthiques comme le suggère la corrélation positive entre concentration en chlorophylle *a* et quantité de MP au niveau de la station benthique HAUSGARTEN située en Arctique (Bergmann et al., 2017). De plus, l'incorporation des particules à l'intérieur des pelotes fécales des copépodes ou des salpes est également un vecteur de transport vertical (Cole et al., 2016; Coppock et al., 2019; Wieczorek et al., 2019). Ainsi, les habitats benthiques peuvent être des zones d'accumulation de débris. Dans les sédiments d'une zone hadale dans la fosse des Mariannes, entre 200 et 2000 items.L⁻¹ (MP > 20 µm) ont été observés (Peng et al., 2018). Cependant, lors du transfert vertical, des communautés de micro-organismes peuvent théoriquement dégrader le biofilm pour reminéraliser la matière organique. Cela stimulerait ainsi la remontée de MP par la récupération de leur densité originelle alors que les NP seraient moins affectés par cette dégradation du biofilm en raison de leur comportement colloïdal (Hüffer et al., 2017; Rummel et al., 2017). Des turbulences dans la colonne d'eau (*e.g.* courants, processus géologiques, actions des organismes marins) pourraient également resuspendre les particules qui ont sédimenté (Paul-Pont et al., 2018).

Fragmentation et relargage d'additifs

L'étape la plus longue (plusieurs décennies/siècles) du vieillissement est le processus de fragmentation (*cf. partie 2.d.ii*). Il est à noter que la présence d'un biofilm peut ralentir les processus de dégradation (Rummel et al., 2017). Simultanément durant la dégradation du composé, les additifs – potentiellement toxiques – ajoutés à la fabrication peuvent être relargués dans l'environnement (Gewert et al., 2015; Hermabessiere et al., 2017). A titre d'exemple, le vieillissement de sacs en PE et de câbles en PVC dans de l'eau de mer naturelle pendant 90 jours en laboratoire a mis en évidence le relargage de phtalates, un des principaux groupes d'additifs, allant jusqu'à 120 ± 18 et 69 ± 10 ng.g de plastique⁻¹ respectivement (Paluselli et al., 2018).

iii. La caractérisation des quantités de NP dans les océans : un challenge analytique

Dans la majorité de la littérature, le seuil de détection des débris plastiques est de 330 µm qui correspond à la maille des filets Manta ou Neuston communément utilisés pour déterminer la quantité de débris à la surface des océans (*e.g.* Paul-Pont et al., 2018). Or, une récente étude a démontré que l'augmentation de l'abondance en MP suivait une loi de puissance 2,2 entre

1 mm et 30 μm (Erni-Cassola et al., 2017). En outre, que ce soit dans les organismes (*e.g.* moule; Phuong et al., 2018), la glace de mer (Peeken et al., 2018), le sédiment (Bergmann et al., 2017) ou la colonne d'eau (Enders et al., 2015), les petits MP (10-100 μm) représentent plus de 70 % de l'abondance. Si l'on applique la loi de puissance calculée par Erni-Cassola et al. (2017) aux données de Dubaish & Liebezeit (2013) de $1,7 \cdot 10^6$ items. m^{-3} ($> 80 \mu\text{m}$), on obtient approximativement 1000 items. mL^{-1} pour des particules centrées autour de 4 μm (Paul-Pont et al., 2018). Du fait de ces résultats et de la fragmentation continue des déchets plastiques jusqu'à la taille nanométrique, des niveaux élevés de contamination par les NP sont attendus (GESAMP, 2015; Wagner & Reemtsma, 2019).

A ce jour, la détection et la quantification des NP est un challenge analytique pour la communauté (Gigault et al., 2018; Huvet et al., 2016; Mintenig et al., 2018). Le premier verrou réside dans la collecte d'échantillons. Pour les sédiments, la récolte de débris à l'aide d'engins posés ou de dragues similairement aux MP pourrait être applicable aux NP. En revanche, les techniques d'échantillonnage basées sur l'utilisation des filets (*e.g.* Manta, Neuston) afin d'étudier la contamination de surface ne permettent pas la récolte de NP. Il est donc impossible de récupérer les débris de plusieurs mètres cubes d'eau de mer dans un volume restreint. La récolte des colloïdes peut se faire comme décrit par Ter Halle et al. (2017) en immergeant des bouteilles en verre dans l'eau de mer. Une fois au laboratoire, il est inévitable de réduire le volume d'eau prélevé pour diminuer le temps de manipulation qui peut être une source de contaminations extérieures. Récemment, Mintenig et al. (2018) ont proposé l'utilisation d'ultrafiltration tangentielle (séparation des particules d'un liquide par leur taille) afin de concentrer les NP provenant du milieu naturel. Par cette technique, ils ont concentré 635 L en seulement 0,4 L. Dans le cadre de l'expédition 7^{ème} Continent, Ter Halle et al. (2017) ont pour leur part filtré dans un premier temps les échantillons de colloïdes (1L) sur un filtre de 1,2 μm puis ont réalisé une ultrafiltration afin de diminuer le volume à 10 ± 2 mL. Hormis le gain de temps expérimental de cette ultrafiltration, cette étape est nécessaire car sans elle, les colloïdes ne peuvent être détectés en raison de leur forte dilution dans l'eau de mer (Ter Halle et al., 2017).

Le second verrou concerne l'élimination des matrices environnementales qui peuvent être extrêmement riches en matière organique ou inorganique (*e.g.* sédiment). Les méthodes utilisées pour les MP, bien que pas encore adaptées pour toutes les matrices, pourraient être

optimisées pour les NP (Bouwmeester et al., 2015; Mintenig et al., 2018). Classiquement, la purification des échantillons de MP est basée sur des réactions enzymatiques (*e.g.* protéinase K, chitinase, protéase, trypsine, cellulase) ou alcaline (*e.g.* NaOH, H₂O₂, KOH), couplées ou non à des méthodes de séparation par densité (*e.g.* NaCl, NaI, ZnCl₂, Tungstate) (Cole et al., 2015a ; Courtene-Jones et al., 2017; Dehaut et al., 2016; Foekema et al., 2013; Frère et al., 2017; Hidalgo-Ruz et al., 2012; Löder et al., 2017; Van Cauwenberghe et al., 2015).

Enfin, le troisième verrou majeur réside dans la détection et la validation du polymère à l'échelle nanométrique. Habituellement, les spectroscopies Raman ou à infrarouge (FTIR) sont utilisées en laboratoire pour permettre l'identification chimique des polymères ou encore leur état de vieillissement (*e.g.* indice carbonyle). Néanmoins, les seuils de détection (en théorie, 500 nm pour Raman et 1 µm pour FTIR) ne sont pas en adéquation avec l'analyse des NP (Löder et al., 2017; Mintenig et al., 2018; Primpke et al., 2017). Ainsi, l'optimisation de méthodes utilisées pour la caractérisation des colloïdes ou le développement de nouvelles techniques sont en cours de développement pour permettre d'accéder aux NP environnementaux (Gigault et al., 2017; Gillibert et al., 2019; Mintenig et al., 2018; Schwaferts et al., 2019; Ter Halle et al., 2017). Par exemple dans la seule étude publiée à ce jour sur la caractérisation de NP dans l'environnement, Ter Halle et al. (2017) ont utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la pyrolyse couplée à la spectrométrie de masse (Pyr-GC-MS) pour l'identification de leur fraction colloïdale. La DLS a permis de caractériser la présence de colloïdes dans plusieurs échantillons avec une taille polydisperse (1 à 1000 nm) tandis que la Pyr-GC-MS a permis de détecter la présence de NP de différentes natures (PET, PVC, PS). Cependant, les techniques utilisées par Ter Halle et al. (2017) ne permettent pas de caractériser ni de visualiser la quantité de NP dans l'océan mais plutôt d'identifier une présence/absence et une abondance relative en fonction des autres empruntes chimiques associées à des NP.

3) LES RISQUES DES DEBRIS PLASTIQUES POUR LA BIOSPHERE

a) Risques écosystémiques

i. Transport d'espèces invasives et nuisibles

Les débris plastiques se déplacent dans les océans et peuvent abriter une communauté d'organismes à leur surface (*e.g.* micro-organismes, larves de bivalves/gastéropodes) (Avio et al., 2016; Kiessling et al., 2015). Certains des organismes associés aux plastiques peuvent être nuisibles pour la biodiversité marine, par exemple des algues toxiques (Masó et al., 2003) ou bactéries (Frère et al., 2018; Zettler et al., 2013). Les débris pourraient ainsi influencer la dissémination d'agents pathogènes et l'émergence de maladies comme le suggère l'augmentation de 85 % de la probabilité de maladies coralliennes dans les récifs d'Asie du Sud-Est contaminés par les déchets plastiques (Lamb et al., 2018). De plus, une étude récente suggère que les débris plastiques pourraient contribuer à la propagation de résistances multiples aux antibiotiques *via* les bactéries associées à leur surface (Laganà et al., 2019).

Les débris plastiques étant extrêmement persistants dans l'environnement, leur transfert sur de longues échelles d'espace et de temps peut également servir de vecteur pour la dissémination, l'installation et la prolifération d'espèces exotiques et invasives dans de nouvelles régions (Gregory, 2009; Sheavly & Register, 2007). Sur 22 sites d'échantillonnage disposés le long des côtes nord-espagnoles, 17 espèces ont été identifiées sur des déchets plastiques dont 3 espèces considérées comme invasives (*Austrominius modestus*, *Crassostrea gigas*, *Amphibalanus amphitrite*) (Miralles et al., 2018). Globalement, les débris anthropiques multiplient par deux les opportunités d'invasion, en particulier dans les hautes latitudes (Barnes, 2002). Certains événements particuliers peuvent amplifier le transport d'espèces *via* les plastiques comme l'atteste l'introduction de 289 espèces japonaises sur la côte ouest des Etats-Unis *via* les débris majoritairement plastiques émis suite au tremblement de terre japonais de 2011 (Carlton et al., 2017). Ce transport d'espèces concerne les MaP, MeP et MP mais pas les NP en raison de leur taille. L'apport d'espèces exotiques pouvant potentiellement devenir invasives est à surveiller car ces espèces perturbent le fonctionnement des communautés et menacent donc à la fois les équilibres écologiques et les services écosystémiques marins. Une diminution de 1-5 % (500-2 500 milliards de dollars) des services

écosystémiques « livrés » aux sociétés humaines est estimée pour l'année 2011 sous l'effet de la présence de déchets plastiques dans les océans (Beaumont et al., 2019).

ii. Interactions avec les cycles biogéochimiques

La nature ubiquitaire et les fortes concentrations dans certaines zones océaniques des MP (et potentiellement des NP) pourraient favoriser des interactions avec les cycles biogéochimiques (Galloway et al., 2017). Il est à noter que pour évaluer les risques des petits débris plastiques (MP < 100 µm et NP) sur les cycles biogéochimiques et sur la biodiversité marine de manière générale, la communauté scientifique fait face à la méconnaissance des concentrations environnementales et des caractéristiques physico-chimiques de ces débris. Ainsi, dans l'attente de ces données, de nombreux effets sont anticipés *via* l'utilisation de micro- et nanosphères « modèles » disponibles dans le commerce et de doses (nombre de particules) très largement supérieures aux concentrations environnementales connues pour les MP > 330 µm.

Les espèces phytoplanctoniques sont des producteurs primaires et donc à la base des réseaux trophiques. Bien qu'aucun effet des MP, à notre connaissance, n'ait été démontré sur différents paramètres physiologiques (*e.g.* croissance, photosynthèse, viabilité) de plusieurs espèces phytoplanctoniques en conditions de laboratoire (Davarpanah & Guilhermino, 2015; Long et al., 2017; Sjollem et al., 2016), de récentes études ont observé un effet toxique des NP sur la croissance et la photosynthèse de micro-algues dulcicoles et marines (Besseling et al., 2014; Bhattacharya et al., 2010; González-Fernández et al., 2019). Le ratio surface/volume élevé de NP augmente la réactivité des particules et favorise les interactions avec les cellules phytoplanctoniques et les tissus biologiques de façon générale. Ainsi, leur taille nanométrique favorise la création de lésions, d'inflammations, de stress oxydatifs menant à la perturbation physiologique des cellules (Fu et al., 2014; Klaine et al., 2012; Koelmans et al., 2015; Mattsson et al., 2015a).

L'interaction des MNP avec les agrégats marins est paradoxale. Tandis que l'hétéro-agrégation favorise la sédimentation des particules plastiques, l'incorporation de MP à l'intérieur des agrégats modifie la vitesse du transport vertical de ces derniers selon leur composition et la nature du polymère (Long et al., 2015; Porter et al., 2018). Par exemple, l'incorporation de microsphères de PS (2 µm) diminue la vitesse de sédimentation des agrégats de *Chaetoceros neogracile* (-65 %) mais augmente celle des agrégats de *Rhodomonas salina* (+60 %) (Long et

al., 2015). De plus, l'excrétion de microsphères de PS par le copépode *Calanus helgolandicus* à l'intérieur de pelotes fécales diminue de 2,25 fois la vitesse de sédimentation de ces dernières (Cole et al., 2016). Des résultats similaires ont été relevés dans les vitesses de sédimentation des pelotes fécales produites par les salpes lors d'une incorporation de particules de PE et de PS avec une réduction par 1,35 et 1,47, respectivement (Wieczorek et al., 2019). Les MNP (dont l'incorporation dans les agrégats a déjà été validée *in situ* pour les MP (Zhao et al., 2018) et expérimentalement pour les NP (Ward & Kach (2009)) pourraient ainsi affecter le cycle du carbone, car les agrégats marins et matières fécales remplissent un rôle essentiel dans la pompe biologique de carbone, *i.e.* l'export de carbone vers l'océan profond (Turner, 2015). Par exemple, si la présence de débris diminue la vitesse de sédimentation des agrégats/pelotes fécales, leur dégradation par les communautés bactériennes dans la zone euphotique des océans empêchera l'enrichissement en carbone des zones profondes (Wieczorek et al., 2019). De plus, la présence de NP pourrait modifier les assemblages de matières organiques comme suggéré en laboratoire, appuyant une implication potentielle des déchets plastiques dans le cycle du carbone océanique (Chen et al., 2018b).

L'interface eau/sédiment remplit des fonctions essentielles dans la minéralisation de la matière organique et les cycles des nutriments. L'incorporation de divers polymères (PA, PE, PES) dans un sol argileux en laboratoire a induit des modifications majeures de sa structure et de ces fonctions : capacité de rétention d'eau, densité, activité microbienne (De Souza Machado et al., 2018b). De plus, l'ajout de MP dans le sable augmente la perméabilité du sédiment (Carson et al., 2011). Egalement, les particules plastiques pourraient affecter la bioturbation, processus essentiel dans le remaniement des sédiments et donc les flux de nutriments (Galloway et al., 2017). L'exposition en laboratoire d'une espèce bioturbatrice (*Arenicola salina*) aux MP suggère une diminution dans le brassage du sédiment ($\approx 130 \text{ m}^3 \cdot \text{ans}^{-1}$) et dans la surface disponible pour les échanges à cette interface (10-16 %) (Green et al., 2016a; Wright et al., 2013a).

iii. Impacts potentiels sur les communautés

Les impacts des débris plastiques dans la littérature sont focalisés principalement sur des effets spécifiques à l'échelle individuelle (voir partie 3.b). Des effets sur le fonctionnement des communautés marines sont attendus mais pas encore caractérisés mis-à-part quelques

études fondatrices réalisées en laboratoire ou certaines hypothèses provenant d'observations obtenues sur le terrain (Rochman et al., 2015). Par exemple, il a été montré que la présence de MP dans le sable peut affecter la régulation thermique des sédiments, suggérant de possibles effets sur les organismes benthiques ou encore des effets potentiels sur les organismes utilisant le sable comme lieu de ponte (*e.g.* tortues) (Carson et al., 2011). En laboratoire, de longues expositions aux MP à l'aide de mésocosmes ont démontré des effets directs sur un écosystème par la perturbation des espèces ingénieuses (*e.g.* modification du taux de filtration des bivalves filtreurs) et des effets en cascade sur différents compartiments comme par exemple la dysrégulation des biomasses algales, de la diversité dans la communauté (*e.g.* microfaune, cyanobactéries) et dans les flux de nutriments à l'interface eau/sédiment (Green, 2016; Green et al., 2016a, 2016b).

b) Impacts des débris plastiques sur les organismes marins

i. Etranglement

En 2015, le nombre d'espèces marines interagissant avec des débris plastiques était de 663 (Avio et al., 2016; Gall & Thompson, 2015). Les débris peuvent piéger les organismes marins et par étranglement ils peuvent les blesser jusqu'à la mort dans le cas le plus extrême (Gall & Thompson, 2015; Gregory, 2009). Les étranglements et blessures sont reportées dans la littérature principalement suite aux interactions entre les macro-déchets (*e.g.* outils de pêche abandonnés) et les poissons, tortues, oiseaux et mammifères marins (Gregory, 2009; Laist, 1997).

ii. Ingestion et devenir de particules ingérées

La présence de débris ingérés a été reportée dans la quasi-totalité des niveaux trophiques : zooplanctons (Desforges et al., 2015; Sun et al., 2018), mollusques (Davidson & Dudas, 2016; Li et al., 2015; Van Cauwenberghe & Janssen, 2014), annélides (Van Cauwenberghe et al., 2015), poissons (Foekema et al., 2013; Lusher et al., 2013), tortues marines (Duncan et al., 2018), oiseaux marins (Van Franeker et al., 2011) et mammifères marins (Fossi et al., 2012, 2014; Nelms et al., 2019). La répartition mondiale et l'accumulation des débris engendrent une ingestion massive des plastiques comme l'atteste la présence d'un déchet plastique (au minimum) à l'intérieur de 66 % des mammifères marins, 50 % des oiseaux marins et 100 % des tortues marines analysées (Duncan et al., 2018; Rochman et al., 2015). Au sens strict du terme, l'ingestion réfère à la prise de particules plastiques par la voie orale, cependant, on peut

ajouter à cette définition l'absorption par les voies respiratoires (*e.g.* branchies) (Watts et al., 2014). Aucune donnée n'est disponible sur l'ingestion *in situ* de NP à ce jour du fait des problèmes analytiques déjà évoqués dans la partie 2.e.iii.

ii.1 Les facteurs influençant l'ingestion

La probabilité d'ingestion des MNP est dépendante du mode de nutrition (*e.g.* déposivore, suspensivore), du stade de développement de l'organisme, du diamètre de l'orifice buccale et de la taille des particules préférentiellement ingérées par les organismes selon la présence ou non de filtres de sélection (Cole et al., 2013; Cole & Galloway, 2015; Scherer et al., 2017; Sussarellu et al., 2016). Par exemple, au cours du développement larvaire de l'huître *Crassostrea gigas*, la taille des particules plastiques ingérées va évoluer en fonction de la taille de la bouche (100 % des larves montrent une ingestion de PS-160 nm vs 0 % de PS-10 µm à 4 jours de développement ; 20 % de PS-160 nm vs 80 % de PS-10 µm à 24 jours de développement) (Cole & Galloway, 2015). Les caractéristiques des particules (*e.g.* forme, présence d'un biofilm, groupements chimiques de surface) peuvent également modifier la probabilité d'ingestion (Cole & Galloway, 2015; Gray & Wenstein, 2017; Procter et al., 2019; Savoca et al., 2016). Par exemple, Gray & Wenstein (2017) ont observé une ingestion significativement supérieure de microfragments en comparaison de microsphères et microfibrilles chez le crustacé *Palaemonetes pugio*.

ii.2 Devenir des MNP ingérés

Le devenir des particules plastiques dans un individu va déterminer les possibles effets toxiques. L'objectif pour l'animal est de rapidement se débarrasser des MNP ingérés car ils ne représentent en aucun cas un apport d'éléments essentiels. Après ingestion, les MNP peuvent soit obstruer le système digestif (Wright et al., 2013b), soit simplement y transiter (principale voie observée en laboratoire, *e.g.* Mazurais et al., 2015), soit pour les plus petites particules, passer au travers des membranes digestives et migrer dans le système circulatoire voir dans d'autres organes (Al-Sid-Cheick et al., 2018; Mattsson et al., 2017). Les MNP non rejetés *via* les fécès pourraient être transférés le long de la chaîne trophique comme démontré expérimentalement (Farrell & Nelson, 2013; Setälä et al., 2014).

Transit des particules et accumulation

L'ingestion de MNP en laboratoire a été observée à de nombreuses reprises à l'aide de coupes histologiques ou de l'utilisation de sphères fluorescentes sur une large gamme de taxons : zooplanctons (Cole et al., 2013, 2019), bivalves (Browne et al., 2008; Paul-Pont et al., 2016; Von Moos et al., 2012), crustacés (Batel et al., 2016; Watts et al., 2014) par exemple. Malgré l'arrêt de l'exposition, les MP peuvent perdurer pendant plusieurs jours au sein de l'organisme sans être excrétés, ce qui augmente le risque d'une obstruction du tractus digestif, d'une modification de la prise alimentaire et d'inflammations (Wright et al., 2013b). Ainsi, dans le crabe *Carcinus maenas*, Watts et al. (2014) ont observé la présence de MP 14 jours après la fin de l'exposition. La forme des particules va également moduler le temps de rétention (Frydkjær et al., 2017; Gray & Weinstein, 2017). La forme lisse et parfaitement sphérique des MNP provenant du commerce facilite le transit rapide à l'intérieur du système digestif des organismes (Mazurais et al., 2015). Ainsi, après 24h de dépuration, 99 % des daphnies exposées à des microsphères présentaient une excrétion complète des MP contre seulement 1 % des daphnies exposées aux microfragments (Frydkjær et al., 2017).

Translocation

La translocation correspond au passage de micro- et nanoparticules à travers les épithéliums d'un organisme vers le système circulatoire et les différents organes et tissus par franchissement des différentes membranes (Paul-Pont et al., 2018). Expérimentalement, la translocation de microsphères de PS a été observée dans le système circulatoire et lysosomale de bivalves (Browne et al., 2008; Pittura et al., 2018; Von Moos et al., 2012), dans le foie du poisson zèbre *Danio rerio* (Lu et al., 2016) ou encore dans l'hépatopancréas de crabes (Brennecke et al., 2015; Farrell & Nelson, 2013). Cependant, notre récente review (Paul-Pont et al., 2018) appelle à l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires pour valider clairement une translocation et la non-contamination de l'échantillon. Par exemple, la visualisation de MP à l'intérieur de l'hémolymphe de bivalves se fait par le prélèvement de cette dernière à l'aide d'une seringue à travers le manteau alors qu'il est reconnu que les MP peuvent adhérer et s'accumuler sur les organes extérieurs (*e.g.* manteau, pied) (Kolandhasamy et al., 2018) ou s'accumuler dans l'eau intervalvaire (C. Lambert pers. comm.).

Théoriquement, l'efficacité de la translocation dépend principalement de la taille des particules. Sans dommages préalables du tractus digestif, le risque d'un passage de MP à travers l'épithélium du tractus digestif des organismes marins est faible (*e.g.* poissons; Lusher et al., 2017a). Aucun effet physiologique sur l'intestin de la truite arc-en-ciel (*e.g.* perméabilité, transport d'ions et acides aminés) n'a été mis en évidence après 4 semaines d'exposition (PS ; 100-400 μm) (Ašmonaitė et al., 2018). L'utilisation de MP dans des études médicales a démontré le faible rendement de translocation (RT < 0,05%) des particules < 5 μm alors que ce RT était de 0,2-10 % pour les NP (Bouwmeester et al., 2015). Le RT des NP est également dépendant de leur taille comme observé sur des cellules intestinales (Caco-2) avec un RT atteignant 7,8 % pour des particules de 50 nm (PS) et 0,8 % pour les particules de 100 nm (PS) (Walczak et al., 2015). Lorsque la taille diminue, le rapport surface : volume et la réactivité des particules augmentent, facilitant les interactions membranaires et le passage des barrières (Galloway et al., 2017; Klaine et al., 2012; Rossi et al., 2014). Selon les propriétés de surface, les capacités des NP à passer les barrières évoluent. En effet, les interactions membranaires sont facilitées pour les particules chargées positivement en raison de processus d'attraction avec les résidus membranaires chargés négativement (Cho et al., 2009). Par exemple, des nanosphères de polystyrène (50 et 100 nm) chargées positivement (-NH₂) présentent un taux supérieur d'internalisation à l'intérieur de cellules mammaliennes par rapport à des particules chargées négativement (-COOH) (Bannunah et al., 2014). Trois types de mécanismes de passage peuvent être impliqués : endocytose, phagocytose et par l'échange passif des membranes (Gustafson et al., 2015; Noventa et al., 2018).

Dans le domaine marin, la translocation de NP a été observée expérimentalement chez plusieurs espèces de poissons (Mattsson et al., 2017; Pitt et al., 2018a; van Pomeran et al., 2017), la coquille Saint-Jacques (Al-Sid-Cheikh et al., 2018) et la daphnie (Brun et al., 2017; Cui et al., 2017) (Figure 8). Le passage potentiel de MP (< 10 μm) et NP pourrait être favorisé ou réduit selon la nature chimique de l'éco- ou de la bio-corona *via* des mécanismes de reconnaissance membranaire (Canesi & Corsi, 2015; Galloway et al., 2017; Monopoli et al., 2011; Paul-Pont et al., 2018). Dans le cas d'une translocation, le temps de rétention augmenterait et le rejet des particules s'avérerait être difficile. Ainsi, selon leurs données expérimentales, Al-Sid-Cheick et al. (2018) estiment la bioaccumulation annuelle de NP (24

nm) par *Pecten maximus* à 123 ng NP.g⁻¹, 12 µg NP.g⁻¹ et 1,8 mg NP.g⁻¹ pour une concentration constante de 1 pg.L⁻¹, 100 ng.L⁻¹ et 15 µg.L⁻¹ respectivement.

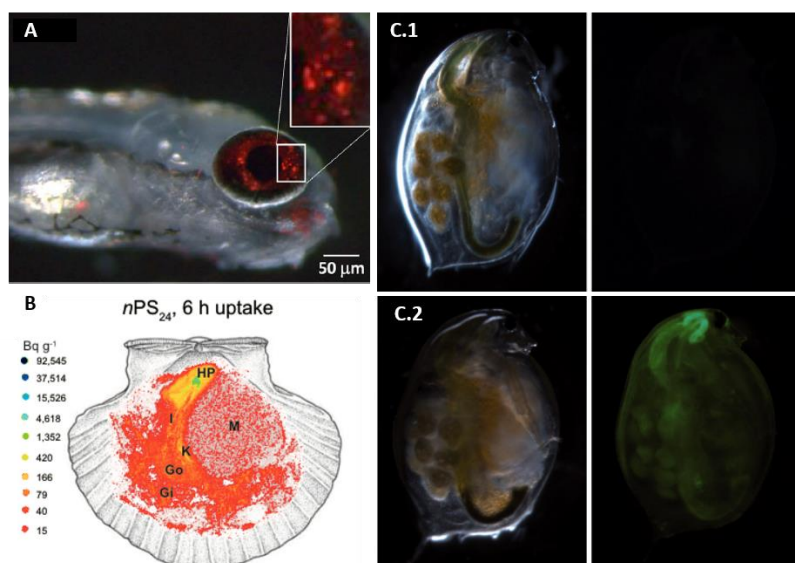


Figure 8. Exemples de translocation de NP. A : Van Pomerén et al. (2017) ; Présence de NP (50 nm) dans l'œil de *Danio rerio* après 72h d'exposition (50 mg.L⁻¹). B : Al-Sid-Cheick et al. (2018) ; Répartition de NP (24 nm ; 15 µg.L⁻¹) marqués à l'aide d'éléments radioactifs après 6h d'exposition chez *P. maximus*. C : Brun et al. (2017) ; Répartition de NP (25 nm ; 5 mg.L⁻¹) à l'intérieur de *Daphnia magna* durant son embryogénèse en comparaison de la condition témoin (C.1).

iii. Evaluation de la toxicité des MNP à travers l'expérimentation

Selon les expositions réalisées en laboratoire, l'ingestion de MNP est rarement mortelle pour les individus exposés (Galloway et al., 2017). En revanche, l'accumulation ou le simple transit de ces particules dans le tractus digestif et sur les organes extérieurs (*e.g.* branchies) peuvent causer des perturbations à différentes échelles : moléculaire, cellulaire, individuelle et populationnelle (Galloway et al., 2017; Rochman et al., 2015). Il est à noter que dans certains cas, les effets observés après une exposition à des particules plastiques pourraient être associés à un relargage de composés chimiques (*e.g.* additifs) mais cela reste encore à explorer (Sussarellu et al., 2016).

iii.1 Effets moléculaires et cellulaires

La perturbation du système oxydatif, *i.e.* le système de défense contre les stress extérieurs, est un des processus majeur observé dans la littérature (Jeong et al., 2017; Paul-Pont et al., 2016). Par exemple, Jeong et al. (2017) ont remarqué la stimulation de voies moléculaires (*e.g.* MAPK) associées aux défenses du copépode *Paracyclopsina nana* après 24h d'exposition à des nanosphères de PS (50 nm). Ce stress oxydatif peut être associé à une dysrégulation du

système immunitaire (Canesi et al., 2016; Green et al., 2019; Paul-Pont et al., 2016; Pittura et al., 2018), à une stimulation des voies moléculaires liées à l'apoptose (Della Torre et al., 2014; Pinsino et al., 2017), à des dommages aux membranes (*e.g.* peroxydation lipidique, perte d'intégrité) (Feng et al., 2019; Jeong et al., 2018; Lu et al., 2016), à une déstabilisation du système lysosomale (Von Moos et al., 2012), ou encore de la génotoxicité (*e.g.* perte de l'intégrité de l'ADN, fractures de l'ADN) (Avio et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). Les méthodes -omics (*e.g.* transcriptomique, protéomique, métabolomique) permettent la caractérisation sans a priori d'un ensemble de voies moléculaires impliquées durant l'exposition, et sont donc à privilégier dans les futures études (Green et al., 2019; Mattsson et al., 2015b; Sussarellu et al., 2016; Veneman et al., 2017) pour comprendre la réponse de l'organisme exposé aux plastiques et aussi explorer des mécanismes de résilience.

Diverses réponses tissulaires peuvent avoir lieu suite à l'ingestion de MNP. Ainsi, des nécroses, une augmentation de la production de mucus, des inflammations et lésions de l'intestin ont été remarquées (Jin et al., 2018; Paul-Pont et al., 2016; Pedà et al., 2016; Von Moos et al., 2012). Par exemple, le cerveau du poisson d'eau douce *Carassius carassius* présentait divers dommages (*e.g.* blanchissement, gonflement) suite à une exposition aux nanosphères de PS (30 nm) (Mattsson et al., 2015b) expliquant potentiellement les modifications de comportement mis en évidence.

iii.2 Effets énergétiques

L'ingestion et le simple transit de MNP peuvent influencer le métabolisme énergétique des individus. Un des premiers effets de l'ingestion de MNP est celui de satiété, modifiant le comportement alimentaire de l'organisme. Ainsi, une réduction de la prise alimentaire est observée dans la majorité des cas (Besseling et al., 2013; Rist et al., 2017; Watts et al., 2015; Wright et al., 2013a). Néanmoins, le phénomène inverse a déjà été observé comme chez l'huître (+3 % de l'activité de filtration) après deux mois d'exposition à des microsphères de PS (2 et 6 μm) vraisemblablement dans le cadre d'un mécanisme de compensation énergétique (Sussarellu et al., 2016). L'effet sur la prise alimentaire peut être dépendant de la taille des particules selon les espèces ; -70 % de la consommation algale chez les larves de *C. gigas* exposées à des particules de 1 μm mais aucun effet des particules de 10 μm (Cole & Galloway, 2015) ; aucune différence entre les effets des microsphères de 2 μm et des nanosphères de 100 nm sur la prise alimentaire de *D. magma* (Rist et al., 2017). Cette

perturbation dans la prise alimentaire, et donc dans l'accumulation des réserves, peut mener à un effet sur la croissance, l'activité métabolique, la production de byssus ou l'effort de reproduction afin d'assurer la maintenance des organismes (Cole et al., 2015b; Gardon et al., 2018; Ogonowski et al., 2016; Rist et al., 2016; Sussarellu et al., 2016; Wright et al., 2013a). Par exemple, par l'analyse du budget énergétique de l'huître, Sussarellu et al. (2016) ont mis en évidence une augmentation des coûts de maintenance au détriment de l'effort de reproduction (*e.g.* quantité de gamètes produits). Cette modulation du bilan énergétique a également été observée sous l'effet de NP avec un effet taille et dose-dépendant (Besseling et al., 2014; Jeong et al., 2016, 2017). Par exemple, les nanosphères de PS (50 nm ; 20 µg.mL⁻¹) ont induit une diminution de 59-70% dans la fécondité (nombre de juvéniles produits) du rotifère *B. koreanus* et du copépode *P. nana* alors qu'aucun effet n'était perceptible avec les microsphères (6 µm) (Jeong et al., 2016, 2017).

iii.3 Effets comportementaux

La présence de MNP peut induire directement ou suite à des perturbations cellulaires/tissulaires/énergétiques des modifications dans le comportement des organismes (Galloway et al., 2017). En laboratoire, l'ingestion de MNP a notamment diminué les capacités de saut des puces de mer (Tosetto et al., 2016), modifié la locomotion/prédation de poissons (*e.g.* distance parcourue, temps d'alimentation) (Cedervall et al., 2012; Chen et al., 2017; Mattsson et al., 2015b) ou encore provoqué l'immobilisation de daphnies (Rehse et al., 2016). Ces modifications comportementales peuvent impacter les interactions proies/prédateurs (de Sa et al., 2015). De plus, selon la forme des particules (*e.g.* sphère, fibre), les espèces zooplanctoniques peuvent modifier leur préférence alimentaire afin de limiter le risque d'ingestion des particules plastiques présentant une forme similaire aux proies naturelles (Cole et al., 2019; Coppock et al., 2019).

iii.4 Effets transgénérationnels

La stabilité des communautés et le fonctionnement des écosystèmes sont liées à la capacité des populations à se maintenir de manière durable et à s'acclimater face aux perturbations anthropiques. La majorité des études écotoxicologiques s'intéressent aux effets sur une seule génération, or, l'évaluation des risques écologiques pour les écosystèmes marins nécessite d'explorer les effets d'un contaminant sur plusieurs générations. A ce jour, quatre études – à notre connaissance – ont examiné les effets des MNP sur au moins deux générations distinctes

en laboratoire (Lee et al., 2013; Martins & Guilhermino, 2019; Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2017). Concernant les MP, Zhang et al. (2019) n'ont observé aucune conséquence de l'exposition de la génération 1 et 2 de *Tigriopus japonicus* sur la génération 3. Néanmoins, chez la même espèce, Lee et al. (2013) ont remarqué une toxicité supérieure des nanosphères (EC_{50} survie = 2,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 23,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour des particules de 50 et 500 nm, respectivement) sur la première génération, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux NP (50 nm) sur la génération 2 (EC_{50} survie = 0,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

iii.5 Etude de cas : Effets sur les jeunes stades des organismes marins

La plupart des études dans la littérature ont évalué la toxicité des MNP sur le stade adulte des organismes (Kaposi et al., 2014). Cependant, de nombreux organismes marins (*e.g.* bivalves, oursins) ont pour mode de reproduction la fécondation externe avec une vie larvaire pélagique. Ainsi, les jeunes stades (gamètes, embryons, larves) sont directement en contact avec les débris plastiques présents dans l'environnement.

Parce que la toxicité des MP est liée principalement à leur ingestion et la perturbation de la balance énergétique, il semble peu probable que ces particules puissent avoir un impact sur les gamètes et embryons des organismes marins. En revanche, du fait de leur taille et de leur possible capacité de translocation, les NP semblent plus propices à l'interaction avec ces jeunes stades de vie. Aucune donnée n'est à notre connaissance disponible sur l'effet des NP sur les spermatozoïdes et ovocytes alors que dans l'évaluation des impacts de divers contaminants (*e.g.* nanoparticules métalliques, algues toxiques), les gamètes se sont avérés être des stades très sensibles (Akcha et al., 2012; Gambardella et al., 2015; Kadar et al., 2013; Rolton et al., 2015). Concernant des effets sur le développement embryonnaire des espèces marines, une toxicité dose-dépendante des NP (PS-NH₂; 50 nm) a été observée chez la moule *M. galloprovincialis* (EC_{50} = 0,14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Balbi et al., 2017) et l'oursin *Paracentrotus lividus* (EC_{50} = 2,61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Della Torre et al., 2014), associée à la modulation de voies moléculaires de l'apoptose pour l'oursin et de la minéralisation de la coquille pour la moule. L'ingestion de MP par les stades larvaires de diverses espèces a été démontrée en milieu naturel (Steer et al., 2017) ou en milieu contrôlé (Beiras et al., 2018; Capolupo et al., 2018; Cole et al., 2013; Kaposi et al., 2014; Mazurais et al., 2015; Nobre et al., 2015). Cependant, la majorité de ces études ont observé un effet limité, même à très hautes doses. Par exemple, dans deux travaux différents (Cole & Galloway, 2015 (a) ; R. Sussarellu, pers. comm. (b)), l'exposition chronique

(8 jours (a) et 15 jours (b)) des larves de *C. gigas* aux MP ((a) 1 et 10 μm , 100 $\text{MP}\cdot\text{mL}^{-1}$; (b) 2 et 6 μm , 2000 $\text{MP}\cdot\text{mL}^{-1}$) n'a eu aucune incidence sur la croissance larvaire ni la prise alimentaire. Le même résultat fut observé chez la moule *M. edulis* avec des particules de 2 μm après 15 jours d'exposition (42 – 282 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Rist et al., 2019). En revanche, dans la même étude, les larves exposées à des NP (100 nm) exhibaient de nombreuses malformations à la fin de l'exposition. Des modifications comportementales, des effets neurotoxiques et cellulaires (*e.g.* diminution de la production d'énergie, perturbation de l'activité cardiaque et du système antioxydant) ont également été observés chez les larves d'*Artemia franciscana* (Bergami et al., 2016) et de *Danio rerio* (Chen et al., 2017; Pitt et al., 2018a; Trevisan et al., 2019) après des expositions aux NP. Ainsi, alors que les larves semblent peu affectées par les MP, les NP pourraient avoir des effets supérieurs sur ces stades principalement du fait de leur réactivité et de leur taille favorisant l'interaction avec les membranes biologiques et le développement de lésions.

CHAPITRE 2

MODELE BIOLOGIQUE – L'HUÎTRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*

1) CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'HUÎTRE CREUSE

a) Classification

L'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est un bivalve filtreur appelé plus communément l'huître du Pacifique ou huître creuse dont la systématique est décrite ci-dessous :

Phylum : Mollusca

Classe : Bivalvia

Ordre : Ostreida

Famille : Ostreidae

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *Crassostrea gigas*

Le nom de cette espèce est aujourd'hui encore discuté par la communauté scientifique (Bayne et al., 2017). Une récente étude basée sur de nouvelles données moléculaires a proposé le reclassement de *C. gigas* à l'intérieur d'un nouveau genre : *Magallana* (Salvi & Mariottini, 2016). Cependant, ces données semblent être insuffisantes en raison notamment du faible nombre de gènes étudiés et de l'absence d'analyses sur la totalité des espèces de la sous-famille *Crassostreinae* (Bayne et al., 2017). Ainsi, les deux noms (*C. gigas* et *M. gigas*) sont pour l'instant acceptés dans la littérature. Dans la suite de ce manuscrit, *C. gigas* sera le seul nom utilisé pour décrire l'espèce de l'étude.

b) L'ostréiculture française : historique et enjeux actuels

Historiquement, la population française exploitait l'espèce endémique du pays, l'huître plate *Ostrea edulis*. Les premières cultures remontent au XVII^{ème} siècle dans le bassin de Marennes-Oléron (Buestel et al., 2009). Alors que les productions étaient relativement stables au début du XX^{ème} siècle (15 000 – 20 000 t entre 1908 et 1912), un épisode d'épizootie a détruit les stocks d'*O. edulis* en 1920 (Figure 1). A la suite de cet épisode, l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (introduite en 1868 dans le bassin d'Arcachon) devint l'espèce dominante de l'ostréiculture française, atteignant une production de 90 000 t en 1950 (Buestel et al., 2009). Cependant, à la fin des années 60, la « maladie des branchies » affectant *C. angulata* mena à

sa disparition du littoral français (Buestel et al., 2009) (Figure 1). A partir de 1972, le gouvernement français a mis en place le plan « Resur (Résurrection de l'huître) » avec l'introduction massive de l'huître creuse *Crassostrea gigas* originaire du Pacifique sur les côtes atlantiques françaises afin de sauver la filière ostréicole. Depuis ce jour, *C. gigas* est le principal bivalve produit en France (54 % de la production en 2016, ≈ 125 000 t). Cependant, malgré son succès, la production de l'huître creuse n'est pas sans problème. Après une période faste durant les années 90 et le début des années 2000 où la production annuelle dépassait les 100 000 t, des épisodes de maladies ont eu lieu sur le littoral français avec des mortalités estivales massives des juvéniles depuis 2008 en lien avec l'herpèsvirus OsHV-1 μ var (Petton et al., 2015). Selon la localisation et les cohortes étudiées, le taux de mortalité des juvéniles (moins de 1 an) varie entre 40 et 100 % tandis que les individus plus âgés sont moins touchés par cette maladie complexe (Petton et al., 2015). Il est également important de noter que dans la filière ostréicole française, les concessions utilisent des huîtres diploïdes (2n) ou triploïdes (3n). Les caractéristiques des huîtres triploïdes (croissance plus rapide et stérilité) apportent aux ostréiculteurs un avantage économique grâce à un cycle de vie plus court et la vente en période estivale (Buestel et al., 2009). En 2005, l'huître triploïde représentait 80 % des naissains achetés par les écloséries (Buestel et al., 2009).

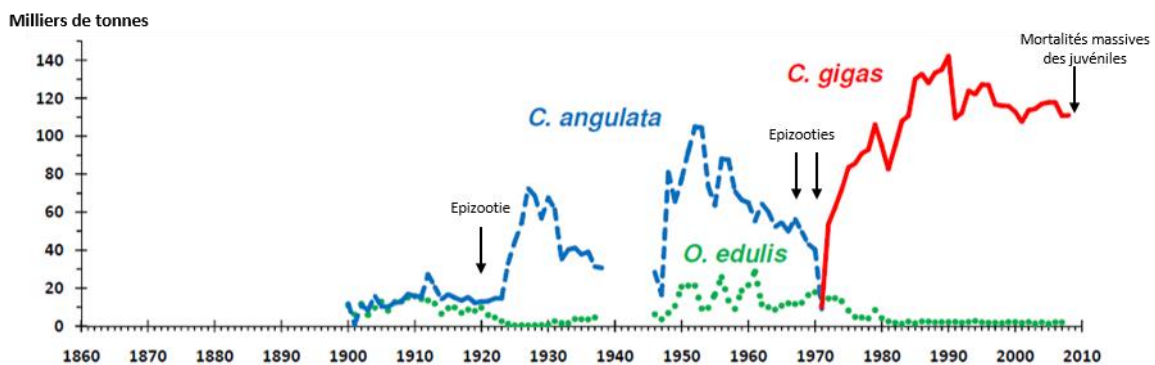
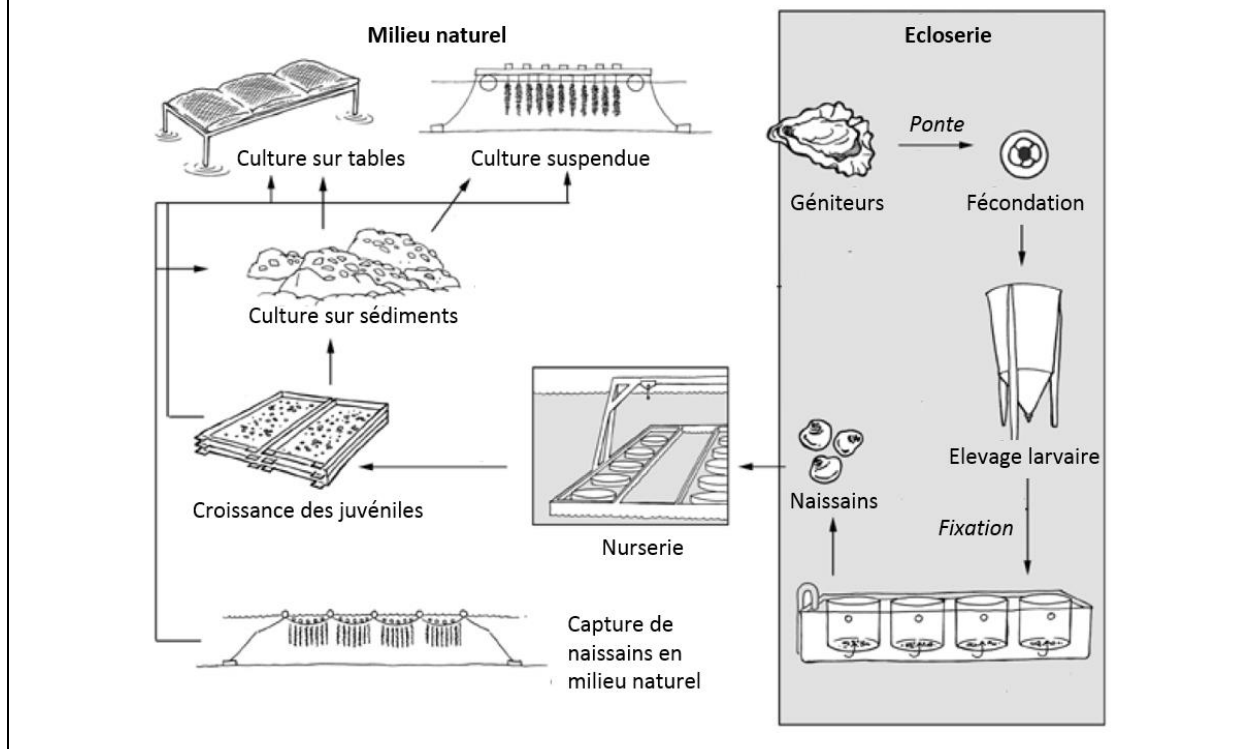


Figure 1. Evolution de la production ostréicole française depuis le début du XX^{ème} siècle. Modifié d'après Bernard (2011).

Méthodes d'ostréiculture. La production de *C. gigas* fait appel à deux méthodes principalement. La première consiste à la capture de naissains dans le milieu naturel (70-80 % de la production) et de leur transport dans des parcs ostréicoles afin de réaliser des cultures de trois types : (1) suspendues ; (2) dans des poches surélevées ; (3) sur les sédiments avec des récoltes par dragage. La seconde méthode est basée sur l'utilisation d'écloseries (20-30 % de la production). Aujourd'hui le développement de *C. gigas* est totalement contrôlé dans ces structures et permet d'optimiser la production de naissains. D'après Miossec et al. (2009).



c) Services écosystémiques

Les huîtres ne sont pas seulement des valeurs marchandes, elles remplissent diverses fonctions écologiques dans les zones estuariennes et côtières. D'une part, l'huître est une espèce ingénieuse *via* la création de récifs qui sont utilisés comme habitats biogéniques, zones de protection et nurseries (Grabowski et al., 2012; Huvet & Pouvreau, 2016). Un récif d'huîtres (RH) peut augmenter de 40 000\$ le chiffre d'affaire de la pêche de poissons et crustacés (Grabowski & Peterson, 2007). Parce que 85 % des RH ont été détruits au cours de 130 dernières années, leur protection est une problématique majeure (Beck et al., 2011 ; Grabowski et al., 2012). D'autre part, les huîtres participent activement aux cycles biogéochimiques et à la qualité des eaux. Elles « nettoient » les eaux des particules en suspension (sédiment, phytoplancton) par leur filtration, permettant une meilleure pénétration de la lumière dans les zones benthiques et donc le développement de végétaux.

Ainsi, les huîtres contrôlent la production primaire benthique. En parallèle, le contrôle des biomasses phytoplanctoniques par la filtration limite le risque d'anoxie lors des efflorescences printanières et estivales (Newell et al., 2007). Cette filtration également associée à une forte biodéposition (fécès et pseudo-fécès) réduit l'eutrophisation des zones côtières *via* la dénitrification (Newell et al., 2002; Newell et al., 2004). Enfin, un RH limite l'érosion et protège les autres habitats estuariens/côtières en agissant comme un brise-lames par l'absorption de l'énergie engendrée par les vagues, tempêtes et activités anthropiques (Beck et al., 2011; Grabowski et al., 2012).

d) Biologie et écologie

i. Habitat et distribution

L'huître creuse est originaire de l'Asie du Sud-Est (Figure 2). Elle est considérée comme une des principales espèces invasives marines (Molnar et al., 2008). L'introduction volontaire (pour des raisons aquacoles) a permis son expansion dans différentes régions du globe et la colonisation de différents milieux sur les substrats meubles ou durs des zones intertidales, infralittorales et estuariennes (Miossec et al., 2009) (Figure 2). Par exemple, son introduction en France dans les années 70 a induit une prolifération sur les côtes européennes jusqu'à la mer de Wadden. Par le biais des changements globaux, *C. gigas* est capable d'envahir des milieux à des latitudes de plus en plus hautes (Thomas et al., 2016). Aujourd'hui, *C. gigas* est présente dans les zones côtières de 45 éco-régions (Molnar et al., 2008). La capacité de l'huître creuse à coloniser l'ensemble de ces régions s'explique par de larges tolérances aux variations environnementales (*e.g.* température, salinité, disponibilité en nourriture) (Miossec et al., 2009). La caractérisation du génome de *C. gigas* a mis en lumière ses hautes capacités d'adaptation face à un large spectre de perturbations (Zhang et al., 2012).

Cette invasion engendre de nombreuses conséquences, négatives et positives (écologiques, économiques, sociétales) (Molnar et al., 2008; Miossec et al., 2009). A titre d'exemple, cette espèce lors de sa prolifération entre en compétition (pour la nourriture et l'espace d'une zone donnée) avec les autres bivalves filtreurs, pouvant engendrer un déclin de ces populations natives comme l'illustre la diminution des stocks de moules en Europe ou de l'huître endémique de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande *Saccostrea glomerata* (Miossec et al., 2009). A l'inverse, l'introduction de *C. gigas* a permis dans de nombreuses régions de relancer l'ostréiculture et donc l'économie de ce domaine (Miossec et al., 2009).

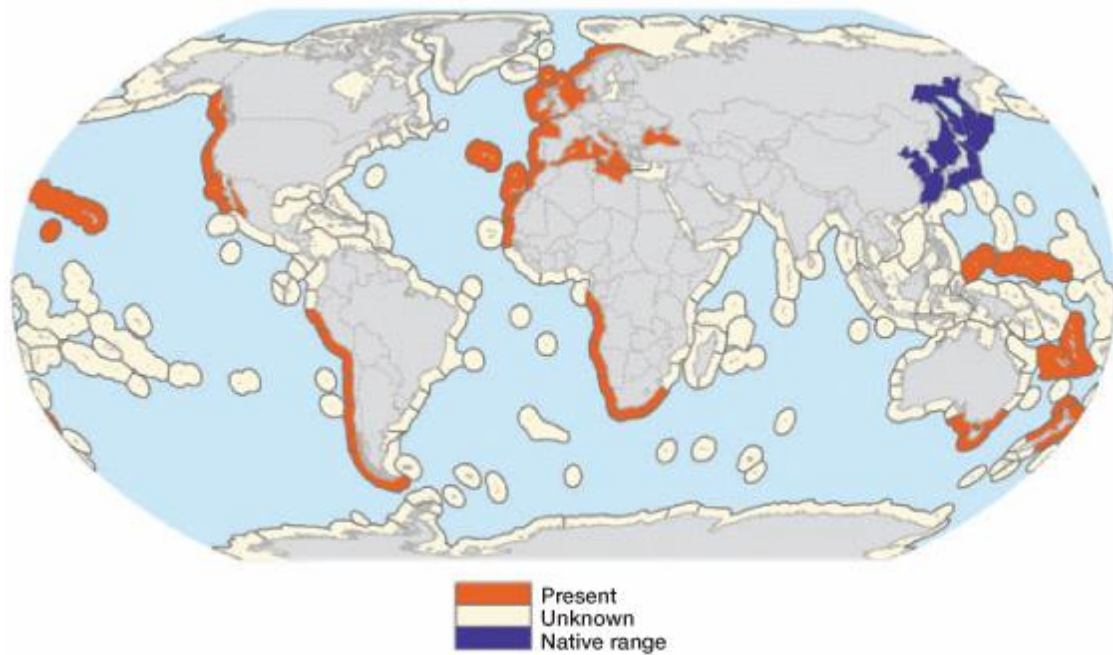


Figure 2. Cartographie de la répartition de *C. gigas* (Molnar et al., 2008).

ii. Anatomie et nutrition

L'huître *C. gigas* est un organisme dont le corps mou est enfermé dans deux valves asymétriques (plane et concave) rattachées par une charnière définissant la partie antérieure de l'animal. Le muscle adducteur divisé en deux parties, lisse et strié, permet la fermeture des valves (Figure 3). Le corps de l'animal est protégé par un manteau qui délimite la cavité palléale (Kennedy et al., 1996). A l'intérieur de cette cavité, on retrouve les branchies qui sont responsables des activités de nutrition et de respiration (Kennedy et al., 1996; Ward & Shumway, 2004). Les huîtres sont des microphages se nourrissant de particules sestoniques (microalgues, bactéries, débris organiques) avec une préférence pour les particules d'une taille moyenne de 10 μm (Miossec et al., 2009). Le processus d'alimentation est constitué de différents tries au niveau des branchies et de la bouche, impliquant notamment les palpes labiaux afin de sélectionner les particules (Figure 3). Les particules rejetées sous la forme d'agrégats aux niveaux des palpes labiaux forment les pseudo-fécès. Après le passage par la bouche, les particules subissent plusieurs processus de digestion : (i) la digestion extracellulaire dans l'estomac à l'aide du stylet cristallin, permettant à la fois le broyage du contenu stomacal et la dégradation chimique des particules par l'utilisation d'enzymes, (ii) la digestion intracellulaire suite au transport des particules à l'intérieur de la glande digestive pour l'assimilation de la nourriture. Les éléments résiduels de l'assimilation sont ensuite emmenés jusqu'au rectum puis évacués sous forme de fécès par l'anus.

En ce qui concerne l'oxygène récupéré par les branchies, il est transféré par le système circulatoire vers le cœur (un ventricule et deux oreillettes) – situé dans une cavité péricardique sur la face antérieure du muscle adducteur – et les autres organes. Le système circulatoire est dit semi-ouvert avec la présence de nombreux vaisseaux et sinus coelomiques comme composition principale (Fabioux, 2004). Ce système permet à l'hémolymphe (le fluide circulant) d'atteindre les tissus de l'animal sans aucune restriction. Ce fluide, composé notamment d'hémocytes et de peptides antimicrobiens, participe à la digestion et aux transports de nutriments mais assure également les principales fonctions du système immunitaire inné (*e.g.* réparation des blessures et de la coquille, détoxification) en cas de stress (*e.g.* maladies, parasitismes, contaminants anthropiques).

Le système nerveux est pour sa part peu développé et sa composition est difficilement observable (Fabioux, 2004). Le système nerveux central est constitué de deux ganglions cérébraux situés de part et d'autre du corps de l'animal dans la région œsophagienne et d'un ganglion viscéral dans la partie caudale de l'individu (Yurchenko et al., 2018). Le système nerveux périphérique est composé de nerfs reliant les ganglions et les différents organes (Yurchenko et al., 2018).

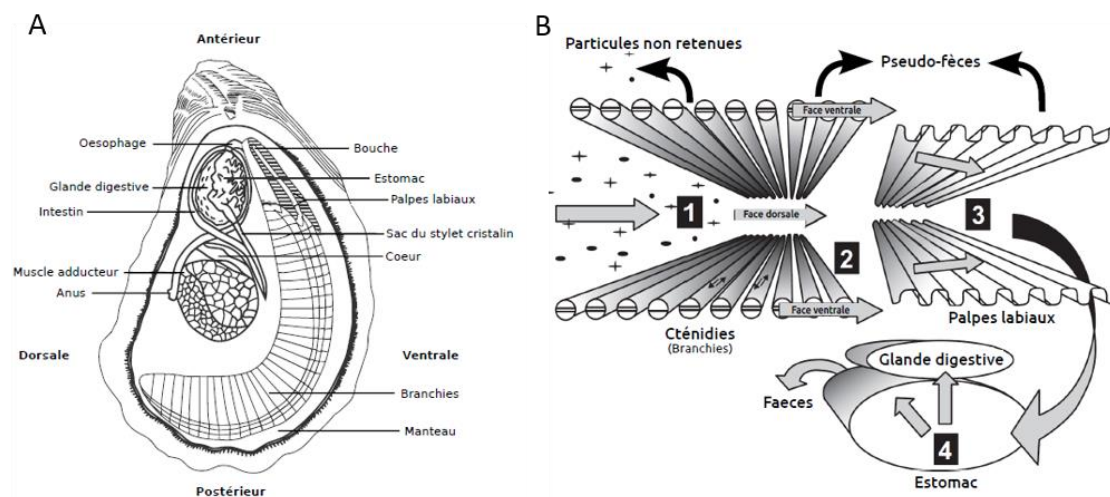


Figure 3. (A) Anatomie de *C. gigas*. (B) Schéma des différents processus digestifs ; (1) Capture des particules, (2) Transport sur les branchies et première sélection, (3) Deuxième sélection des particules sur les palpes labiaux, (4) Ingestion, digestion puis excrétion des particules. Figures issues de Poussé (2017) d'après les données de Ward & Shumway (2004).

2) REPRODUCTION ET CYCLE DE VIE

a) Biotopes de développement

Au cours de son développement, *C. gigas* utilise deux biotopes différents. Au stade adulte, l'huître creuse est fixée en zone benthique. Durant la période de reproduction, l'émission des gamètes a lieu dans l'environnement pour permettre la fécondation externe. Ainsi, le développement embryonnaire puis larvaire est réalisé dans la colonne d'eau (stade pélagique) jusqu'à la fixation et donc le retour à une vie benthique (Figure 4). Dans les régions tempérées comme la façade atlantique française, le développement larvaire pélagique dure entre 15 et 25 jours en fonction de la température et de la quantité de nourriture disponible (Bernard, 2011). *C. gigas* présente une stratégie de reproduction de type « r » caractérisée par une émission importante de gamètes afin de maximiser le succès reproducteur des individus malgré de fortes mortalités durant l'embryogénèse et la métamorphose. Plus de 99 % de la descendance peut mourir entre les premiers stades de développement et la fixation (Auby & Maurer, 2004).

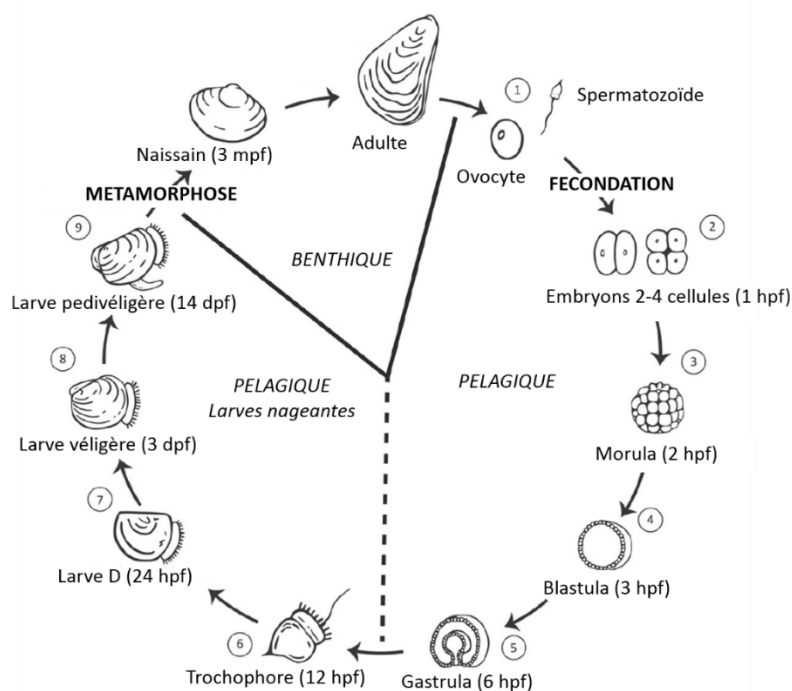


Figure 4. Représentation schématique du cycle de vie de *C. gigas*. Modifié d'après Vogeler et al. (2017).

b) Hermaphrodisme

L'huître creuse est un hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Devauchelle et al., 1995). L'objectif des changements de sexe est d'optimiser la « fitness » d'un individu afin de maximiser son succès reproducteur. Généralement, la majorité des individus sont mâles durant les premières années de vie (> 70 %) mais la fréquence de femelles au cours de la vie de la cohorte – atteignant une dizaine d'année – augmente et peut dépasser les 80 % (Bayne, 2017). Le changement de sexe a lieu uniquement lorsque l'organe sexuel est indifférencié après l'émission des gamètes (Bayne, 2017). Aujourd'hui, les processus moléculaires impliqués dans le changement de sexe ne sont pas encore totalement compris mais les scientifiques s'accordent sur l'influence de l'environnement (*e.g.* température, disponibilité en nourriture) (Fabioux, 2004; Bayne, 2017; Yue et al., 2018). Par exemple, d'un point de vue énergétique, la production d'ovocytes est bien plus coûteuse que la production de spermatozoïdes. Ainsi, pour une population située dans une zone à faible quantité de nourriture, les individus favoriseront le sexe mâle afin d'optimiser l'utilisation de leurs réserves énergétiques (Bayne, 2017).

c) Gamétogénèse, émission des gamètes et fécondation

i. Organe sexuel et déroulement de la gamétogénèse

La gamétogénèse est l'ensemble des processus permettant la production de gamètes de qualité afin d'assurer le succès reproducteur d'un individu donné. Cette gamétogénèse prend place dans l'organe sexuel de l'huître : la gonade. La gonade est composée de glandes génitales acineuses ramifiées et de tubules gonadiques colonisant un tissu conjonctif autour de la glande digestive. La connexion des tubules gonadiques forme le gonoducte servant de jonction entre la gonade et la cavité palléale pour l'expulsion des gamètes. La spermatogénèse et ovogénèse prennent place de façon centripète à l'intérieur des tubules gonadiques, de l'épithélium gonadique vers la lumière centrale (Fabioux, 2004). La production de spermatozoïdes et d'ovocytes provient d'un ensemble d'étapes (quatre pour les mâles et cinq pour les femelles) (Figure 5) :

- (1) Différenciation des cellules germinales souches et prolifération en gonies (spermatogonie et ovogonie) ;
- (2) Multiplication des gonies par mitoses successives ;

- (3) Différenciation des gonies en spermatocytes ou ovocytes primaires ;
- (4) Les spermatocytes primaires subissent la méiose et se différencient en spermatocytes secondaires, spermatides puis spermatozoïdes. Les ovocytes primaires évoluent en ovocytes vitellogéniques mais sont bloqués en prophase I de méiose et accumulent des réserves maternelles (e.g. protéines, ARNm, lipides).
- (5) Reprise de la méiose des ovocytes vitellogéniques après expulsion en eau de mer puis fécondation avec rupture de la vésicule germinative et libération du premier globule polaire.

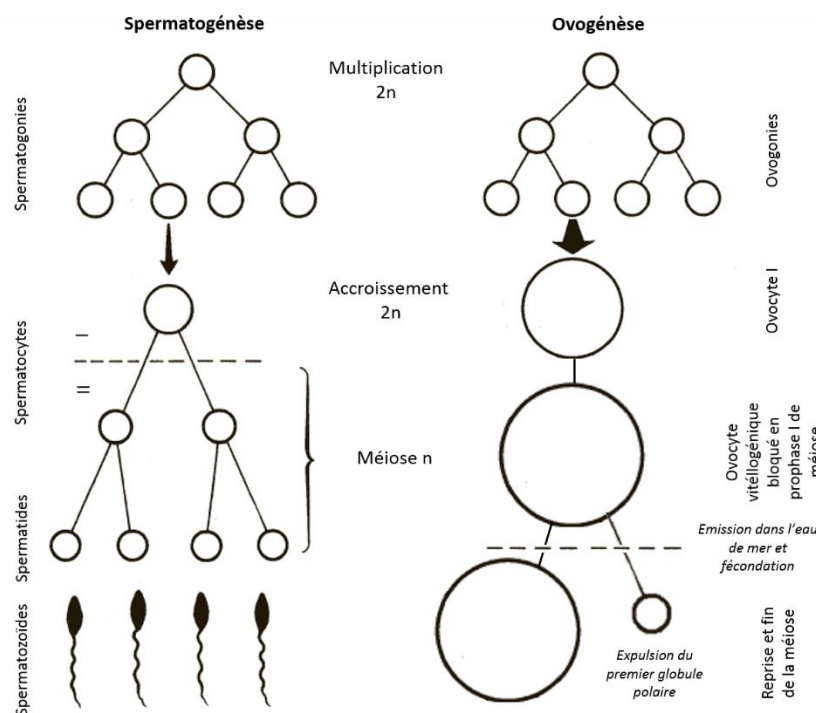


Figure 5. Schéma de la spermatogénèse et ovogénèse chez *C. gigas*. Modifié d'après Le Moigne & Foucrier (2009) selon les données de Fabioux (2004).

ii. Cycle saisonnier de reproduction

Le succès de gamétogénèse est sous la dépendance de facteurs endogènes rythmés par des facteurs environnementaux menant à des différences dans les patterns de pontes (e.g. nombre, intensité) entre les populations localisées à différents points du globe (Bayne, 2017). La température est le principal facteur environnemental impliqué dans la rythmicité de la gamétogénèse chez *C. gigas*. En effet, une élévation de la température a tendance à accélérer la maturation et à avancer la ponte des gamètes (Chavez-Villalba et al., 2002). D'autres paramètres tels que la quantité de nourriture, la photopériode ou la turbidité peuvent

influencer les processus dans une moindre mesure (Fabioux et al., 2005; Lango-Renoso et al., 2006; Dutertre et al., 2009).

Une reproduction saisonnière de *C. gigas* a lieu sur les côtes atlantiques françaises. Du fait du gradient thermique et de la variabilité des autres paramètres extérieurs (*i.e.* quantité de nourriture), les différentes populations d'huîtres ne sont pas matures sexuellement à la même période et peuvent présenter des comportements différents afin d'optimiser le succès reproducteur (Lango-Reynoso et al., 2006; Enriquez-Diaz et al., 2009). Malgré ces variations entre populations, le cycle peut être globalement divisé en quatre étapes (Figure 6) : (1) Apparition des cellules germinales souches (GSCs) à l'automne ; (2) Prolifération des gonies en hiver ; (3) Maturation des gamètes au printemps ; (4) Emission (totale ou partielle) des gamètes pendant l'été (une ou deux fois) suivi d'une période de repos sexuel. La gonade occupe la majeure partie de la cavité palléale ($\approx 60\%$) en fin de gamétogénèse alors qu'elle est complètement atrophiée durant la période de repos sexuel (Figure 6). Durant cette période de repos, les gamètes non-émis pendant l'été sont lysés et le tissu conjonctif stocke le glycogène qui sera la principale ressource énergétique afin d'assurer la production des gamètes l'année suivante (Berthelin et al., 2000).

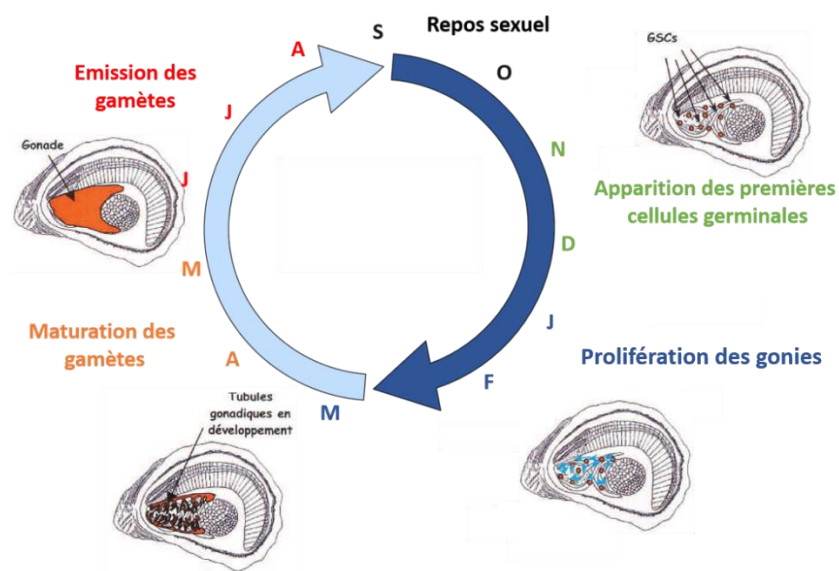


Figure 6. Cycle saisonnier de la reproduction chez *C. gigas* sur les côtes atlantiques françaises. GSCs : Cellules germinales souches. Modifié d'après Fabioux (2004).

iii. Libération des gamètes dans le milieu extérieur

Les pontes de *C. gigas* sont stimulées par des conditions environnementales favorables (*e.g.* température, disponibilité en ressource, présence de gamètes de la même espèce dans le milieu), toujours dans le but de maximiser le succès reproducteur et de valoriser l'énergie réquisitionnée pour la gamétogénèse (Bayne, 2017). L'émission des gamètes se fait en trois étapes (Bayne, 2017) : (1) Evacuation des gamètes par le gonoducte ; (2) Contractions rythmiques du muscle adducteur ; (3) Formation d'un pore suite au repositionnement du manteau permettant la projection des gamètes dans le milieu extérieur. La mobilité des spermatozoïdes est déclenchée dans l'eau de mer sous l'effet du changement de pH entre l'intérieur de la gonade (≈ 5.8) et l'eau de mer (≈ 8). Une fois dans l'eau de mer, les spermatozoïdes de *C. gigas* peuvent être actifs jusqu'à 24h (Suquet et al., 2010). Une huître femelle expulse entre 20 et 100 millions d'ovocytes tandis qu'un mâle émet environ 30.10^9 spermatozoïdes par gramme de gonade (Marteil, 1976 ; Dong et al., 2005). Au niveau morphologique, le spermatozoïde est divisé en deux parties, la tête ($\approx 3 \mu\text{m}$) composée d'un acrosome, d'un noyau et de quatre mitochondries à la base de ce dernier, et d'un flagelle ($\approx 30 \mu\text{m}$) (Demoy-Schneider et al., 2013) (Figure 7A). L'acrosome granuleux est en forme d'anneau et possède les protéines permettant la liaison à l'ovocyte (Vacquier & Swanson, 2011). Les ovocytes ont une forme sphérique dont le diamètre avoisine $50 \mu\text{m}$ au moment de l'émission (Figure 7B). Aucune information n'est disponible à ce jour sur les protéines de reconnaissance des ovocytes pour permettre la fécondation (Vacquier & Swanson, 2011).

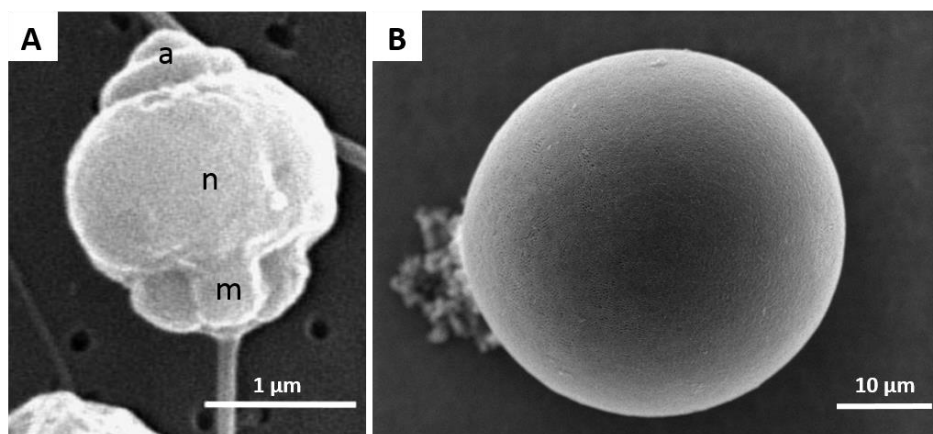


Figure 7. Photographies d'un spermatozoïde (A ; Dong et al., 2005) et d'un ovocyte (B) de *C. gigas* par microscopie électronique à balayage. (a) Acrosome ; (n) Noyau ; (m) Mitochondries.

iv. Fécondation

La fécondation peut être divisée en cinq grandes étapes distinctes (Evans & Sherman, 2013) (Figure 8) : (1) Attraction des spermatozoïdes vers un ovocyte, possiblement par chimio-attraction comme chez d'autres espèces de mollusques (Evans et al., 2012; Riffell et al., 2004) ; (2) Reconnaissance entre les spermatozoïdes et l'ovocyte ; (3) Relargage du contenu acrosomal afin de fragiliser la membrane de l'ovocyte ; (4) Pénétration du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte ; (5) Fusion du matériel génétique entre les deux cellules. En cas de fécondation d'un ovocyte par plusieurs spermatozoïdes (polyspermie), le succès de fécondation diminue (Bayne, 2017). Le risque de polyspermie augmente lorsque le ratio spermatozoïdes : ovocyte dépasse 1000 : 1 (Bayne, 2017). Afin de limiter cette polyspermie, la polarisation de la membrane de l'ovocyte change dans les 15 minutes suivant la fécondation (Togo & Morisawa, 1999).

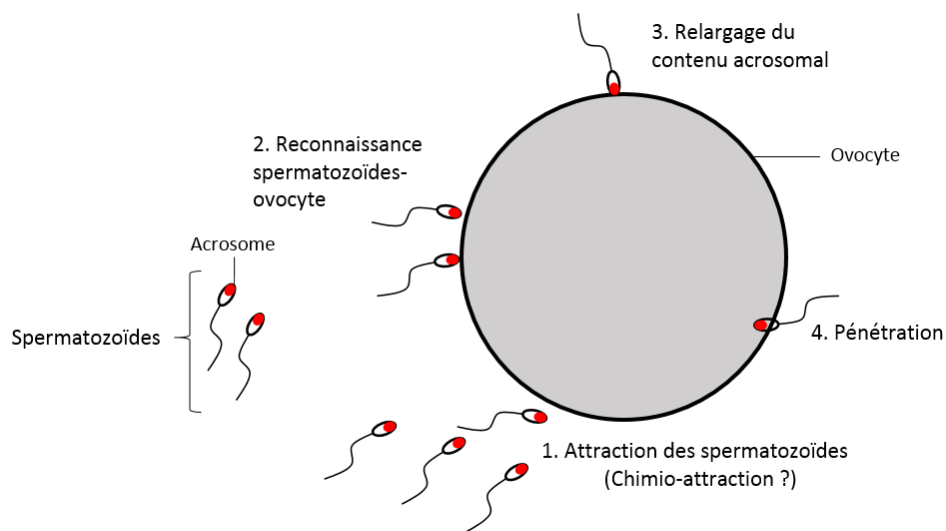


Figure 8. Schéma des différentes étapes de la fécondation chez *C. gigas*. Modifié d'après Evans & Sherman, 2013.

d) Développement embryonnaire

Après la fécondation, l'embryon subit une succession de mitoses donnant naissance à des cellules filles, les blastomères. L'huître creuse comme l'ensemble des mollusques à l'exception des céphalopodes possède un développement embryonnaire spiralé, *i.e.* l'arrangement des blastomères jusqu'à l'obtention d'une blastula se fera en spirale à partir de la troisième division. A la suite de cette segmentation, la blastula évolue en gastrula ($\approx 60 \mu\text{m}$). Les blastomères sont réorganisés pour former les trois feuillets primordiaux nécessaires à l'organogénèse : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Chez les mollusques, la

gastrulation se fait par épibolie (Le Moigne & Foucrier, 2009). Les premières étapes du développement embryonnaire sont particulièrement importantes car elles abritent la différenciation des cellules germinales primordiales qui assurent le transfert d'informations à travers les générations (Fabioux et al., 2004). Le développement de la gastrula aboutit sur la formation d'une larve trochophore (\approx 12 heures après fécondation, hpf, à 25°C ; \approx 60 μ m) possédant une forme de « toupie » ciliée dans la région apicale et périphérique (Fabioux, 2004). C'est à partir de ce stade que les embryons deviennent mobiles. L'organogénèse se poursuit par la minéralisation de la coquille embryonnaire donnant une forme de « D » au dernier stade de l'embryogénèse, la larve D (24 hpf à 25°C ; \approx 80 μ m). Jusqu'à ce stade, les larves sont strictement lécithotrophes et utilisent les réserves énergétiques héritées de la mère.

e) Développement larvaire et fixation

Généralement, 3 à 5 jours après fécondation (jpf), les larves deviennent strictement planctotrophes, *i.e.* accumulation des réserves lipidiques et éléments nutritifs uniquement à partir de la consommation de phytoplancton. Après 3 jours dans l'eau de mer à 25°C, les larves sont dites véligères et deviennent successivement umbonées (apparition de la charnière ; 7 jpf), oeuillées (apparition d'une tache pigmentaire sur la coquille ; 12-14 jpf) puis pédivéligères (développement du pied ; 14 jpf). Ces dernières mesurent approximativement 300 μ m. A ce stade, le comportement de la larve évolue pour la recherche d'un substrat adéquat pour permettre sa fixation puis sa métamorphose (Foulon et al., 2018). La métamorphose s'accompagne de changements morphologiques radicaux tels que la perte du pied, du vélum, de l'œil, tandis qu'elle stimule la croissance coquillière et le développement des filaments branchiaux (Bayne, 2017).

Aujourd'hui, le cycle de vie de l'huître est complètement contrôlé en éclosérie et dans certaines plateformes expérimentales grâce aux connaissances acquises durant les dernières décennies sur la physiologie de l'espèce. La station expérimentale d'Ifremer située à Argenton (29840) permet ainsi d'étudier les effets de différents types de contaminants (*e.g.* maladies, algues toxiques, MNP) à la fois sur les stades benthiques (naissains et adultes) et les stades pélagiques (gamètes, embryons, larves) de cette espèce aux forts intérêts économiques et écologiques

CHAPITRE 3

INFLUENCE DE PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LE COMPORTEMENT DE NANOPLASTIQUES MODELES

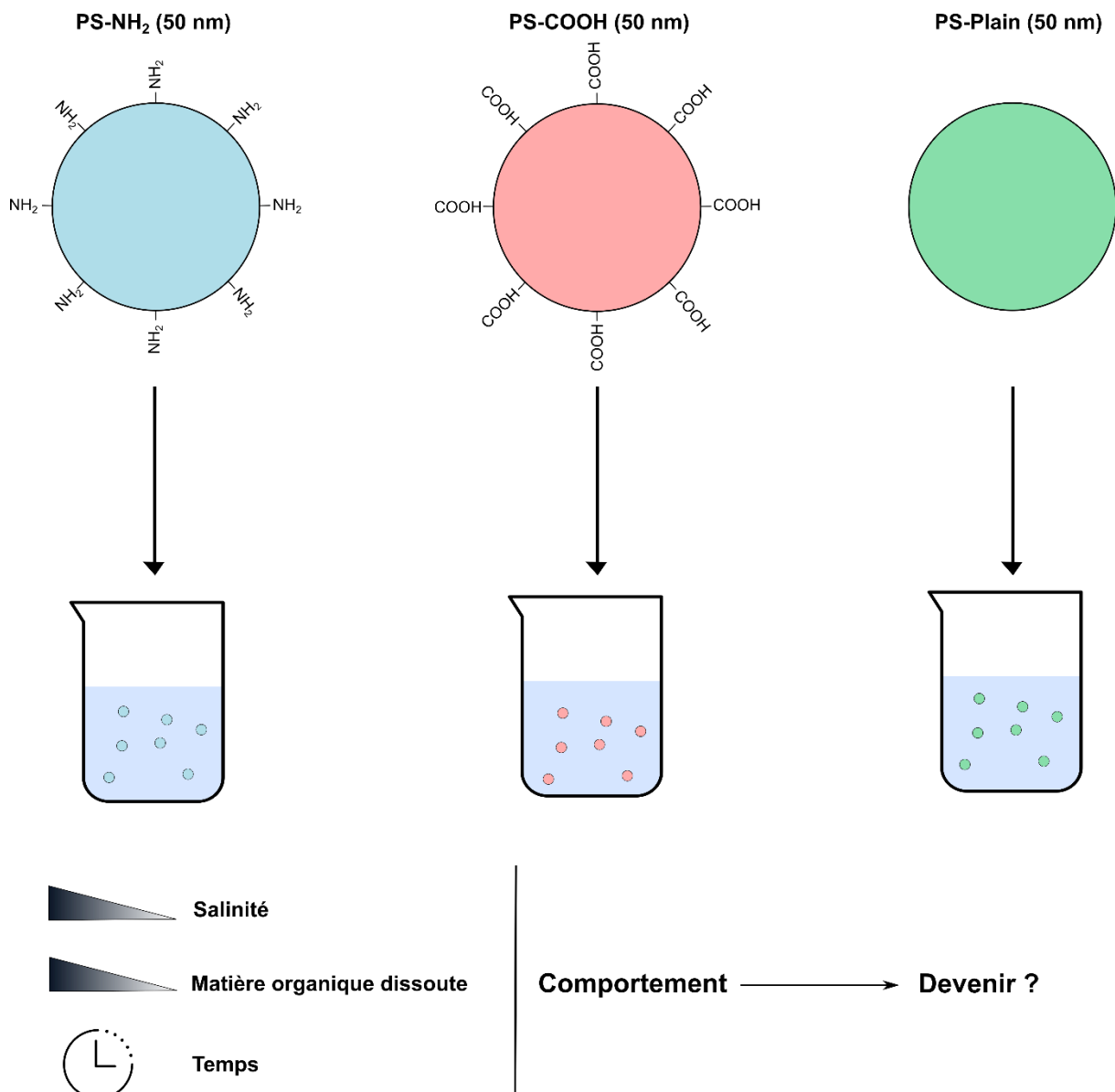
PREAMBULE

Caractériser le comportement des nanoparticules est essentiel afin de modéliser leur devenir et d'évaluer leur toxicité sur les organismes aquatiques (Lowry et al., 2012; Paul-Pont et al., 2018). Les nanoplastiques (NP) présentent un rapport surface/volume très largement supérieur à celui des microplastiques (MP), ce qui augmente leur réactivité et les interactions avec les éléments environnants (Klaine et al., 2012; Mattsson et al., 2015). Ces caractéristiques induisent également des divergences majeures dans le comportement des particules dans un fluide. En effet, les NP sont des colloïdes présentant un mouvement théoriquement brownien, *i.e.* mouvements aléatoires dirigés par les collisions avec les molécules d'eau. Cependant, le milieu océanique est complexe et présente une large diversité d'éléments (*e.g.* sels, matière organique, polysaccharides, protéines) pouvant interagir avec les NP et affecter leur comportement (*e.g.* Gigault et al., 2018; Mattsson et al., 2015). Ainsi, en plus de leurs propriétés intrinsèques (taille, forme, hétérogénéité et chimie de surface), les nanoparticules peuvent subir différents types de transformations dans le milieu marin (Nel et al., 2009; Lowry et al., 2012; Rocha et al., 2015) : (1) Physiques, *i.e.* processus d'homo- (entre particules identiques) et hétéro-agrégation (entre particules différentes, *e.g.* métal, argile); (2) Chimiques, *i.e.* ensemble des interactions entre NP et macromolécules (*e.g.* lipides, polysaccharides, pesticides, protéines, polluants organiques persistants) menant à la formation d'une corona autour des particules et donc à la modification de leurs propriétés de surface ; (3) Biologiques, *i.e.* ensemble des interactions entre les particules et un système biologique.

Bien que les concentrations, le comportement et la biodisponibilité *in situ* des NP soient encore complètement méconnues, l'évaluation de leur possible toxicité est approchée en laboratoire à l'aide de nanosphères de polystyrène (nano-PS) (Besseling et al., 2014; Della Torre et al., 2014; Cui et al., 2017; Pinsino et al., 2017; Balbi et al., 2017; Chen et al., 2017; Jeong et al., 2016; 2017; 2018; Fadare et al., 2019). Il paraît essentiel de déterminer le comportement des différents types de nano-PS (vierge, carboxylée $-\text{COOH}$, aminée $-\text{NH}_2$) utilisés par la communauté scientifique à l'aide de systèmes aquatiques simplifiés reflétant la plupart des milieux utilisés dans le cadre d'expérimentations, ceci afin d'interpréter au plus juste les effets potentiels observés. En plus d'apporter des informations sur la biodisponibilité des particules pour la compréhension des effets sur les organismes dans un contexte

expérimental, une telle étude apportera des éléments d'information participant à la compréhension du devenir des NP dans les océans. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est le suivant :

EVALUER LES EFFETS DE DIFFERENTS PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX (SALINITE ET MATIERE ORGANIQUE) AU COURS DU TEMPS SUR LE COMPORTEMENT DE TROIS TYPES DE NANOSPHERES DE POLYSTYRENE



Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue en 2019 dans le journal *Chemosphere*.

Chemosphere 225 (2019) 639–646



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Chemosphere

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



Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments



Kevin Tallec^{a,*}, Océane Blard^b, Carmen González-Fernández^b, Guillaume Brotons^c,
Mathieu Berchel^d, Philippe Soudant^b, Arnaud Huvet^{a,1}, Ika Paul-Pont^{b,**,1}

^a Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 UBO/CNRS/IRD/Ifremer, CS 10070, 29280, Plouzané, France

^b Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280, Plouzané, France

^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans, UMR CNRS 6283, Le Mans Université, 72085, Le Mans, France

^d Université de Brest, Université Européenne de Bretagne, CNRS UMR 6521, CEMCA, IFR 148 ScnBios, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, 29238, Brest, France

ABSTRACT

Plastic debris are classified as a function of their size and recently a new class was proposed, the nanoplastics. Nano-sized plastics have a much greater surface area to volume ratio than larger particles, which increases their reactivity in aquatic environment, making them potentially more toxic. Only little information is available about their behavior whereas it crucially influences their toxicity. Here, we used dynamic light scattering (DLS) to explore the influence of environmental factors (fresh- and saltwater, dissolved organic matter) on the behavior (surface charge and aggregation state) of three different nanopolystyrene beads (50 nm), with (i) no surface functionalization (plain), (ii) a carboxylic or (iii) an amine functionalization. Overall, the positive amine particles were very mildly affected by changes in environmental factors with no effect of the salinity gradient (from 0 to 653 mM) and of a range 1-30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 1-10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of organic matter in artificial seawater and ultrapure water, respectively. These observations are supposedly linked to a coating specificity leading to repulsive mechanisms. In contrast, the stability of the negatively charged carboxylic and plain nanobeads was lost under an increasing ionic strength, resulting in homo-aggregation (up to 10 μm). The increase in organic matter content had negligible effect on these two nanobeads. Analysis performed over several days demonstrated that nanoplastics formed evolving dynamic structures detected mainly with an increase of the homo-aggregation level. Thus, surface properties of given polymers/particles are expected to influence their fate in complex and dynamic aquatic environments.

Key-words: Nanoplastics; Dynamic Light Scattering; Behavior; Aggregation; Salinity.

1) INTRODUCTION

Owing to the exponential use of plastic items (335 million tons (MT) produced in 2016) by human societies, their mismanagement after usage is a considerable problem of this century (Galloway et al., 2017; PlasticsEurope, 2017). Every year, among the 31.9 MT of plastic wastes that are discarded in environment, between 4.8 and 12.7 MT end up in oceans (Jambeck et al., 2015; Rochman, 2018). To date, plastic debris are ubiquitous in freshwater and marine systems from rivers to oceans (Cózar et al., 2014, 2017; Lebreton et al., 2017; Woodall et al., 2014).

For about a decade, the research emphasis is laid on the small plastic debris called “microplastics (MP; < 1 mm)” originating from manufactured beads/pellets/fibers or mostly (>90%) the weathering of bigger wastes under environmental conditions (UV light, mechanical degradation, biodegradation) (Hüffer et al., 2017; Galloway et al., 2017). However, a new class of smaller debris than MP was proposed lately, the nanoplastics (NP) (Koelmans et al., 2015) which their first report was argued in the North Atlantic Gyre (Ter Halle et al., 2017). To date, several classifications of NP were proposed : <20 μm according to the size used to classify nanoplankton (Wagner et al., 2014); <1 μm owing to the colloidal nature of NP (Gigault et al., 2018); <100 nm in the narrower sense of the definition of engineered nanomaterials (Mattsson et al., 2015). This last classification is the one adopted for this present study. Similarly to MP, NP in the oceans could originate from a direct release from cosmetics (Hernandez et al., 2017), industrial activities (Dubey et al., 2015; Stephens et al., 2013; Zhang et al., 2012), drugs (Lusher et al., 2017); or from weathering of bigger waste as it was demonstrated in laboratory under biotic (Dawson et al., 2018) or abiotic conditions (Gigault et al., 2016; Lambert and Wagner, 2016).

Nanoplastics are known to have a higher surface area/volume ratio than MP. Thus, increasing interactions with persistent organic pollutants (POP) (Liu et al., 2018; Velzeboer et al., 2014) and biological membranes (Rossi et al., 2014) call for an accurate description of NP in the context of the chemical/biological risks in aquatic systems (Koelmans et al., 2016; Paul-Pont et al., 2018). Although ecotoxicological studies reported higher detrimental effects of NP than MP (*e.g.* Jeong et al., 2016; Tallec et al., 2018), the behavior of NP (*e.g.* interactions of NP amongst themselves and other components such as organisms and macromolecules) in

experimental environments and even more in freshwater and marine environments remains largely unknown. However, because the behavior drives fate and toxicity of nanoparticles (Lowry et al., 2012), it is crucial to fill the gaps limiting our knowledge in order to understand the toxicity for aquatic life (*e.g.* Paul-Pont et al., 2018), risks for the balance of ecosystems (Galloway et al., 2017; Mattsson et al., 2015) and up to human health (Wright and Kelly, 2017). Based on works from other nanomaterials, the behavior of NP may be driven by three main processes: physical transformations (homo- or hetero-aggregation); biological transformations (interaction with all components of a biological system involving oxidation and redox mechanism transforming the surface layer of particle); interaction with macromolecules (*e.g.* adsorption of polysaccharides, organic matter, proteins) leading to the development of bio- (in organism) or eco-coronas (in environment) (Galloway et al., 2017; Lowry et al., 2012; Mattsson et al., 2015).

A modelling study using various scenarios showed that NP aggregation in freshwater system could decrease the risk of NP arrival in the oceans (Besseling et al., 2017). Owing to the high diversity of polymers found in oceans and thus the high diversity of their chemical structures, this model-based assumption must be compared with experimental data and *in situ* observations when methods will be developed for NP. Indeed, as reported for other nanomaterials, variations of the chemical surface of the same material affected greatly its behavior in fluids (El Badawy et al., 2010). Also, nanoparticles' behaviors are known to be impacted by environmental factors (*e.g.* pH, salinity, organic matter content) (Keller et al., 2010). Thus, the behavior of NP may be highly complex and their fate can vary from location to location. Furthermore, from our previous study in which we revealed significant toxicity of NP on oyster fertilization success and embryo-larval development, NP behavior was hypothesized as the origin of the toxicity variability of three different 50 nm plastic beads (Tallec et al., 2018). During the redaction of this present work, Cai et al. (2018) investigated the short-term influence (600 seconds) of environmental factors on behavior of NP and reported a low incidence of organic matter on the aggregation kinetics of nanopolystyrene (nano-PS) beads (plain; 100 nm) in media containing various salt (NaCl – 1-100 mM; CaCl₂ – 0.1-15 mM; FeCl₃ – 0.001-1 mM). However, the size and the surface functionalization which display an important role in the behavior of particles were not studied and yet of great interest particularly below 100 nm (Alimi et al., 2018). Here, we performed Dynamic Light Scattering

(DLS) analyses with nanopolystyrene (50 nm) exhibiting different surface functionalizations (carboxyl, amine or none) employed in previous ecotoxicological studies including ours (Della Torre et al., 2014; Jeong et al., 2016; Tallec et al., 2018). The influence of several media (ultrapure water, artificial or filtered natural seawater) and environmental factors (salinity and organic matter gradients) was explored with a temporal survey on their behavior in suspension for coping with environmental variability and to anticipate further ecotoxicology testing.

2) MATERIALS AND METHODS

a. Nanoplastics

Three types of nanopolystyrene beads (PS; 50 nm) were used in this study: (i) without surface functionalization – PS-Plain; (ii) with carboxyl groups – PS-COOH; (iii) with amine groups – PS-NH₂. All NP were purchased from Polysciences/Bangs Laboratories and stored at 4°C prior to experiments. Polymer types were previously confirmed by Raman microspectroscopy analysis (Tallec et al., 2018). Commercial suspensions were supplied in ultrapure water (UW) with a small amount of surfactant (<0.1%; Tween-20[®]). All tests were performed with the same batch of particles.

b. Dynamic Light Scattering (DLS) analyses

For DLS analyses, commercial suspensions of NP were diluted in UW at a stock concentration of 1,000 mg.L⁻¹ then at a work concentration of 100 mg.L⁻¹ in the selected media according to Tallec et al. (2018). It was the optimal concentration allowing high reproducibility and sufficient detection level of particles by DLS. The need to use high particles concentration to reach a high measurement accuracy is common in the field of nanoparticles such as PS (50 mg.L⁻¹; Cai et al., 2018); iron oxide (200 mg.L⁻¹; Chekli et al., 2013); gold (20 mg.L⁻¹; Liu et al., 2012); titanium oxide (50 – 80 mg.L⁻¹; French et al., 2009; Loosli et al., 2013) and zinc oxide (100 mg.L⁻¹; Mohd Omar et al., 2014). The analysis of colloidal fraction from environmental matrices required ultrafiltration (Mintenig et al., 2018). The ultrafiltration factor used by Ter Halle et al. (2017) to detect traces of NP from the North Atlantic Gyre was 200. Therefore the concentration of our working solutions could be extrapolated inversely leading to an environmental value theoretically equivalent to 500 µg.L⁻¹.

DLS measurements were performed with a nano-Zetasizer ZS (Malvern Instruments, UK) using an angle of 173° Backscatter, a temperature of 20°C and an equilibration of 120 sec (González-Fernández et al., 2018). We used the implemented data analysis software to measure the mean size of particles/aggregates (Z-average; nm), the aggregation state (polydispersity index – PDI; Arbitrary Units (A.U.)) and the mean surface charge (ζ -potential; mV) of NP. When the PDI exceeded 0.2, particles were deemed to be aggregated. The nanoplastic suspensions were injected in disposable fold capillary cells (DTS 1060C, Malvern Instruments, UK) with syringes to obtain a final volume of 1 mL. All measurements were performed in triplicate (13 runs and 10 sec.measure⁻¹ for PDI and Z-average; 40 runs and 10 sec.measure⁻¹ for ζ -potential) according to González-Fernández et al. (2018). No effects of the surfactant are expected owing to its residual concentration (< 0.0001%) in all samples (Douglas et al., 1985).

c. Effects of environmental conditions

i. Influence of media

All particles were tested in three different media: (i) ultrapure water (UW; pH 6.6 ± 0.2); (ii) artificial seawater (ASW; pH 8.1 ± 0.1; 30 practical salinity unit [PSU]; NaCl 450 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 9 mM, MgCl₂ 30 mM and MgSO₄ 16 mM); (iii) 1- μ m filtered natural seawater from the Bay of Brest sampled in January 2018 (FSW; pH 8.2 ± 0.1; PSU 32).

ii. Influence of the salinity

To investigate the influence of the salinity, UW and ASW were used to create five intermediate solutions according to Loucaide et al. (2008): 0% (0 PSU; 0 mM), 25% (7.5 PSU; 163.25 mM), 50% (15 PSU; 326.5 mM), 75% (22.5 PSU; 489.75 mM) and 100% of ASW (30 PSU; 653 mM). Solutions were made one day prior to experiments and kept in dark condition at 4°C until use.

iii. Influence of the organic matter

We used humic acid as a proxy of the presence of dissolved organic matter (DOM) in freshwater and estuarine/coastal environments (Baalousha et al., 2008; Cai et al., 2018; Fabrega et al., 2009). Humic acid (OM; CAS 1415-93-6) was purchased from Sigma-Aldrich. A stock solution of 1 g.L⁻¹ was prepared in UW or ASW and stirred during 24h then filtered on 0.2 μ m (aPES membrane) according to Yang et al. (2013). For testing the influence of the OM concentration, work solutions were adjusted at three concentrations (1, 10 and 30 mg.L⁻¹)

corresponding to realistic aquatic concentrations (Cai et al., 2018). Measurements were performed immediately after contact (T0).

NP behavior was also observed over time in UW and ASW alone and with organic matter (UW+OM and ASW+OM) at the intermediate concentration ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Measurements were performed at T0, T24h and T48h.

d. Statistical analyses

Statistical analyses and graphical representations were conducted using the R Software (R Core Team, 2016). Before statistical comparisons, normality and homoscedasticity were screened with the Shapiro-Wilk and Levene's methods, respectively. All analyses were operated using one-way ANOVA followed by pairwise comparisons (Tukey's method) when needed. Effects of treatment on the size average were performed only when the PDI was greater than a threshold set to 0.2 indicating the start of an aggregation. The significance threshold was set at a p-value < 0.05 . Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

3) RESULTS

a. Influence of media

The PS-NH₂ stayed at a nanometric scale in all media: $53.3 \pm 2.3 \text{ nm}$ in UW, $52.5 \pm 0.5 \text{ nm}$ in ASW and $67.9 \pm 0.8 \text{ nm}$ in FSW (Figure 1A). A small aggregation was observed in FSW (PDI > 0.2 ; ANOVA, $F= 110.8$, p-value < 0.01). In contrast, the aggregation level of the PS-COOH and PS-Plain solutions increased significantly (ANOVA; PS-COOH: $F= 135.3$, p-value < 0.001 ; PS-Plain: $F= 358.5$, p-value < 0.001) following the same trend between each medium (Figure 1A). Particles stayed at a nanometric scale (PS-COOH; $63.4 \pm 3.43 \text{ nm}$; PS-Plain: $56.0 \pm 0.2 \text{ nm}$; PDI < 0.2) only in UW and formed microscale aggregates in ASW (PS-COOH: $1,835.0 \pm 240.0 \text{ nm}$; PS-Plain: $2,106.7 \pm 75.4 \text{ nm}$) and FSW (PS-COOH: $4,530.3 \pm 528.0 \text{ nm}$; PS-Plain: $4,810.3 \pm 370.2 \text{ nm}$).

The ζ -potential of all particles was significantly different between UW and seawater (ANOVA; PS-NH₂: $F= 91.3$, p-value < 0.001 ; PS-COOH: $F=71.5$; p-value < 0.001 ; PS-Plain: $F= 51.7$, p-value < 0.001), the values were buffered in seawater (Figure 1B). For the PS-NH₂, in ASW and FSW,

a mean reduction of 69% of the particle surface charge was observed in comparison with UW (58.0 ± 2.5 mV). For the PS-COOH, the ζ -potential increased by 20% and 70% in ASW and FSW, respectively, as compared to UW (-40.7 ± 3.4 mV). Similarly for the PS-Plain, a significant increase of 11% was observed in ASW and 34% in FSW compared to UW (-43.1 ± 0.8 mV).

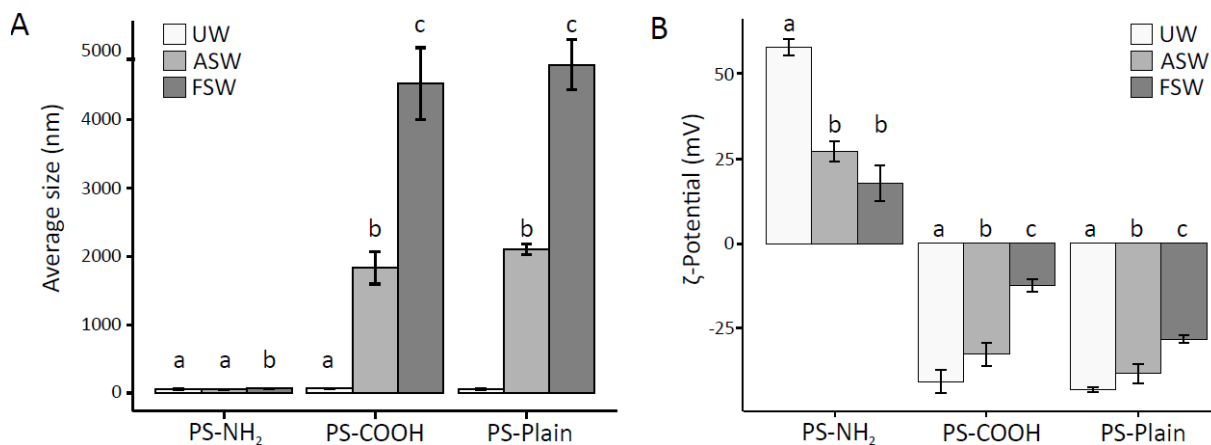


Figure 1. Average size (nm; A) and ζ -potential (mV; B) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) in three media: ultrapure water (UW; white), artificial seawater (ASW; light grey) and 1- μ m filtered natural seawater (FSW; dark grey). DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean \pm SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

b. Influence of the salinity

No statistical effect (ANOVA, p -value > 0.05) of the ionic strength gradient was observed on the aggregation of PS-NH₂ particles (mean value = 51.2 ± 1.8 nm) (Figure 2A). Despite this observation, the increase of salinity caused a significant reduction (ANOVA, $F = 35.7$, p -value < 0.001) of the ζ -potential with values corresponding to 58.0, 39.2, 32.8, 22.5 and 27.4 mV at 0, 163.25, 326.5, 489.75 and 653 mM, respectively (Figure 2B).

A significant effect on aggregation level of the PS-COOH (ANOVA, $F = 74.5$, p -value < 0.001) and PS-Plain (ANOVA, $F = 253.5$, p -value < 0.001) suspensions was demonstrated from 489.75 mM and 326.5 mM, respectively (Figure 2A). The size of the PS-COOH suspension increased 18-fold from 0/163.25/326.5 mM (mean value = 70.8 ± 25.9 nm) to 653 mM ($1,835 \pm 240$ nm). Close results were observed for the PS-Plain with a 38-fold increase from 0/163.25 mM (mean value = 53.8 ± 6.4 nm) to 653 mM ($2,106 \pm 75$ nm). A significant effect in the ζ -potential was

observed with an increasing trend along the gradient for both PS-COOH (ANOVA, $F = 6.7$; p -value < 0.001) and PS-Plain (ANOVA, $F = 15$; p -value < 0.001) from 326.5 mM (Figure 2B). Compared to 0 mM where PS-COOH and PS-Plain had a mean ζ -potential of -43.9 and -42.2 mV, respectively, a maximal increase of 26% and 28% was observed at the highest ionic strength (PS-COOH: -32.6 ± 3.5 mV; PS-Plain: -30.2 ± 2.1 mV).

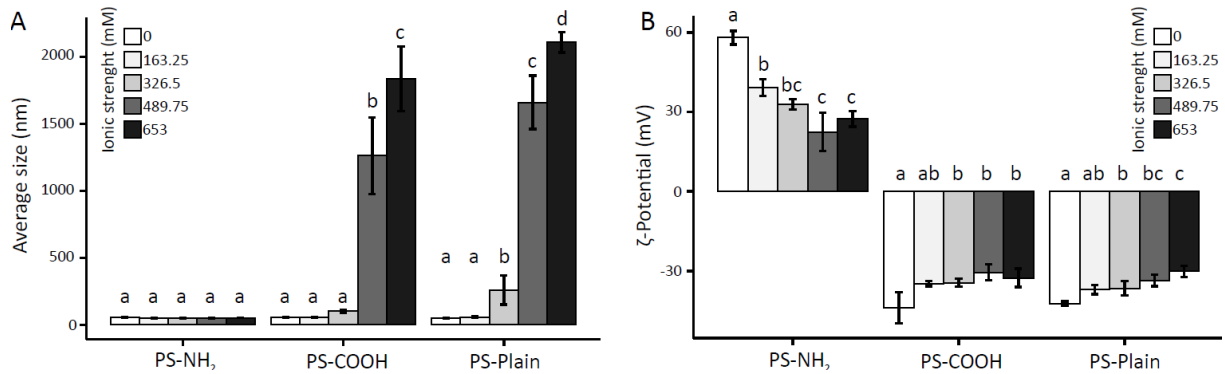


Figure 2. Average size (nm; A) and ζ -potential (mV; B) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) along a salinity gradient (0, 163.25, 326.5, 489.75, 653 mM). DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean \pm SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

c. Influence of the organic matter

The highest concentration of organic matter (30 mg.L^{-1}) in UW affected significantly (ANOVA, $F = 1426$, p -value < 0.001 ; $\text{PDI} > 0.2$) the average size of the PS-NH₂ solution leading to the formation of aggregates with a mean size of 99.4 ± 1.8 nm while no aggregation was reported for lower levels of organic matter (1 and 10 mg.L^{-1} ; mean value = 56.1 ± 1.4 nm) (Figure 3). The addition of organic matter decreased significantly (ANOVA, $F = 1497$, p -value < 0.001) in a dose-response manner the ζ -potential of the PS-NH₂ in UW (1 mg.L^{-1} : 46.2 ± 0.7 mV; 10 mg.L^{-1} : 40.5 ± 0.4 mV; 30 mg.L^{-1} : 24.3 ± 0.4 mV) (Figure 4). In contrast, no effect (ANOVA, p -value > 0.05) of the organic matter on the PS-NH₂ (average size and ζ -potential) was observed in ASW (Figure 3 & 4).

For other NP (PS-COOH and PS-Plain), their size and surface charge were statistically similar (ANOVA, p -value > 0.05) regardless of the organic matter contents. In UW, the PS-COOH and PS-Plain suspension remained at a nanoscale without aggregation with an average size and a ζ -potential of 57.3 ± 1.5 nm/ -42.5 ± 5.0 mV and 51.8 ± 1.3 nm/ -43.0 ± 4.7 mV, respectively

(Figures 3 & 4). In ASW and regardless of the OM concentrations, aggregation reached $1,777 \pm 34$ nm for the PS-COOH and $2,082 \pm 206$ nm for the PS-Plain with a ζ -potential of -27.9 ± 1.6 mV and -35.7 ± 3.8 mV, respectively.

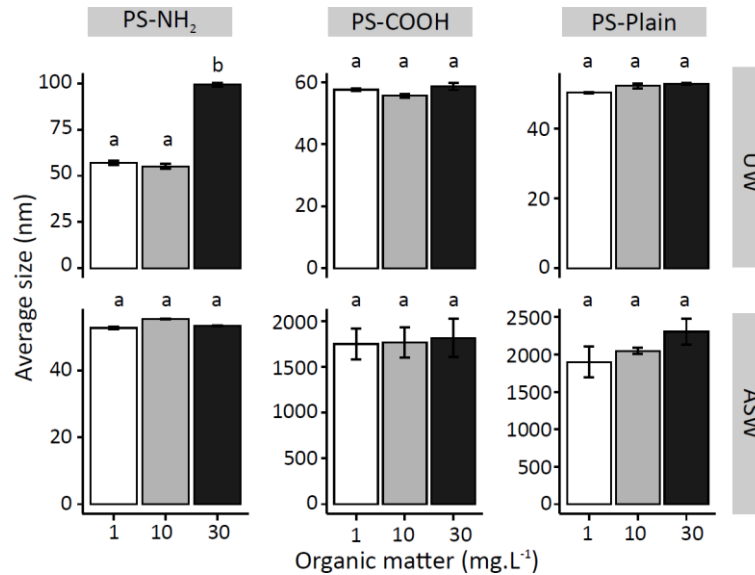


Figure 3. Average size (nm) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) in two media (ultrapure water – UW or artificial seawater – ASW) with three different doses of organic matter: 1 (white), 10 (light grey) and 30 (black) mg.L⁻¹. DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean \pm SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

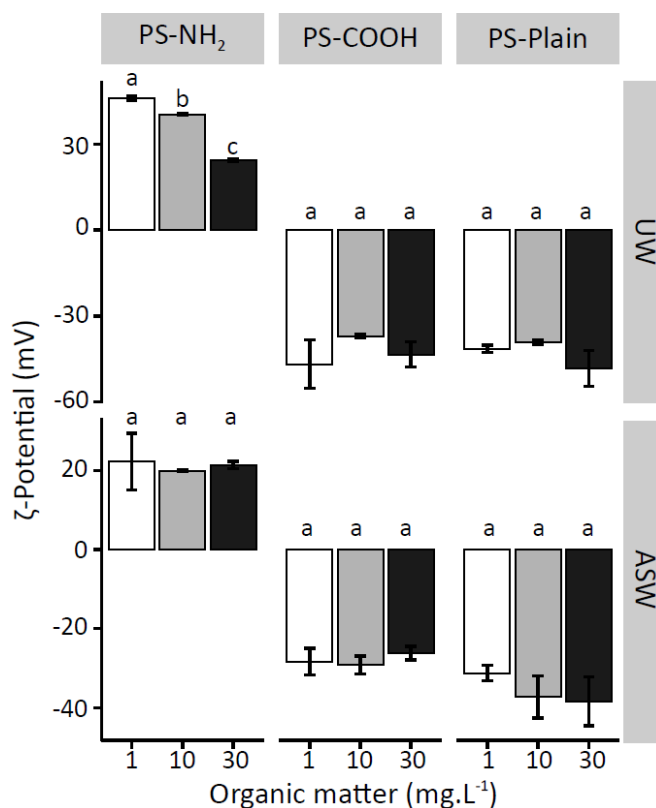


Figure 4. ζ -potential (mV) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) in two media (ultrapure water – UW or artificial seawater – ASW) according to three different doses of organic matter: 1 (white), 10 (light grey) and 30 (black) mg.L⁻¹. DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean \pm SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

d. Temporal stability

The PS-NH₂ remained at a nanometric scale in all media (UW and ASW with or without OM) but formed small homo-aggregates (PDI > 0.2) at T48h in UW (67.4 \pm 1.6 nm; ANOVA, F= 33.1, p-value < 0.01), ASW (71.8 \pm 1.3 nm; ANOVA, F= 181.5, p-value < 0.001) and ASW+OM (96.6 \pm 1.6 nm; ANOVA, F: 1300, p-value < 0.001) (Figure 5). In UW+OM at T48h, the PS-NH₂ did not aggregate and displayed a size of 56.3 \pm 0.3 nm (ANOVA, p-value > 0.05). Concerning the ζ -potential, no effect was recorded in ASW with or without organic matter (mean value = 23.8 \pm 2.9 mV) (Figure 6). However, significant decreases in UW (-12%; ANOVA, F= 47.9, p-value < 0.001) and UW+OM (-13%; ANOVA, F= 148.2, p-value < 0.001) were observed at T48h (UW: 45.7 \pm 1.3 mV; UW+OM: 40.4 \pm 0.4 mV) compared to T0 (UW: 51.4 \pm 0.4 mV; UW+OM: 46.7 \pm 0.8 mV).

The PS-COOH and PS-Plain suspensions stayed at a nanoscale in UW (+/- OM) despite the apparition of small aggregates (PDI > 0.2) at 48h for the PS-COOH in UW (68.2 ± 1.7 nm; ANOVA, $F= 50.1$, $p\text{-value} < 0.001$) and UW+OM (77.4 ± 4.6 nm; ANOVA, $F= 38.9$, $p\text{-value} < 0.001$) and at 24h for the PS-Plain only in UW (63.3 ± 5.0 nm; ANOVA, $F= 16.6$, $p\text{-value} < 0.01$) (Figure 5). In both ASW (ANOVA, $F= 42$, $p\text{-value} < 0.001$) and ASW+OM (ANOVA, $F= 50.6$, $p\text{-value} < 0.001$), the PS-COOH formed aggregates with an average size close to 2,000 nm at 24h and 4,000 nm at 48h (Figure 5). The size of the PS-Plain's aggregates in ASW was $1,884 \pm 223$ nm but exceeded the size limit of the zetasizer ($10 \mu\text{m}$) at T24h and T48h, thus no statistical analysis was performed even if a clear trend is obvious with bigger aggregates at T24h and T48h compared to T0. In ASW+OM, the PS-Plain formed bigger aggregates (ANOVA, $F= 209.7$, $p\text{-value} < 0.001$) at T24h ($8,343 \pm 228.3$ nm) compared to T0 ($3,034 \pm 187$ nm) and T48h ($4,637 \pm 480$ nm). For PS-COOH, the ζ -potential increased significantly in UW (+32%; ANOVA, $F= 23.73$, $p\text{-value} < 0.01$) and UW+OM (+27%; ANOVA, $F= 18.04$, $p\text{-value} < 0.01$) at T48h compared to T0 (Figure 6). A significant increase of the ζ -potential was observed over the time for the PS-Plain in UW (+55%; ANOVA, $F= 108.9$, $p\text{-value} < 0.001$). In UW+OM, no change was observed at T0 (-24.3 ± 0.4 mV) and T48h (-29.9 ± 0.4 mV) but a significantly lower value (ANOVA, $F= 8.1$, $p\text{-value} < 0.05$) was recorded at T24h (-45%; -48.8 ± 1.3 mV) (Figure 6). From 0 to 48h, no effect on the ζ -potential (ANOVA, $p\text{-value} > 0.05$) was observed in ASW with or without organic matter for the PS-COOH and PS-Plain (Figure 6).

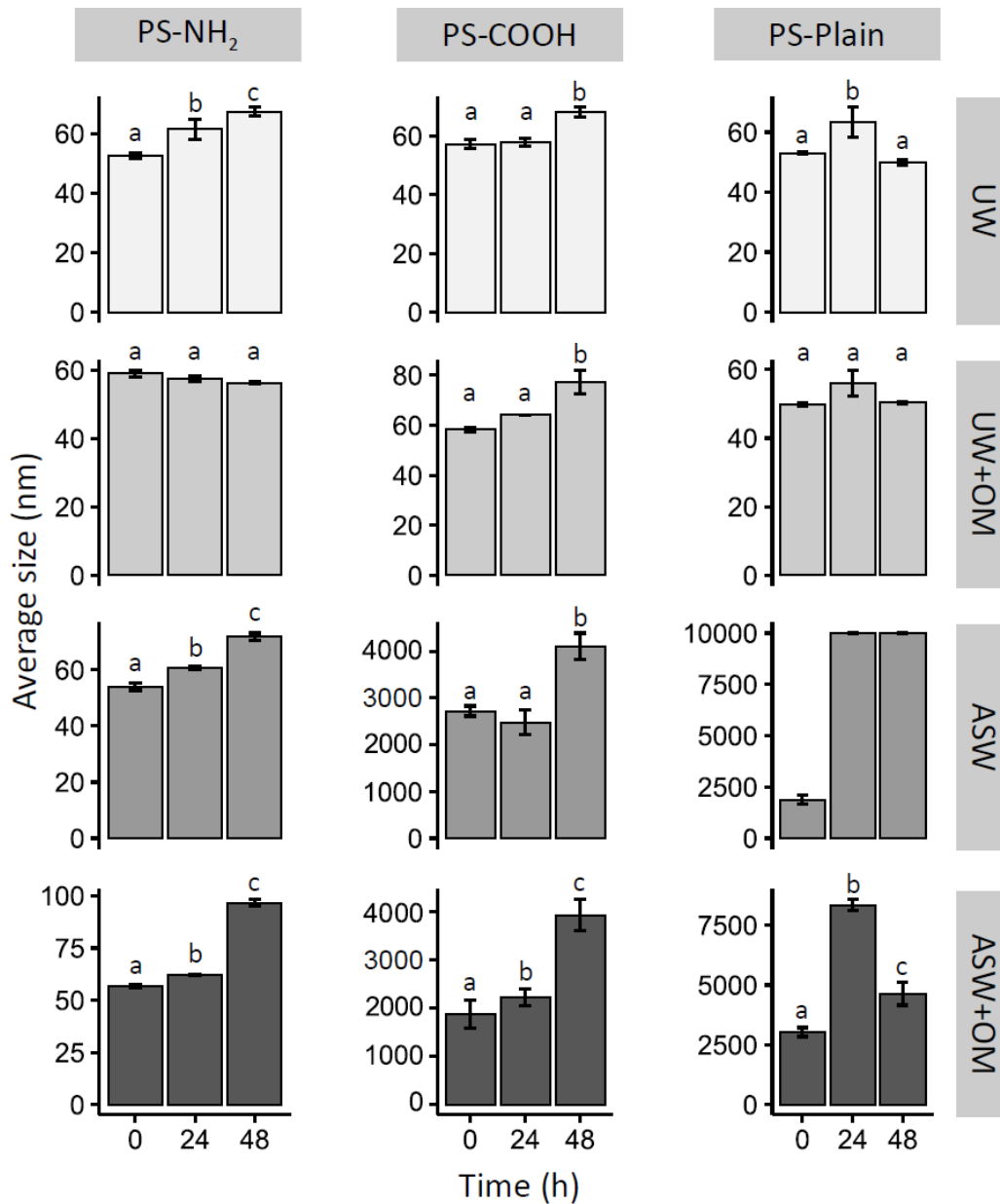


Figure 5. Average size (nm) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) over time (T0, T24h and T48h) in two media (ultrapure water – UW and artificial seawater – ASW) with or without organic matter (OM, 10 mg.L⁻¹). DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean ± SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

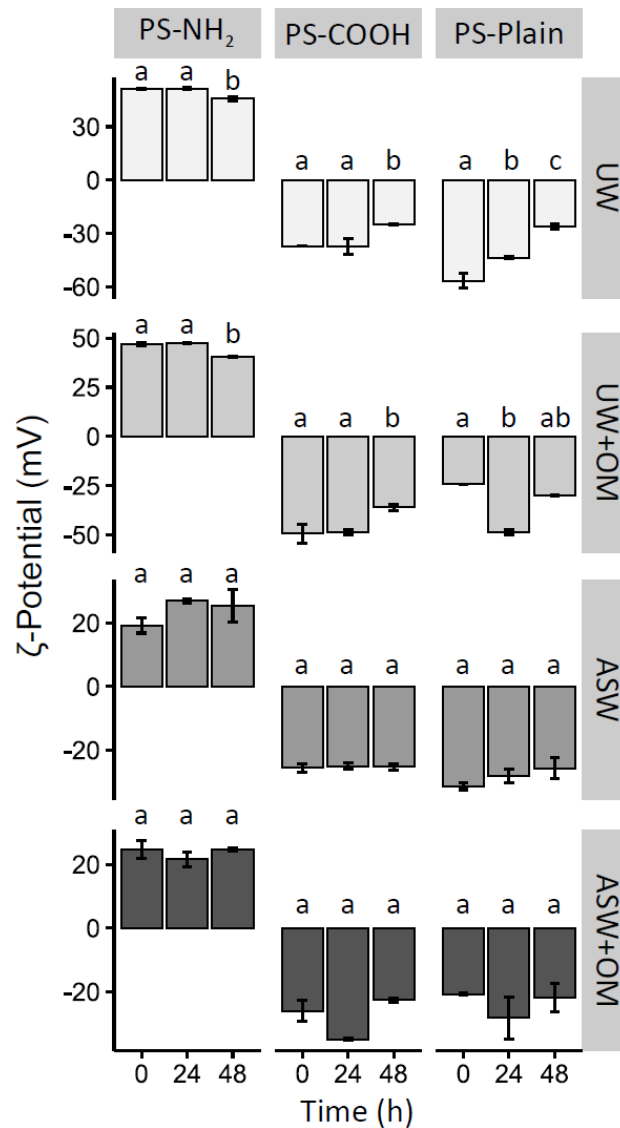


Figure 6. ζ -potential (mV) of three 50 nm nanoplastics (PS-NH₂; PS-COOH; PS-Plain) over time (T0, T24h and T48h) in two media (ultrapure water – UW and artificial seawater – ASW) with or without organic matter (OM, 10 mg.L⁻¹). DLS analysis were replicated 3 times and data are given as mean \pm SD. Multiple pairwise comparisons were performed using the Tukey's HSD method; homogeneous groups share the same letter.

4) DISCUSSION

In ultrapure water, all NP displayed a great stability and stayed at a nanometric scale over time because they presented a high positive or negative charge maintaining electrostatic repulsive forces limiting or reducing aggregation processes (El Badawy et al., 2010; Lin et al., 2010). In contrast, modifications of NP features (aggregation and ζ -potential) were observed in the presence of salts. The behavior of the PS-COOH and PS-Plain suspensions was drastically

affected in both artificial and natural seawater through the formation of microscale homo-aggregates. In contrast, the PS-NH₂ displayed high stability and stayed dispersed. Because particles were tested exactly in the same media, the observed behavior must be related to the surface functionalization as previously reported for other engineered nanomaterials (ENMs) (Liu et al., 2012). Consistent with our study, fast homo-aggregation of plain and carboxylate nano-polystyrene beads (25 and 50 nm) in seawater was previously demonstrated with aggregates larger than 1 μm (Della Torre et al., 2014; Tallec et al., 2018; Wegner et al., 2012). This large aggregation could have strong outcomes in aquatic environments because when the size of aggregates exceeds 1 μm , nanoparticles loss their Brownian behavior in favor of sedimentation processes (Klaine et al., 2008). Results differed from recent studies using carboxylate and plain nanopolystyrene of 100 nm where no homo-aggregation was observed under an increasing ionic strength (Cai et al., 2018; González-Fernández et al., 2018). This difference can be explained by the specific features of the particles (*e.g.* size, surface chemistry and heterogeneity) (Alimi et al., 2018). Homo-aggregation in seawater is one of the most frequent behavior observed for nanomaterials (Christian et al., 2008). It is due to interactions between the negative surface charge of NP and cationic elements naturally present in seawater such as calcium or sodium ions (El Badawy et al., 2010). Hence, the ζ -potential of the PS-COOH and PS-Plain became less negative in seawater decreasing the NP stability (Cai et al., 2018; Lin et al., 2010). Indeed, under the presence of salts, attractive forces (including van der Waals forces) and particles sticking efficiency increased according to the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) model resulting in homo-aggregation (Alimi et al., 2018; Liu et al., 2012). Thus, the difference of salinity between artificial (30 PSU) and natural (32 PSU) seawater can explained the observed variation of aggregation level of the PS-COOH and PS-Plain. The ionic strength increased from ASW to FSW, as well as the screening of the repulsive electrostatic interactions. In the presence of an excess of added salt, the particles diffuse ion double layer reduces and possible specific ions condensation might occur and decrease the particles net surface charge density. Moreover, in natural seawater, other molecules such as extracellular polymeric substances (EPS) produced by bacteria can also intensify aggregation in comparison to an artificial and controlled medium (Summers et al., 2018). Regarding the PS-NH₂, its strong stability in all media was presumably due to a positive coating characterized by a low effect of the ionic strength (particles and homo-aggregates stayed at a nanometric scale) in comparison to the two other particles tested. Despite a

decrease in the ζ -potential when particles are suspended in seawater, it appears sufficiently high to ensure repulsive mechanism. Overall, the nature of the surface groups and the particles interface has a stronger influence than the nature of the core polymer on the particles aggregation (Liu et al., 2012). To thoroughly test this hypothesis, particles of different nature (PE, PP, PS, non-plastic material) presenting the same coating should be compared in controlled experimental solutions.

Humic substances (HA) – used as proxy of dissolved organic matter (DOM) – had negligible effect on the behavior of all particles in comparison to the presence of salts. Usually, organic matter tends to stabilize nanoparticles by increasing steric surface repulsive forces. The presence of cations can overcome and disrupt this stabilization by several mechanisms (*e.g.* electrical repulsion compression) promoting aggregation (Zhang et al., 2009). In agreement with our study, divalent cations (Mg^{2+} and Ca^{2+}) triggered homo-aggregation of carbon nanotubes despite the presence of organic matter (reviewed by Christian et al., 2008). Only for the PS-Plain, HA had a stabilizing impact in seawater causing a partial disaggregation over the temporal experiment (between T24h and T48h) presumably due to an increase in the steric repulsion level. In contrast to previous studies using nanomaterials (Baalousha, 2009; Loosli et al., 2013), no shift in the ζ -potential of NP was observed, explaining the negligible effect of the DOM. This fact is possibly linked to the concentration of HA used in the present study. At a concentration of 100 mg.L^{-1} , HA caused a shift in the ζ -potential of iron oxide nanoparticles whilst no effect was perceived at 10 mg.L^{-1} (Baalousha, 2009) which is consistent with our results at the same concentration. In ultrapure water, an adsorption of HA on the PS-NH₂ is hypothesized with a decrease of the ζ -potential along the increasing gradient of HA doses. Indeed, the anionic groups of HA interact easily with the positive surface charge of the PS-NH₂. This adsorption reduced the net charge density and resulted in a small aggregation at the highest HA dose, even though the PS-NH₂ mean size distribution always stayed below 100 nm. Overall, DOM have limited effects on NP behavior in our experimental design but a recent study demonstrated that 25 nm NP can in reverse affect the assembling of DOM with suspected consequences on carbon flux in oceans according to the environmental concentration of NP (Chen et al., 2018).

The temporal analysis demonstrated that NP formed evolving dynamic structure. Indeed, an increase of the homo-aggregation level is reported over time for all NP tested in ASW and

ASW+OM. Hence, it is highly plausible that NP will not be found individually in oceans. Owing to the high aggregation level observed here, if NP have a negative surface charge (acquired naturally or after weathering in rivers) as observed in marine environment (Fotopoulou and Karapanagioti, 2012), the risk of an intake in oceans from freshwater appears therefore low. However, certain events can influence the retention of plastic particles in rivers such as flooding leading to a washout and a huge export of plastic debris to marine systems as recently described in rivers around urban area of the United Kingdom (70% of microplastics were exported by the flooding) (Hurley et al., 2018). Every year, between 1.15 and 2.41 MT of plastic debris go into oceans from rivers (Lebreton et al., 2017). Thus, in future models or experiments, it will be crucial to consider the behavior of NP with a temporal and seasonal aspect as reported with silver nanoparticles (Ellis et al., 2018).

In the context of increasing number of studies using NP to highlight their toxicity on freshwater (Besseling et al., 2014; Cui et al., 2017; Mattsson et al., 2017) and marine (Canesi et al., 2016; Tallec et al., 2018) organisms, this study revealed that it is unavoidable to properly characterize NP behavior in the experimental systems. Indeed, the risk assessment is completely modified if particles stayed individual or formed aggregates in the medium (Lowry et al., 2012). The presence of aggregates for PS-COOH and PS-Plain in seawater would be part of their lower toxicity observed in Tallec et al. (2018) compared to PS-NH₂ for which we showed in the present study strong stability at nanometric scale. Then, because the PS-Plain formed microscale aggregates in seawater but not in freshwater, the low toxicity of the PS-Plain observed in our previous study on oyster planktonic-stages (Tallec et al., 2018) is far from comparable to the severe outcomes in the freshwater crustacean *Daphnia galeata* (Cui et al., 2017). Likewise, for a given biological model, various results may be observed according to the medium tested. For instance, the toxicity of the PS-NH₂ appeared stronger on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis* in artificial seawater ($EC_{50} = 2.75 \pm 0.67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) than in natural seawater ($EC_{50} = 6.62 \pm 0.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Manfra et al., 2017). Colloids, organic matter, macromolecules (e.g. EPS, proteins) or compounds released by organisms in the water, at their epithelium interface or inside the organism, are likely to interact with nanoparticles (corona formation) and change their behavior and bio-availability and consequently potential harmful effects (Lowry et al., 2012). Because, this corona can be specific according to the surface functionalization (Lundqvist et al., 2008), an examination of the influence of natural

compounds may be one priority for the ecotoxicological community. For instance, changes in the toxicity of various nanomaterials such as polystyrene (Nasser & Lynch, 2016), titanium dioxide (Yang et al., 2012), silver (Fabrega et al., 2009), multiwalled carbon nanotubes (Edgington et al., 2010) were reported under co-exposures with humic acids or macromolecules.

We conclude that the surface functionalization is deemed to be a major parameter determining the fate of 50 nm NP in our experimental design and potentially in aquatic environments. The data presented here, complemented by previous studies including the recent publication of Cai et al. (2018) with 100 nm PS-Plain, emphasize the need for a thorough characterization of NP considering at least size and coating, in relevant environments in order to better design experiments, understand end-points and define toxicity thresholds for this new threat. More experiments are required to understand effect of other environmental conditions on NP behavior especially the weathering of particles which can affect their properties as previously observed with MP (Rummel et al., 2017). These results provide new experimental data to consider in the assessment of NP fate in future modeling studies.

A RETENIR

- **Le comportement (*i.e.* état d'agrégation) des nanosphères (50 nm) de polystyrène (nano-PS) est dépendant de la fonctionnalisation de surface des particules.**
- **Les particules aminées (50 nm ; PS-NH₂) présentent une forte stabilité dans l'ensemble des milieux testés tandis que les particules neutres et carboxylées perdent rapidement leur stabilité dans l'eau de mer, aboutissant à la formation d'agrégats micrométriques.**
- **L'induction des processus d'agrégation des nano-PS commerciaux de 50 nm est principalement gouvernée par la force ionique du milieu. Les concentrations de matière organique dissoute utilisées dans notre système expérimental n'entraînent pas de changements radicaux dans le comportement des particules.**
- **Au regard du comportement variable selon la particule et le milieu, la caractérisation du comportement des nano-PS apparaît comme obligatoire pour comprendre les effets toxiques de ces particules sur les organismes aquatiques.**

CHAPITRE 4

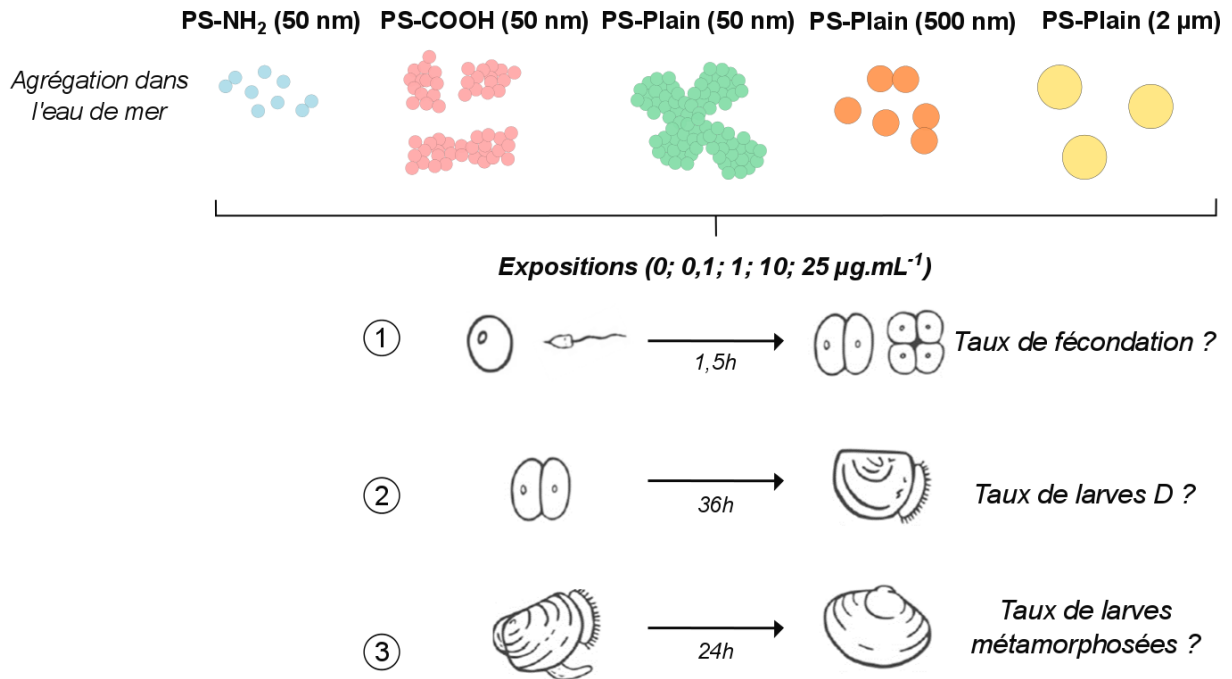
TOXICITE DES NANO- ET MICROPLASTIQUES SUR TROIS ETAPES SENSIBLES DU DEVELOPPEMENT PELAGIQUE DE L'HUÎTRE

PREAMBULE

Le développement larvaire pélagique de l'huître creuse assure la stabilité des populations naturelles et donc des communautés associées aux récifs. Cependant, ce développement larvaire repose sur un équilibre fragile et certaines étapes sont dites sensibles comme : (1) la rencontre des gamètes menant à la fécondation (Barros et al., 2013; Bayne, 2017) ; (2) le développement embryonnaire associé à de multiples transformations du fait des processus intenses de division cellulaire et d'organogénèse (Gamain et al., 2016; Akcha et al., 2012; Mai et al., 2018; Bayne, 2017) ; (3) la métamorphose qui nécessite une allocation énergétique importante pour permettre les modifications morphologiques associées (*e.g.* croissance de la coquille et des branchies, pertes du pied et du velum, synthèse de la colle fixatrice) (Di Poi et al., 2013; Bayne, 2017; Foulon et al., 2018).

Ces trois étapes de développement sont classiquement étudiées pour évaluer la toxicité des différents contaminants anthropiques comme les pesticides (Akcha et al., 2012; Mai et al., 2013; Mottier et al., 2013), les hydrocarbures (Vignier et al., 2017; Boulais et al., 2018), les métaux (Brooks et al., 2007; Gamain et al., 2017), les résidus pharmaceutiques (Di Poi et al., 2013) ou encore les nanoparticules (Ringwood et al., 2009; 2010). En revanche, dans le cadre de la contamination des océans par les débris plastiques, la sensibilité de ces étapes n'a – à ce jour – jamais été évaluée, à l'inverse du stade adulte (Sussarellu et al., 2016) et du stade véligère (Cole & Galloway, 2015). Pourtant, ces étapes représentent des modèles biologiques robustes et pertinents pour déterminer les seuils critiques d'une toxicité aiguë car les protocoles disponibles pour évaluer leur sensibilité permettent de tester une multitude de particules et de concentrations du fait des faibles volumes d'eau à traiter et du temps d'expérience réduit (maximum 36h ici). Ceci permet donc de respecter une recommandation majeure pour définir la toxicité des particules plastiques sur la vie aquatique, *i.e.* l'utilisation d'expériences en dose-réponse pour faire face aux incertitudes liées aux concentrations environnementales actuelles et futures des petits déchets plastiques (Koelmans et al., 2017; Paul-Pont et al., 2018). Par rapport au chapitre 3, deux autres types de particules neutres (500 nm et 2 µm) ont été ajoutés dans ce chapitre afin d'évaluer un potentiel effet lié à la taille des particules. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est le suivant :

CARACTERISER LA TOXICITE DES NANO- ET MICROSPHERES DE POLYSTYRENE SUR LA FECONDATION, LE DEVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE ET LA METAMORPHOSE DE L'HUÎTRE



Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue en 2018 dans la revue *Environmental Pollution*.

Environmental Pollution 242 (2018) 1226–1235



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Environmental Pollution

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



Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos[☆]



Kevin Tallec^{a,*}, Arnaud Huvet^a, Carole Di Poi^a, Carmen González-Fernández^b,
Christophe Lambert^b, Bruno Petton^a, Nelly Le Goïc^b, Mathieu Berchel^c,
Philippe Soudant^b, Ika Paul-Pont^b

^a Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 UBO/CNRS/IRD/Ifremer, CS 10070, 29280, Plouzané, France

^b Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer – Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d'Urville, 29280, Plouzané, France

^c Université de Brest, Université Européenne de Bretagne, CNRS UMR 6521, CEMCA, IFR 148 ScInBios, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, 29238, Brest, France

ABSTRACT

In the marine environment, most bivalve species base their reproduction on external fertilization. Hence, gametes and young stages face many threats, including exposure to plastic wastes which represent more than 80% of the debris in the oceans. Recently, evidence has been produced on the presence of nanoplastics in oceans, thus motivating new studies of their impacts on marine life. Because no information is available about their environmental concentrations, we performed dose-response exposure experiments with polystyrene particles to assess the extent of micro/nanoplastic toxicity. Effects of polystyrene with different sizes and functionalizations (plain 2- μm , 500-nm and 50-nm; COOH-50 nm and NH₂-50 nm) were assessed on three key reproductive steps (fertilization, embryogenesis and metamorphosis) of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Nanoplastics induced a significant decrease in fertilization success and in embryo-larval development with numerous malformations up to total developmental arrest. The NH₂-50 beads had the strongest toxicity to both gametes (EC₅₀ = 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and embryos (EC₅₀ = 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), showing functionalization-dependent toxicity. No effects of plain microplastics were recorded. These results highlight that exposures to nanoplastics may have deleterious effects on planktonic stages of oysters, presumably interacting with biological membranes and causing cyto/genotoxicity with potentially drastic consequences for their reproductive success.

Key-words: Nanoplastics; Microplastics; Oyster; Gametes; Embryos.

1) INTRODUCTION

Mismanagement of plastic wastes is one of the major concerns of the scientific community in the 21st century (Galloway et al., 2017). The exponential use of plastics by human society since 1950 has led to a significant release of wastes into the environment (Cole et al., 2011; Geyer et al., 2017). Between 13,200 and 34,800 tons of plastic debris were estimated to have been introduced daily into the oceans in 2010, and this amount is expected to increase by an order of magnitude by 2025 (Jambeck et al., 2015). Today, plastic debris are widespread and ubiquitous in marine environments from the sea surface (Eriksen et al., 2014) to the sediment (Van Cauwenberghe et al., 2015), including in remote areas such as polar regions (Cozar et al., 2017), deep-sediments (Bergmann et al., 2017) and desert islands (Lavers and Bond, 2017).

Microplastics (MP) are defined as particles with a size less than 5 mm (Galloway et al., 2017), originating from manufactured beads/fibers (primary MP) or weathering of larger waste (secondary MP). They represent the most abundant plastic items in oceans in terms of the number of particles per unit of water (>92% of floating plastics) (Cole et al., 2011; Eriksen et al., 2014). Recently, a new class of debris was described, namely nanoplastics (NP), defined as particles <100 nm (Galloway et al., 2017) or <1000 nm (Gigault et al., 2018). The definition used in the present study (<100 nm) refers to the usual definition of nanoscale; *i.e.* the point where the properties of a material change (higher surface area effect and interaction with biological membranes) (Klaine et al., 2012). Their production has been demonstrated by mechanical fragmentation (Lambert and Wagner, 2016), photo-degradation (Gigault et al., 2016) or biodegradation (Dawson et al., 2018) of larger items. Likewise, similarly to MP, primary NP from cosmetics (Hernandez et al., 2017), 3D-printing wastes (Stephens et al., 2013) or drugs (Lusher et al., 2017) are suspected to enter the oceans directly. At sea, the presence of plastic particles lower than 1 µm has been recently argued in the Atlantic Gyre (Ter Halle et al., 2017). However, owing to a lack of methods, no or very little information is currently available about the environmental concentrations of NP and small MP (<100 µm), respectively (e.g. Huvet et al., 2016). Their environmental concentrations can only be estimated, for example following a power-law increase (around a 2.2 factor) from sea surface samples as recently proposed (Erni-Cassola et al., 2017).

Despite the lack of knowledge concerning MP and NP distributions in the oceans, a consensus exists about the threat posed by small plastic particles for aquatic life (GESAMP, 2015). Effects

of MP on feeding behavior (Cole et al., 2013; Ogonowski et al., 2016), energy balance (Wright et al., 2013; Watts et al., 2015), reproduction (Sussarellu et al., 2016; Gardon et al., 2018), and immune system (Avio et al., 2015; Paul-Pont et al., 2016) were demonstrated and ecological impacts can be discerned (Rochman et al., 2015; Green et al., 2016; Galloway et al., 2017). Furthermore, at the nanoscale, specific effects are expected as result of the physico-chemical properties of NP (Mattsson et al., 2015a; da Costa et al., 2016). Nanoparticles have a much greater surface area/volume ratio than microparticles which enhances their reactivity in aquatic environments (Mattsson et al., 2015a; Rocha et al., 2015). Likewise, the risk of translocation and overall transfer into the tissues of organisms increases at the nanoscale. For instance, fluorescent nanopolystyrene beads (nano-PS; 50 nm) seemed dispersed in the body of *Paracyclopsina nana* after ingestion, while micro-PS (500 nm and 6 μ m) remained in the digestive tract with a shorter retention time (Jeong et al., 2017). Initial assessments of NP toxicity highlighted risks to survival, feeding activity, embryogenesis, immune system, fecundity (number of offspring and/or pregnancy rate), metabolism (changes in amino acid composition, liver dysfunctions and energy balance) and behavior at a wide range of trophic levels including phytoplankton (Besseling et al., 2014), echinoderms (Della Torre et al., 2014), rotifers (Jeong et al., 2016), crustaceans (Cui et al., 2017; Jeong et al., 2017), bivalves (Wegner et al., 2012; Canesi et al., 2016) and fish (Mattsson et al., 2015b; Mattsson et al., 2017).

In the adult Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bayne et al., 2017), polystyrene microbeads of 2 and 6 μ m were shown to interfere considerably with gametogenesis, in terms of quantity and quality of produced gametes, leading to undesirable effects on the performance of offspring despite no direct exposure (Sussarellu et al., 2016). Because *C. gigas* has external fertilization, the free-living stages (*i.e.* gametes, embryos and larvae) must cope with the stress occurring in estuarine and coastal marine habitats where oysters live. To date only one study has investigated the impacts of plastic debris exposure to Pacific oyster larvae using 1 and 10 μ m MP with no effect on their growth rate or survival (Cole and Galloway, 2015). These authors also studied the ingestion of polystyrene particles spanning from 70 nm to 20 μ m in size, but no toxic endpoint was monitored following exposure to this size class. For gametes, carboxylic nanoplastics (100 nm) induced in oyster spermatozoa an increase in ROS production leading to a potential oxidative stress (Gonzalez-Fernandez et al., 2018). In this context, the present study aims to assess the potential adverse effects of plastic items on Pacific oyster free-living

stages, targeting specifically the essential steps of fertilization, embryo-larval development and metamorphosis, so as to provide a view over the complete life cycle in addition to the adult exposure of Sussarellu et al. (2016) (Figure 1). Here, oyster gametes, embryos and larvae were exposed to five types of polystyrene particles, varying in size from NP to MP (50 nm; 500 nm; 2 µm) and in surface functionalization (no functional group, presence of carboxyl or amine groups) to examine a size effect between MP and NP (plain particles), as well as a surface properties effect between NP exhibiting different functionalizations. The behavior of the particles was measured in seawater using Dynamic Light Scattering (DLS) to assess particle aggregation and modifications of the mean surface charge.

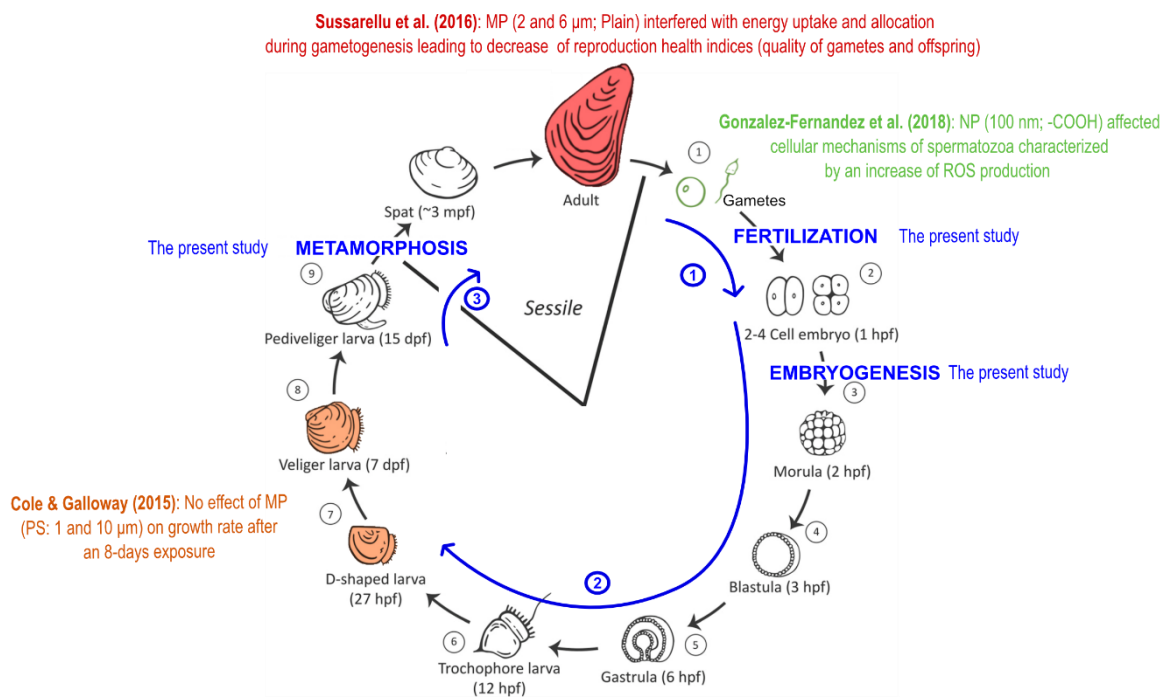


Figure 1. Life cycle of oyster showing the results of exposures on different stages to MP/NP. This scheme was modified from Vogeler et al. (2016).

2) MATERIALS AND METHODS

a) Micro- and nanoplastics

Five commercially available polystyrene (PS) beads were purchased from Polysciences/Bangs Laboratories and stored at 4°C prior to experiments: 50-nm, 500-nm and 2-µm beads without functionalization (Plain), and 50-nm beads coated with carboxyl (COOH-50) or amine groups

(NH₂-50). Before each handling, particles were vortexed to prevent particle aggregation and insure good suspension homogenization. Commercial suspensions were in ultrapure water (UW) with Tween-20[®] surfactant (<0.1%) to limit aggregation; Tween-20[®] had previously been demonstrated to be innocuous for marine invertebrates at this dose (Ostroumov, 2003). Raman microspectroscopy analysis confirmed the PS nature of the polymer for all beads and no additional features were observed in the PS spectra across all particles (Figure S1). All tests (DLS and exposures) were performed with the same batch of particles.

b) Dynamic Light Scattering (DLS) analyses

DLS (Zetasizer NanoZS; Malvern Instruments; United Kingdom) was used to determine the aggregation state (polydispersity index – PDI; Arbitrary Units (A.U.)), the mean size of particles/aggregates (Z-average; nm) and the mean surface charge (ζ -potential; mV) of MP/NP in two media: UW, as delivered by the supplier, and natural filtered seawater collected from the Bay of Brest (FSW; 1- μ m filtered and UV-treated; pH 8.1 and 34 PSU). When PDI exceeds 0.2, particles were considered to be aggregated. Measurements were performed in triplicate at 20°C (similar to the T°C used for bioassays) and a concentration of 100 μ g/mL at T0 and T24h, each containing 13 runs (10 s.measure⁻¹) for PDI and Z-average, and 40 runs (10 s.measure⁻¹) for ζ -potential as conducted by Gonzalez-Fernandez et al. (2018). This concentration was used for DLS analysis owing to the presence of artifacts at lower concentrations.

c) Suspensions of MP/NP for bioassays

MP and NP stock suspensions were prepared in UW at 1000 μ g/mL, while working suspensions were prepared in FSW. Four concentrations of beads were tested: 0.1, 1, 10 and 25 μ g/mL, plus a control group (0 μ g/mL), in order to identify toxicity thresholds. A total of 25 treatments (5 particle types \times 5 concentrations) were then tested on the three early stages (gametes, embryos and larvae; see below).

d) Biological material

Oysters from 2 cohorts, produced in 2014 and 2015 according to Petton et al. (2015), were deployed in 2016 in the bay of Brest and in the Marennes-Oléron basin (France). In the summer of 2017, oysters were randomly sampled to collect their gametes for assays on gametes and embryo-larval development. For the metamorphosis assay, pediveliger larvae

(21 days old) were purchased from a commercial hatchery (Société Atlantique de Mariculture, France).

e) Gamete assay

Sperm from two males and oocytes from three females were collected by stripping the gonad. This was repeated in five replicates, involving a total of 10 males and 15 females. Sperm were then sieved at 100 μm , and oocytes at 100 μm then 20 mm to eliminate debris (Steele and Mulcahy, 1999). Oocytes were diluted in 2 L and sperm in 100 mL of FSW maintained at $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (mean \pm SD). Spermatozoa mobility and round shape of oocytes, used as proxies of gamete quality, were checked by microscopy (Olympus BX51; $\times 10 - 20$ magnification with phase contrast for sperm) (Fabbri et al., 2014). Spermatozoa and oocyte concentrations were estimated by flow cytometry (EasyCyte Plus cytometer; Millipore Corporation; USA) (Le Goïc et al., 2014, 2013). Gametes (1000 oocytes/mL; 100:1 spermatozoa:oocyte ratio) were placed at the same time in 40 mL glass vials filled with 30 mL of FSW at $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, containing the MP or NP suspensions (5 particle types \times 5 concentrations; 5 replicates per treatment).

After 1.5 h, samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to estimate the fertilization yield under a microscope (Zeiss Axio Observer Z1; $\times 10 - 40$ magnification; observation of 150 oocytes per vial). The fertilization yield was defined as: (number of fertilized oocytes/[number of fertilized and unfertilized oocytes]) \times 100 (Martínez-Gomez et al., 2017). An oocyte was considered to be fertilized when polar bodies and cell divisions were observed.

f) Embryo-larval assay

The standardized AFNOR procedure (AFNOR XP-T-90-382) was used to perform this assay. Fertilization was achieved in five replicates with gametes collected from five males and five females per replicate (total: 25 males and 25 females) following the procedure described above. Once fertilization was achieved in a 2-L glass beaker filled with 1.5 L of FSW with high fertilization yields ($>90\%$; verified under a Zeiss Axio Observer Z1; $\times 10-40$ magnification), 1500 embryos were collected per replicate and diluted at a concentration of 60 embryos/mL in 40 mL glass vials filled with 25 mL of FSW ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) containing the MP or NP suspensions (5 particle types \times 5 concentrations; 5 replicates per treatment). After 36 h in dark conditions, samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to evaluate the D-

larval yield under a microscope (Zeiss Axio Observer Z1; $\times 10-63$ magnification; observation of 100 larvae per vial). The D-larval yield was defined as: (number of normal D-larvae/number of normal and abnormal D-larvae) $\times 100$ (Di Poi et al., 2014). A normal D-larvae indicated embryogenic success, while an abnormal larva presented mantle, shell and/or hinge malformations, or developmental arrest at the embryonic stage (Mottier et al., 2013).

g) Metamorphosis assay

The bioassay at the metamorphosis stage was performed as described in Di Poi et al. (2014). Briefly, a total of 65 ± 15 pediveliger larvae per treatment were exposed to plastic particles in 12-well microplates (NUNC© with the Nunclon™ Delta surface treatment) filled with 1.5 mL of FSW containing the MP or NP suspensions (5 particle types \times 5 concentrations; 6 replicates per treatment) for 24 h at $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Metamorphosis of oyster larvae was stimulated by adding 10^{-4} M epinephrine (Sigma-Aldrich; CAS number: 51-43-4) (Coon et al., 1990) immediately after the start of the exposure (Di Poi et al., 2014). After the 24 h incubation, samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to determine the metamorphosis yield under a microscope (Leica DM-IRB; $\times 10$ magnification; all larvae were observed). The metamorphosis yield was defined as: (number of metamorphosed larvae/total number of larvae) $\times 100$. A metamorphosed larvae is characterized by a significant growth of shell and gills, and loss of the velum and foot (Di Poi et al., 2014).

h) Statistical analyses

Statistical analyses and graphical representations were produced using the R software. Percentages were analyzed after angular transformation. Normality and homogeneity of variance were verified by the Shapiro-Wilk and Levene methods, respectively. The Student's t-test was used to compare particle behavior (size and ζ -potential) between UW and FSW. For effects of particle concentrations on fertilization, embryo-larval development and metamorphosis success, parametric (ANOVA) or non-parametric (Kruskal-Wallis) analyses of variance were followed by post-hoc methods (Tukey or Conover) for pairwise comparisons when differences were detected. Whenever a dose-response pattern was observed, the package “DRC” was used to determine the half maximal effective concentration (EC_{50}), defined as the concentration of a substance leading to a significant effect in 50% of the population. All data are represented by means \pm standard deviation (SD).

3) RESULTS

a) Particle characterization

The 2- μm and 500-nm beads formed small aggregates in UW (PDI>0.2), whereas all NP remained in their original form (PDI<0.2; Table 1). For all particles, the aggregation state or size of aggregates increased significantly when added to seawater ($p < 0.01$). Only the NH₂-50 formed aggregates at the nanometer scale (mean \pm SD; 96.5 \pm 2.0 nm) in FSW. The Plain-50 (5951.0 \pm 264.3 nm) and COOH-50 (3735.0 \pm 443.8 nm) formed larger aggregates than the 2- μm (3113.7 \pm 32.3 nm) and 500-nm (1620.7 \pm 188.8 nm) beads in FSW. All particles presented a negative surface charge in UW and FSW, with the exception of NH₂-50 that exhibited a positive surface charge in all media. The seawater systematically buffered the charge of all MP/NP with mean surface charge values decreasing towards zero in seawater compared to UW ($p < 0.01$; Table 1). No significant changes ($p > 0.05$) of charge and aggregation were observed between T0 and T24h in FSW for all particles except the Plain-50 which formed bigger aggregates exceeding 10 μm in FSW ($p < 0.05$; Table S1).

Table 1. Mean size (in nm), aggregation state (PDI in arbitrary units, A.U.) and charge (ζ -Potential in mV) of polystyrene particles in ultrapure water (UW), and UV-treated 1- μm filtered seawater (FSW). Analyses were performed by Dynamic Light Scattering (DLS) at 20°C in triplicate and data are represented as means \pm SD. Comparisons were made between media using the Student's t-test; * : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Media	Particles	Commercial Size (nm)	Particle/Aggregate Size (nm)	PDI (A.U.)	ζ -Potential (mV)
UW	2- μm	2,000	2681.0 \pm 50.5	0.35 \pm 0.01	-44.8 \pm 0.9
	500-nm	500	774.3 \pm 29.3	0.46 \pm 0.05	-67.8 \pm 7.0
	COOH-50	50	55.9 \pm 0.4	0.06 \pm 0.01	-62.1 \pm 0.4
	Plain-50	50	49 \pm 0.4	0.03 \pm 0.02	-70.1 \pm 1.4
	NH ₂ -50	50	53.3 \pm 2.3	0.12 \pm 0.02	44.0 \pm 1.5
FSW	2- μm	2,000	3113.7 \pm 32.3**	0.42 \pm 0.02	-30.5 \pm 1.5***
	500-nm	500	1620.7 \pm 188.8*	0.66 \pm 0.08	-28.3 \pm 0.6**
	COOH-50	50	3735.0 \pm 443.8**	0.48 \pm 0.01	-13.8 \pm 0.8***
	Plain-50	50	5951.0 \pm 264.3***	0.60 \pm 0.05	-31.3 \pm 4.4**
	NH ₂ -50	50	96.5 \pm 2.0***	0.52 \pm 0.01	15.6 \pm 2.7***

b) Gamete assay

The control treatment (0 plastic) presented a high fertilization yield (mean \pm SD; $92.3 \pm 1.0\%$), demonstrating the good quality/maturity of the gametes and the quality of the FSW. The 2- μm (Figure 2A) and 500-nm (Figure 2B) particles had no effect on the fertilization yield relative to the control group ($p > 0.05$). Exposure to Plain-50 (Figure 2C) led to significant reductions in fertilization ($p < 0.05$) of 56 and 73% for 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, associated with an EC_{50} value of $12.3 \pm 7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$. The COOH-50 particles (Figure 2D) induced significant decreases ($p < 0.05$) of 4, 66 and 93% for 1, 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with an EC_{50} value of $7.8 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{mL}$. The NH_2 -50 exhibited the strongest toxicity inducing significant decreases ($p < 0.05$) in the fertilization yield of 6, 75 and 91% for 1, 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ associated with an EC_{50} value of $4.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2E; Figure S2).

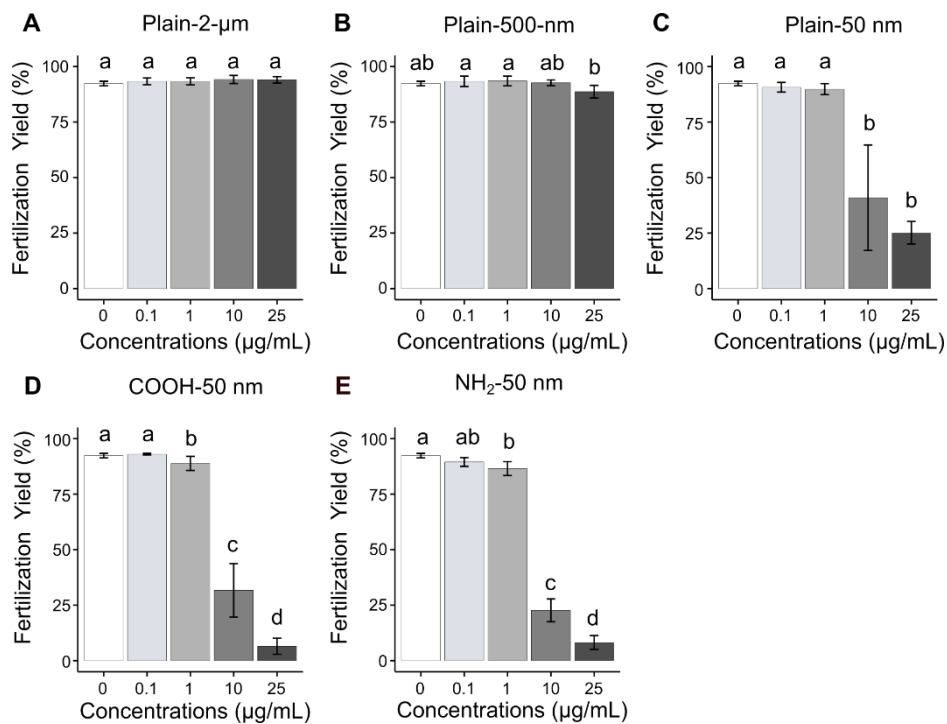


Figure 2. Fertilization yield (%) after 1.5 h exposure of oyster gametes ($1,000 \text{ oocytes} \cdot \text{mL}^{-1}$; 100:1 spermatozoa:oocyte ratio) to (A) 2- μm , (B) 500-nm, (C) Plain-50 nm, (D) COOH-50 nm, (E) NH_2 -50 nm polystyrene beads at five concentrations: 0, 0.1, 1, 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The assay was replicated five times and data are represented as means \pm SD. Multiple comparisons were made between treatments using Tukey's HSD (500-nm, NH_2 -50) or Conover (Plain-50, COOH-50) methods at the 5% alpha level; homogeneous groups are indicated by the same letter.

c) Embryo-larval assay

Exposure to 2- μm (Figure 3A) and 500-nm (Figure 3B) did not cause any significant effect on embryo-larval development compared with the control treatment (mean \pm SD; $93 \pm 1\%$) at 36 h post fertilization (hfp). The D-larval yield was significantly reduced ($p < 0.01$) by exposure to 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Plain-50 (Figure 3C) leading to a mean reduction of 9 and 17%, respectively. This was insufficient to estimate a robust EC_{50} value for the Plain-50 (Figure S3). Exposure to COOH-50 led to a mean reduction of 32 and 100% after exposure to 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Figure 3D) with an EC_{50} value of $11.6 \pm 10.5 \mu\text{g}/\text{mL}$. The highest toxicity was observed for the NH_2 -50 with a significant decrease of 6% ($p < 0.05$) in the D-larval yield at the lowest concentration (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by a total inhibition (100% reduction) of the embryo-larval development success for higher doses giving an EC_{50} value of $0.15 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 3E; Figure S3).

Compared to the control group where D-larvae appeared healthy (Figure 4A), Plain-50 (10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and COOH-50 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) caused numerous mantle or/and shell malformations (Figures 4A-B). Only dead embryos/larvae were observed at the highest concentration of COOH-50 (Figure 4D) whereas mainly cell debris were observed upon exposure to the three highest doses of NH_2 -50 (Figures 4E-F). In both cases, this represents evidence of developmental arrest.

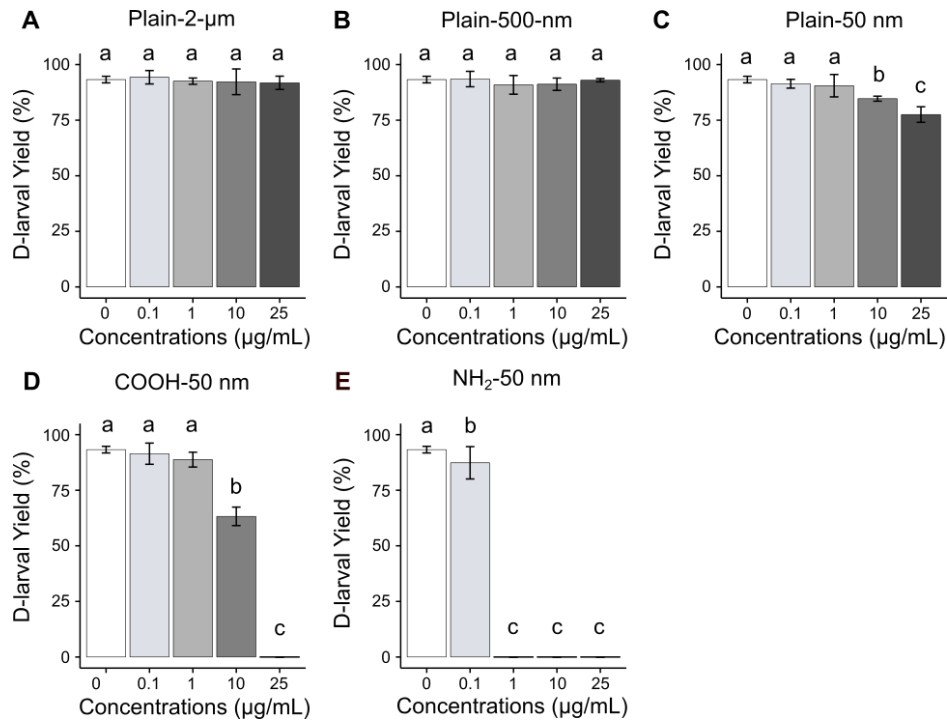


Figure 3. D-larval yield (%) after 36 h exposure of fertilized eggs to (A) 2-µm, (B) 500-nm, (C) Plain-50 nm, (D) COOH-50 nm, (E) NH₂-50 nm polystyrene beads at five concentrations: 0, 0.1, 1, 10 and 25 µg/mL. The assay was replicated five times and data are represented as means ± SD. Multiple comparisons were made between treatments using Tukey's HSD (Plain-50, COOH-50) or Conover (NH₂-50) methods at the 5% alpha level; homogeneous groups are indicated by the same letter.

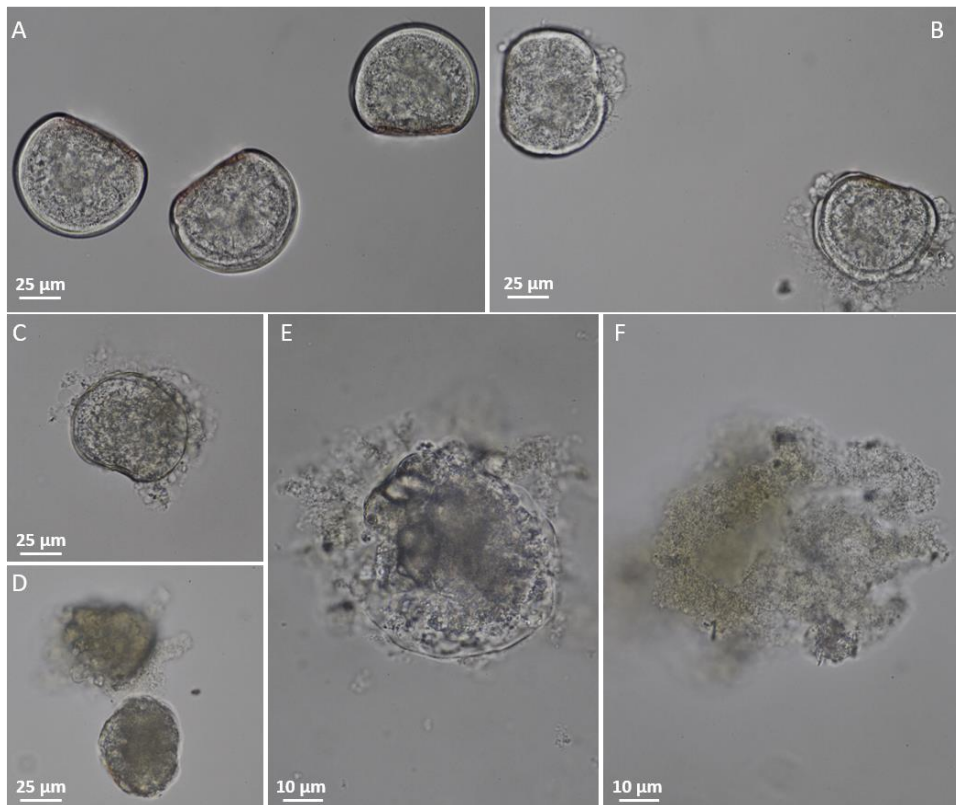


Figure 4. Microscopy panel of embryo-larval development success after 36 h exposure to polystyrene nanobeads compared with normal D-larvae observed in the control treatment (A). Larvae with shell and/or mantle malformations after exposure to Plain-50 (25 μg/mL) (B), and COOH-50 (10 μg/mL) (C). Only developmental arrest, dead larvae and cell debris were observed for all embryos following exposure to 25 μg/mL of COOH-50 (D) and from 1 to 25 μg/mL of NH₂-50 (E and F). Size in μm is represented by the scale bar.

d) Metamorphosis assay

A high metamorphosis yield was observed in all treatments, ranging from 82 ± 9 to $91 \pm 2\%$ (mean \pm SD = $87 \pm 4\%$), and no significant effect of MP/NP exposure ($p > 0.05$) on metamorphosis success of *C. gigas* was demonstrated, regardless of particle type or concentration. Furthermore, no abnormalities were observed under a microscope for any of the treatments tested.

4) DISCUSSION

Strong effects of NP were observed on the success of fertilization and embryogenesis of *C. gigas* depending on particle dose and functionalization. Based on the commercial size, a higher toxicity of NP compared to MP was demonstrated here, in agreement with previous observations across a range of species, including copepods (Jeong et al., 2017, 2016; Lee et al., 2013), crustaceans (Ma et al., 2016) and fish (Mattsson et al., 2017). This comparison was only done for plain particles, and the functionalization-dependent toxicity remains to be tested for MP, especially using amine groups displaying the strongest toxicity at the nanoscale. These insights support the purpose that risks of NP may be higher than microscale counterparts (Wright and Kelly, 2017). Indeed, there is a consensus concerning the risk of nanomaterials as a result of their high reactivity and their capacity to cross biological membranes (Nel et al., 2006). It is noteworthy that the short term exposure to plain 500-nm and 2- μm beads did not show any effect on the two essential planktonic stages of oyster reproduction and development (gametes and embryos), whereas deleterious effects after 2-months of exposure to 2 and 6- μm plain PS beads were previously demonstrated on gametogenesis of adult oysters leading to subsequent negative impacts on unexposed gametes and offspring (Sussarellu et al., 2016).

The dose-response exposure experiments performed here, which are the recommended approach when environmental concentrations are unknown (*e.g.* Paul-Pont et al., 2018), allowed the estimation of the half maximal effective concentration (EC_{50}) indicating the concentration of a compound when 50% of its maximal effect is observed. The lowest EC_{50} was observed for the NH_2 -50, which was 1.6 – 77 times more toxic for gametes and embryos, respectively, than the $COOH$ -50. The highest EC_{50} in NP exposures was observed for the Plain-50 particles presumably due to a decrease of their bioavailability owing to the presence of aggregates higher than 10 μm observed in seawater at T24h. Oyster embryos exhibited similar sensitivity as mussel embryos (48 h exposures; EC_{50} NH_2 -50: 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(Balbi et al., 2017), but their sensitivity was higher than sea urchin embryos (48 h exposures; EC_{50} NH_2 -50: 2.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(Della Torre et al., 2014), suggesting interspecies variability. Additionally, biological stage within the same species appears to be an important factor in determining effects considering the absence of NP toxicity on metamorphosis success. As demonstrated here, oyster larvae seem to withstand MP/NP exposures, in agreement with a previous study

showing no effect on growth rate or survival of oyster larvae upon exposure to 1 and 10 μm -PS particles for 8 days (Cole and Galloway, 2015). The absence of toxicity of MP/NP on pediveliger oyster larvae is probably linked to the appearance of a shell protecting larvae from polystyrene particles (Hickman, 1999; Liebig and Vanderploeg, 1995; Schiaparelli et al., 2004). The potential underlying mechanisms of NP toxicity include impairment of biological membranes, sub-cellular toxicity or physical blockages, notably for spermatozoa. These explanatory hypotheses, discussed below, are not mutually exclusive and could all play a role in the observed adverse effects of NH_2 -50, Plain-50 and COOH -50 on oyster planktonic stages. The observed toxicity of NP on gametes and embryos may be related to damages caused by membrane breakages (Nel et al., 2009). Indeed, adhesion of nanoplastics on oyster gametes, both oocytes and spermatozoa (Gonzalez-Fernandez et al., 2018), and sea urchin and mussel embryos (Della Torre et al., 2014; Balbi et al., 2017) was recently demonstrated. We can rely on these published data from different models and particles to suggest that NP have stuck on oyster's gametes and embryos in the present study. Consequences might be significant for biological membranes. Molecular simulations have demonstrated the capacity of nano-PS to perturb lipid membranes (Rossi et al., 2014). Even if metallic and plastic nanoparticles cannot be directly compared, nickel and iron nanoparticles reduced the membrane integrity of *Ciona intestinalis* (Gallo et al., 2016) and *Mytilus edulis* spermatozoa, leading to a decrease in fertilization success (Kadar et al., 2011). Interactions between nanoparticles and biological membranes are driven by particle aggregation and size. Here, the most toxic NP (NH_2 -50) remained at the nanometer size in seawater and was thus expected to interact more with biological membranes through its high reactivity and capacity to cross biological membranes (Nel et al., 2006; Verma and Stellacci, 2010). Similarly, exposure to NH_2 -50 led to higher toxicity in sea urchin embryos and shrimp larvae (Bergami et al., 2016; Della Torre et al., 2014), compared to COOH -40 nm forming approximately 1 μm aggregates in seawater. The major differences in aggregation observed for the different nanobeads in ultrapure water and filtered seawater are a result of the characteristics of the nanobeads themselves and the surrounding medium (Nel et al., 2009; Rocha et al., 2015). The high aggregation of COOH -50 and Plain-50 observed here in filtered seawater can be explained by a strong interaction between the negative surface charge of these NP and the abundant cationic ions such as Ca^{2+} in seawater. It is noteworthy that Plain-50 forming micrometric sized aggregates led to

significant toxicity on gametes and embryos while plain MP exhibiting lower micrometric size ($< 5 \mu\text{m}$) seemed innocuous. This suggests that nanoparticles remain highly reactive with biological membrane even in the form of large aggregates.

The differential interactions between cells and nanoparticles may also be linked to their surface properties, notably the net surface charge (Nel et al., 2009). The so-called buffering effect observed on the net surface charge of MP/NP incubated in filtered seawater compared to ultrapure water is also related to the presence of anions and cations in seawater that would have interacted with their surface layer. The ions brought the ζ -Potential to a neutral surface charge, and as a result, decreased NP stability (El Badawy et al., 2010; Lin et al., 2010). Cationic nanoparticles interact with negative membrane residuals more easily than anionic ones, and this interaction can trigger internalization to maintain the overall negative membrane charge, which may eventually induce membrane disruptions (Cho et al., 2009; Fröhlich, 2012). The lowest surface charge observed for the Plain-50 may lead to reduced interaction with gamete and embryo membranes, explaining their lower toxicity compared to other NP.

Impairment of membrane integrity during cell divisions can lead to developmental arrest during embryogenesis (Pinsino et al., 2017), in agreement with the numerous malformations that we observed upon NP exposure. These results call for detailed microscopic analyses of exposed cell membranes, coupled with lipidomic approaches to assess lipid membrane composition upon NP exposure, in order to better understand the effects of NP on membrane integrity.

Given the high aggregation (3-10 μm) observed in our data for the Plain-50 and COOH-50, congestion of gametes is a possibility. This congestion may hamper spermatozoa internalization into oocytes, leading to negative effects on the fertilization yield as observed upon exposure to Plain-50 and COOH-50.

At the same time, the NP toxicity observed here could be related to sub-cellular effects upon internalization and/or membrane disruption of gametes/embryos. For instance, NH_2 -50 was better internalized in human cell lines representing various organs, and led to more cytotoxic effects than COOH-50 and Plain-50 (Anguissola et al., 2014; Bannunah et al., 2014). Similar mechanisms, involving NP entry leading to sub-cellular toxicity, could also be hypothesized here, requiring fine microscopical observations using fluorescent NP. In the present study, the exclusive occurrence of developmental arrest during exposure at the highest concentrations

of NH₂-50 and COOH-50 could indicate the involvement of apoptosis pathways, as described in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Della Torre et al., 2014; Pinsino et al., 2017). The intermediate situation, where malformed larvae (mantle, shell and hinge malformations) were observed upon exposure to Plain-50, intermediate concentrations of COOH-50 and the lowest concentration of NH₂-50, could be a result of dysregulation of genes involved in shell mineralization, as previously demonstrated by transcriptional analysis in mussel embryos exposed to 0.15 µg/mL of NH₂-50. Also, as previously characterized during exposure to chemical agents and nanoplastics, a decrease in DNA integrity or a disruption of the cell oxidative balance of oyster gametes and embryos may be implied (Akcha et al., 2012; Behrens et al., 2016; Vignier et al., 2017; Gonzalez-Fernandez et al., 2018). Nanoparticles can interfere with electron transfer of the intracellular medium, inducing a production of ROS (Fu et al., 2014). This overproduction of ROS results in several types of damages, such as lipid peroxidation or DNA breakages leading to embryotoxicity (Xie et al., 2017). In agreement with these observations we previously suggested that spermatozoa may lose their ability to fertilize oocytes as a consequence of an oxidative stress induced by exposure of oyster spermatozoa to carboxylic nanopolystyrene (100 nm) (Gonzalez-Fernandez et al., 2018).

The lowest concentration (0.1 µg/mL) used here was five times higher than the mass concentration of MP used in the study of Sussarellu et al. (2016) based on equivalent mass concentration of >333 µm plastics debris hotspots. At this concentration, only exposure of oyster embryos to NH₂-50 had a significant effect, which suggests that the probability of oyster planktonic stages suffering fertilization and embryo-larval development disruptions due to NP exposure is low in nature at the present time. However, taking into account the calculations of Besseling et al. (2014), the toxic effects observed here began at lower concentrations than the highest mass concentration of plastic debris (162 µg/mL) estimated at the water-sediment interface. Furthermore, the power-law increase in MP concentrations with decreasing particle size in sea surface samples suggests that small MP are increasingly abundant, and that MP concentrations will be underestimated if the smallest fraction is not properly quantified (Bergmann et al., 2017; Erni-Cassola et al., 2017). Regarding the increase of (nano)plastics used in industry, the recent estimation of their mismanagement and release into oceans, as well as the continuous breakdown of plastic waste at the nanometer scale, better management of end-of-life plastics is should be strongly recommended to enable a transition

to a circular economy and limit or prevent accidental releases (GESAMP, 2015; ten Brink et al., 2017).

5) CONCLUSION

Our study is the first demonstration of adverse effects of nanoplastics on oyster early life stages, with the fertilization/embryogenesis steps being particularly sensitive. The combination of fine microscopy and -Omics (lipidomics, transcriptomics) tools is now needed to fully understand the underlying toxicity mechanisms that likely include both membrane disruption and subcellular toxicity. Significant ecological implications could be expected as effects on gametes, fertilization and embryo-larval development determine recruitment, population stability and ecosystem structure. Nevertheless, new data are required about environmental concentrations of nanoplastics to confirm or not the risk. We suggest that direct effects on early life stages should be integrated into the “adverse outcome pathway” (AOP) scheme describing microplastic toxicity pathways in aquatic organisms (Galloway and Lewis, 2016). Indeed, this additional pathway may influence the offspring viability and the overall reproductive output.

6) SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. Mean size (in nm) and surface charge (ζ -Potential in mV) of polystyrene particles after 24h in UV-treated 1- μm filtered seawater (FSW). Analyses were performed by Dynamic Light Scattering (DLS) at 20°C in triplicate and data are represented as means \pm SD. Comparisons were made using the Student's t-test; * : $p < 0.05$.

Media	Particles	Commercial Size (nm)	Particle/Aggregate Size (nm)	ζ -Potential (mV)
FSW T0	2- μm	2,000	3113.7 \pm 32.3	-30.5 \pm 1.5
	500-nm	500	1620.7 \pm 188.8	-28.3 \pm 0.6
	COOH-50	50	3735.0 \pm 443.8	-13.8 \pm 0.8
	Plain-50	50	5951.0 \pm 264.3	-31.3 \pm 4.4
	NH ₂ -50	50	96.5 \pm 2.0	15.6 \pm 2.7
FSW T24h	2- μm	2,000	3243.2 \pm 102.8	-32.3 \pm 1.1
	500-nm	500	1743.3 \pm 150.6	-28.4 \pm 1.4
	COOH-50	50	3548.5 \pm 551.2	-15.2 \pm 1.9
	Plain-50	50	> 10 μm° *	-28.9 \pm 3.7
	NH ₂ -50	50	98.4 \pm 3.5	16.4 \pm 4.1

$^{\circ}$ 10 μm is the limit of the Zetasizer used in this experiment

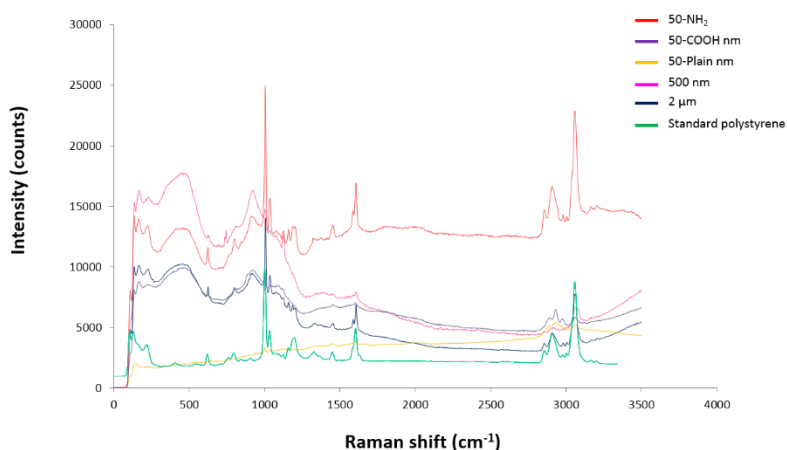


Figure S1. Confirmation of the polymer nature by Raman micro-spectroscopy of 5 commercial polystyrene particles (50-NH₂ nm, 50-COOH nm, 50-Plain nm, 500 nm and 2 μm). Standard polystyrene purchased from GoodFellow (Lille, France) was used as reference.

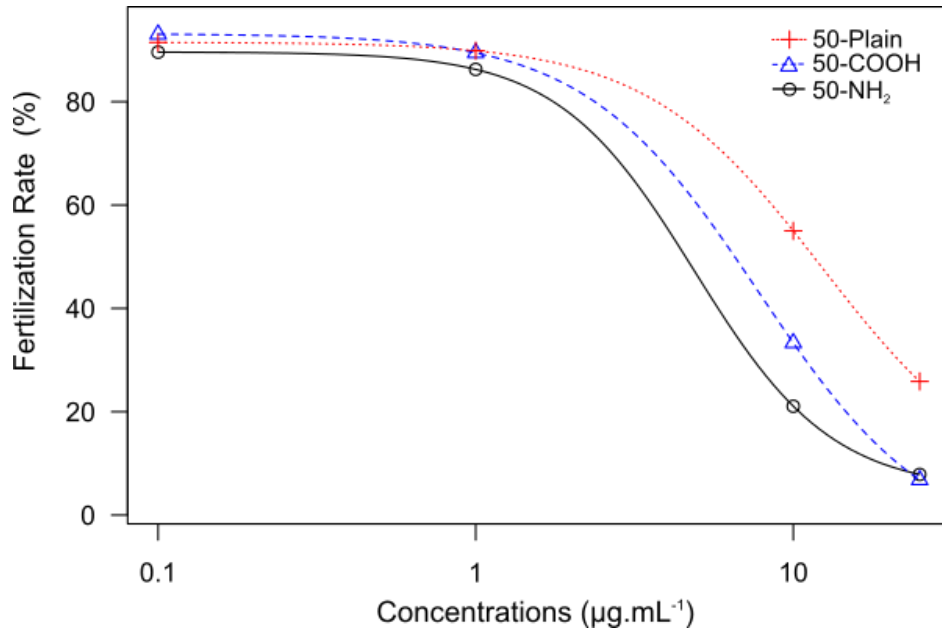


Figure S2. Plot of EC₅₀ analyses representing toxicity of polystyrene nanobeads (50-Plain in red, 50-COOH in blue and 50-NH₂ in black) on fertilization success of oyster after 1.5h gametes exposure. N= 5

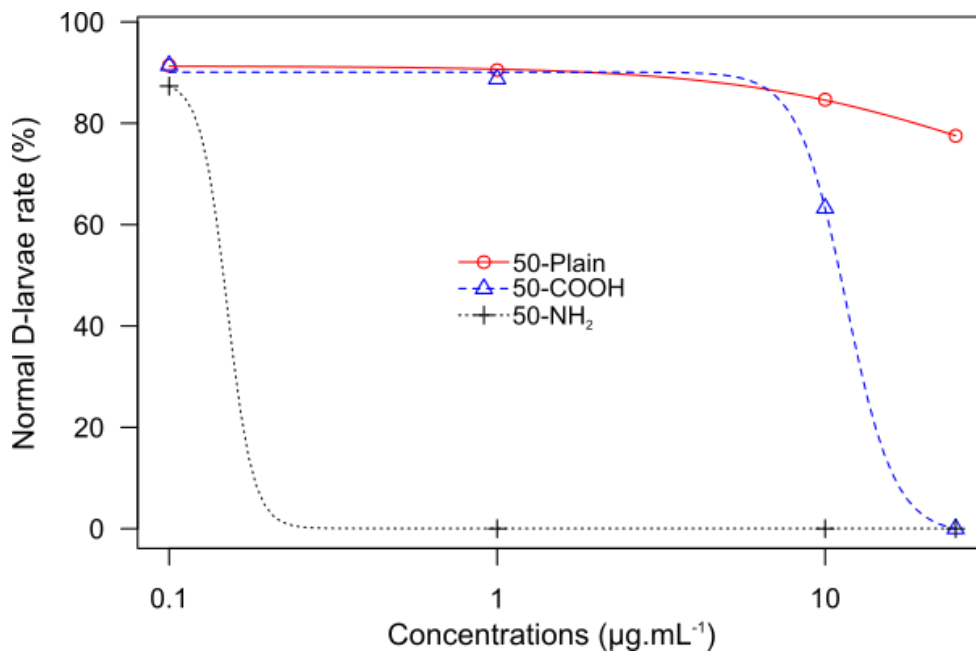


Figure S3. Plot of EC₅₀ analyses representing toxicity of polystyrene nanobeads (50-Plain in red, 50-COOH in blue and 50-NH₂ in black) on oyster embryo-larval development after a 36h exposure. N= 5.

A RETENIR

- Les trois types de nano-PS ont induit une toxicité aiguë sur le taux de fécondation et le succès d'embryogénèse de *C. gigas* dépendante de la fonctionnalisation de surface des particules.
- Les nano-PS aminées (50-NH₂) sont à l'origine des plus forts effets observés, potentiellement du fait de leur stabilité dans l'eau de mer (taille < 100 nm) et leur charge cationique augmentant les interactions avec les membranes biologiques. Les deux autres nano-PS présentaient une charge anionique et une faible stabilité dans l'eau de mer menant à la formation d'agrégats micrométriques limitant les interactions avec les gamètes et embryons.
- Aucun effet phénotypique des particules de 500 nm et 2 µm n'a été mis en évidence sur les trois stades de développement exposés.

CHAPITRE 5

REPONSES DES SPERMATOZOÏDES ET OVOCYTES FACE AUX NANOPLASTIQUES

PREAMBULE

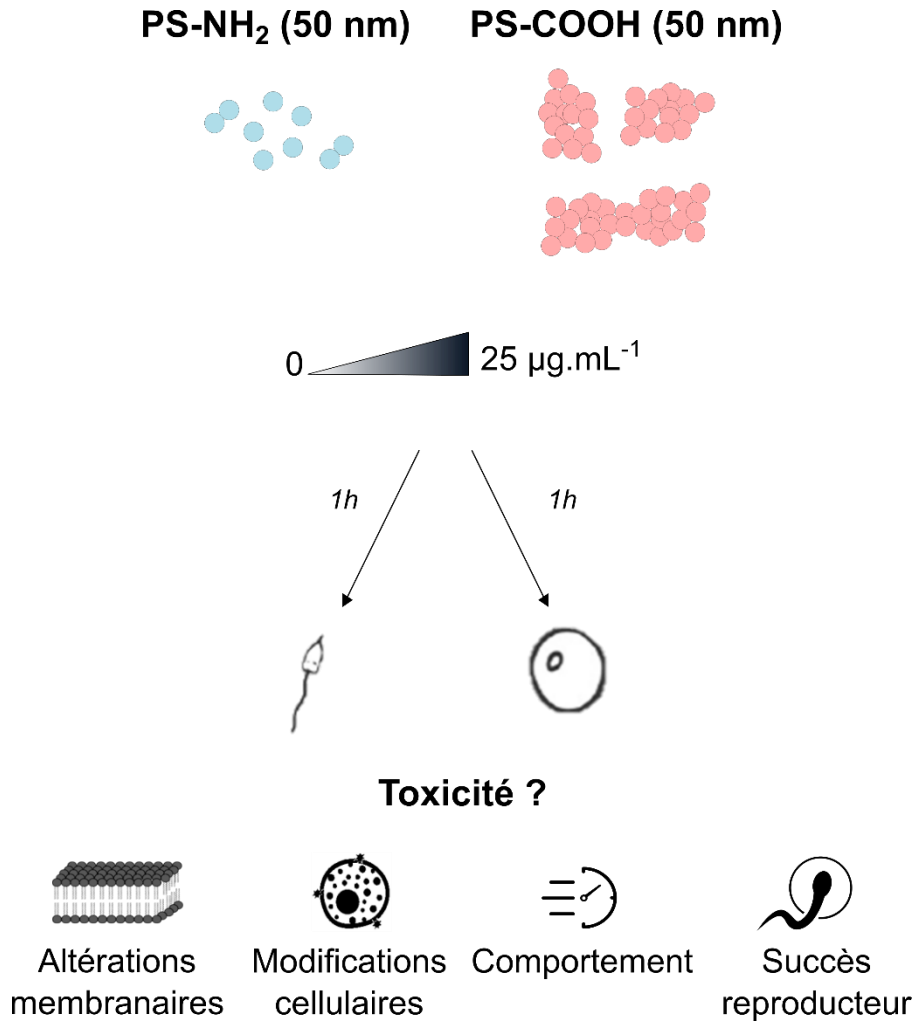
Les spermatozoïdes et ovocytes sont des cellules essentielles, à la base de la reproduction sexuée (Wylie, 1999). La rencontre entre les gamètes (*i.e.* la fécondation) permet la formation de nouveaux individus assurant le maintien des populations naturelles (Gallo et al., 2018). Le succès de fécondation d'une espèce est dirigé par la qualité de ces cellules germinales qui dans le cas d'une fécondation externe peut être affectée par l'interaction des gamètes avec les contaminants présents dans le milieu extérieur (*e.g.* nanoplastiques comme présenté dans le chapitre 4; hydrocarbures, Vignier et al. (2017); pesticides, Akcha et al. (2012)).

Dans le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse, nous avons observé une diminution du taux de fécondation lors de l'exposition simultanée des gamètes aux trois types de nano-PS (50 nm) testés (50-NH₂ – EC₅₀ = 4,9 ± 0,9 µg.mL⁻¹, 50-COOH – EC₅₀ = 7,8 ± 1,1 µg.mL⁻¹ et 50-Plain – EC₅₀ = 12,3 ± 7,5 µg.mL⁻¹). Cependant, cette précédente étude était purement focalisée sur une conséquence phénotypique (*i.e.* taux de fécondation) et ne permettait pas décrypter ni la sensibilité relative de chaque type cellulaire à l'exposition aux nano-PS, ni les mécanismes cellulaires responsables de la toxicité observée. Par la confrontation de nos données à celles de la littérature, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer nos résultats, que l'on peut classer en trois axes : (1) Déstabilisation membranaire ; (2) Induction d'un stress oxydatif pouvant mener à une génotoxicité ; (3) Perturbation comportementale et/ou congestion sous l'effet de l'adhésion des particules aux membranes. Dans ce nouveau chapitre, les gamètes de *C. gigas* ont été exposés aux deux types de nano-PS induisant les effets les plus marqués (50-NH₂ et 50-COOH) lors du chapitre 4 afin de répondre à l'objectif suivant :

EVALUER LES REPONSES COMPORTEMENTALES ET CELLULAIRES DES SPERMATOZOÏDES ET OVOCYTES DE L'HUÎTRE LORS D'UNE EXPOSITION AUX NANO-PS (-NH₂ ET -COOH)

Ce chapitre est divisé en deux parties. La première partie correspond à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus pour les spermatozoïdes sous la forme d'un article qui devrait être soumis avant la soutenance de thèse. La seconde partie présente les principaux résultats obtenus lors d'une nouvelle expérience visant à évaluer la toxicité des deux nano-PS sur les ovocytes. Cette seconde partie a été réalisée en collaboration avec Myrina Boulais dans

le cadre de son projet postdoctoral. Certaines analyses étant encore en cours, il convient d'appréhender ces données présentées dans la seconde partie comme des résultats préliminaires.



PARTIE 1: NANOPOLYSTYRENE BEADS AFFECT MOTILITY AND REPRODUCTIVE SUCCESS OF OYSTER'S SPERMATOOZOA (CRASSOSTREA GIGAS)

K. Tallec^a, I. Paul-Pont^b, M. Boulais^b, N. Le Goïc^b, C. González-Fernández^b, F. Le Grand^b, A. Bideau^b, C. Quéré^a, A-L. Cassone^b, C. Lambert^b, P. Soudant^b, A. Huvet^{a*}

^a*Ifremer, Univ Brest, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280, Plouzané, France*

^b*Univ Brest, CNRS, IRD, LEMAR, IUEM, F-29280, Plouzané, France.*

* ahuvet@ifremer.fr

ABSTRACT

Oyster is a keystone species using external fertilization as sexual mode. Hence, gametes are planktonic and face a wide range of anthropogenic stressors including plastic litter. The smallest particles, called nanoplastics, are of increasing consideration because their size allows high interactions with biological membranes and represent therefore a potential hazard for marine life. In the present study, spermatozoa were exposed during 1h to various doses (from 0.1 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of 50 nm polystyrene beads with amine (50-NH₂ beads) or carboxyl functions (50-COOH beads). Several endpoints were measured to elucidate the toxic pathways: membrane integrity and composition, reactive oxygen species (ROS) production, motility (percentage of motile spermatozoa, swimming speed) and reproductive success (D-larval yield). Although particles adhere on spermatozoa's membrane as observed by electron and confocal microscopy, no translocation into cells was demonstrated for both particles. Nevertheless, a high spermiotoxicity of the 50-NH₂ beads from 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was identified, decreasing the percentage of motile spermatozoa by 72-fold and the swimming speed by 16-fold compared to control, leading to a drop in the embryogenesis success by 17-fold. This major reproduction failure cannot be explained by membrane breakages neither an increase of the ROS production. Other most likely subcellular mechanisms are accordingly discussed.

Regarding the 50-COOH beads, they hampered spermatozoa's motility only at 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the percentage of motile spermatozoa and swimming speed decreased by 3-fold and 2-fold, respectively, without effects in the embryogenesis success. According to microscopy analyses, this effect is presumably due to physical blockages by microscale aggregates that 50-COOH beads formed in the experimental medium. This study emphasizes that oyster's spermatozoon is a useful and sensitive model to (i) decipher the fine interactions underpinning nanoplastics toxicity and (ii) evaluate adverse effects of plastic nanoparticles for marine biota.

Key-words: Nanoplastics; Oyster; Spermatozoa; Motility, Reproductive success.

1) INTRODUCTION

In 2017, 348 Mt of plastics were produced for human activities versus 2 Mt in 1950 (PlasticsEurope 2018). This high consumption and the low efficiency of waste management lead to a huge release of mismanaged items in the ultimate recipient: the oceans (Eriksen *et al.* 2014, Jambeck *et al.* 2015). This release from coastal regions was estimated between 4.8 and 12.7 Mt in 2010 and projections forecast an increase by one order of magnitude within the next decade if mitigation measures are not developed (Jambeck *et al.* 2015). Plastic debris are pervasive in marine environment due to their strong resistance to UV-light, temperature, shocks and micro-organisms (GESAMP 2015). Their ubiquitous nature in aquatic environments poses significant and critical questions in order to determine whether plastic contamination is a new planetary boundary threat as well as unsafe for human health (Jahnke *et al.* 2017, Wright and Kelly 2017).

Global inventories describing the contamination state spotlighted a high number of small debris called microplastics (MP; < 5 mm). Microplastics (330 μm – 5 mm) constitute 92% (485×10^{10} particles) of the total plastic items estimated at the Open Oceans' surface layer (Eriksen *et al.* 2014). However, recent methods to assess abundance of small MP (10 – 330 μm) highlighted the underestimated state of the contamination. More than 90% of plastic debris exhibited a size lower than 100 μm in surface water and sediments from the southern North Sea (Lorenz *et al.* 2019), the Arctic deep-sediments (Bergmann *et al.* 2017) and sea ice (Peeken *et al.* 2018). This is related to the release of small manufactured (primary) MP (*e.g.* exfoliates,

scrubbers) and the uninterrupted weathering of plastic pieces (secondary MP) in seawater down to nanoscale particles defined as nanoplastics (NP) for which size limits remain unclear ($< 1 \mu\text{m}$ or $< 100 \text{ nm}$) (Koelmans *et al.* 2015, Gigault *et al.* 2018, Hartmann *et al.* 2019). Recently, Hartmann *et al.* (2019) proposed a compromise with the use of NP to refer to particles lower than 100 nm and sub-MP for particles between 100 nm and 1 μm . In addition, primary NP are suspected to enter directly in the environment *via* wastes of industrial and domestic activities (Zhang *et al.* 2012, Hernandez *et al.* 2017). The amount of NP is expected to be higher than MP but the incumbent lack of analytical tools and methods prevents the estimation of their environmental concentrations in ocean at this time (Huvet *et al.* 2016, Mintenig *et al.* 2018, Schwaferts *et al.* 2019).

Due to the over-representation of small plastic debris in oceans, an assessment of this threat for biota and ecosystems is clearly required (Galgani *et al.* 2013). Among particle characteristics, the size is suspected to play a major role in potential toxicity for marine life. Harmful effects of NP ($<100 \text{ nm}$) were recently reported to be higher in comparison to MP on survival, lifespan, fecundity, fertilization and embryo-larval development in marine organisms using model spherical particles of polystyrene (Lee *et al.* 2013, Jeong *et al.* 2016, 2017, Tallec *et al.* 2018). This is likely related to nanoparticle properties, in particular their large surface-to-volume ratio in comparison to bulk material, that makes them highly reactive with biological systems, leading therefore to various effects (cytotoxic, genotoxic, reprotoxic) (Mattsson *et al.* 2015, Paul-Pont *et al.* 2018). Moreover, NP have the potential to translocate into tissues/organs as observed in scallop, which could increase their toxicity and bioavailability for higher trophic levels (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2018).

Free-spawning invertebrates are numerous in aquatic environment (Lewis and Ford 2012). At the root of life cycle, early life stages (ELS) are crucial because they participate actively to the population recruitment, the community structure and consequently to the ecosystem balance (Lewis and Ford 2012, Reinhardt *et al.* 2015). Yet they must face all anthropogenic contaminants and it is quite accepted that they are more sensitive than adults (Hutchinson *et al.* 1998, Gallo and Tosti 2019). In this regard, toxic effects of pesticides, pharmaceutical residuals, hydrocarbons, and nanoparticles on ELS of key marine invertebrates (mainly sea urchins, oysters and mussels) were identified (Ringwood *et al.* 2010, Kadar *et al.* 2011, Di Poi

et al. 2014, Balbi *et al.* 2017, Vignier *et al.* 2017, Gallo *et al.* 2018, Mai *et al.* 2018, Tallec *et al.* 2018).

Among these free-spawning marine species, the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is a keystone species in coastal ecosystems due to its ecological roles (*e.g.* biogeochemical cycles, water quality, reef building) and economic value for aquaculture (Grabowski *et al.* 2012, Bayne 2017). In our previous study, a simultaneous exposition of spermatozoa and oocytes to 50 nm nanopolystyrene beads displaying amine (50-NH₂) or carboxylic (50-COOH) functionalizations hampered oyster fertilization with a dose-response pattern (0 – 25 µg.mL⁻¹). However, the toxic pathways implied were not identified (Tallec *et al.* 2018). Nevertheless, we suggested various explanations to understand the observed toxicity including perturbation of antioxidant defenses, disruption of spermatozoa's motility, and membrane destabilization. Moreover, in this previous work, we could not discriminate effect on spermatozoa and oocyte. Thus, the present study aimed to explore detrimental processes specifically in oyster's spermatozoa upon exposures to the 50-NH₂ and 50-COOH beads. Effects on sperm motility, reactive oxygen species (ROS) production, survival, membrane integrity/constitution and reproductive success (embryogenesis success) were investigated.

2) MATERIALS AND METHODS

a) Particle characterization

Two commercial nanopolystyrene beads (nano-PS; 50 nm), without labelling, from Bangs Laboratories®/Polysciences® were used for the exposure of spermatozoa: (i) amino-polystyrene (50-NH₂); (ii) carboxylic-polystyrene (50-COOH). In parallel, the same nano-PS beads with a green (excitation 480 nm and emission 520 nm; 50-NH₂) and an orange (excitation 552 nm and emission 580 nm; 50-COOH) labelling were used to perform the confocal microscopy observations. Toxicity experiments were performed with non-fluorescent beads to avoid a confounding effect due to a possible leaching of the fluorophores (Catarino *et al.* 2019, Schür *et al.* 2019). As described in Tallec *et al.* (2018), commercial suspensions were stocked in ultrapure water (UW) with surfactant (Tween-20®; <0.1 %) at 4°C prior to the experiments. The Z-average (size; nm) and mean surface charge (ζ-potential; mV) of these particles were already characterized by dynamic light scattering (DLS; nano-Zetasizer

ZS; Malvern Instruments; UK) in UW and 1- μm filtered seawater (FSW; pH 8.1 and 34 PSU) (Tallec *et al.* 2018). Briefly, the 50-NH₂ suspension exhibited a positive surface charge (UW: 44.0 ± 1.5 mV; FSW: 15.6 ± 2.7 mV) and a nanometric size (UW: 53.3 ± 2.3 nm; FSW: 96.5 ± 2.0 nm) while the 50-COOH suspension had a negative surface charge (UW: -62.1 ± 0.4 ; FSW: -13.8 ± 0.8) and formed micrometric aggregates in FSW (3735.0 ± 443.8 nm) in comparison to UW where no aggregation occurred (55.9 ± 0.4 nm). In addition, for the present study, particles were put in contact with the experimental medium (EM) without spermatozoa (removed by a filtration on 0.2 μm) to test by DLS if the composition of the seminal fluid could affect the particle's behavior (charge and aggregation state) as described in González-Fernández *et al.* (2018).

b) Suspensions of nano-PS for exposures

Stock suspensions of 50-NH₂ (100 mg.mL⁻¹) and 50-COOH (25 mg.mL⁻¹) beads were achieved at 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in UW then diluted at 25, 10, 1 and 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in EM (21°C) to obtain 9 treatments (2 particle types \times 4 concentrations + 1 control). The use of dose-response experiments is recommended to assess harmful effects of small plastic debris in order to determine toxicity thresholds owing to the uncertainties about their current and future environmental concentrations (Koelmans *et al.* 2017, Paul-Pont *et al.* 2018). In order to avoid any confounding effect due to the presence of a surfactant (Tween-20 in our case) in the commercial nano-PS suspensions (Pikuda *et al.* 2018), Tween-20 (Sigma-Aldrich®) was added to the control treatment at a final concentration of 0.0001% which was equivalent to the concentration occurring in the highest treatment (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

c) Gametes collection and exposures

Mature oysters (18 months old) produced in 2015 according to Petton *et al.* (2015) were collected in the Marennes-Oléron basin (France) then transferred to the Ifremer's (French Research Institute for Exploitation of the Sea) experimental facilities in June 2017. Oysters were acclimatized at 16°C in a 350 L raceway and fed on a balanced mixture of two microalgae *Isochrysis* sp. (Tahitian clone: T-iso; CCAP927/14) and *Chaetoceros gracilis* (UTEX LB2658) *ad libitum* until experiment. Sex was determined under microscope (Olympus BX51; $\times 10$ -20 magnification) on a sub-sample of gonad (50 μL). Then, sperm were collected by stripping the gonad of male oysters, this mixture being further sieved at 100- μm to eliminate debris (Steele

and Mulcahy 1999). The mixture was diluted in 100 mL of FSW at 21°C during 1h to start capacitation (*i.e.* final step of maturation occurring in seawater triggering hyperactivated motility). Spermatozoa concentrations were calculated by flow cytometry (EasyCyte Plus cytometer; Guava Merck Millipore, USA) (Le Goïc *et al.* 2013) and then set at 10^7 cells.mL⁻¹ in tubes filled with the different nano-PS treatments (0.1, 1, 10 and 25 µg.mL⁻¹). Exposures were 1 hour long and were performed on six (for all measures with the exception of lipid analyses; final volume = 3.5 mL) and four (for lipid analyses; final volume = 100 mL) replicates for each treatment; one replicate corresponding to a pool of spermatozoa from 3 males (total number of male oysters = 18).

d) Sperm motility and velocity

After 1h of exposure, 25 µL of each treatment and replicate were diluted in 475 µL of FSW containing Pluronic Acid (1 g.L⁻¹) (Boulais *et al.*, 2019). After 10 minutes, 12 µL of each suspension were placed in FastRead cells (Fischer Scientific®, USA) and sperm were analyzed under microscope (Olympus BX51, Japan; ×20 magnification with phase contrast) to acquire videos (Camera Qicam Fast 1394, 60 frames.sec⁻¹, 6 sec.treatment⁻¹). Five videos were acquired for each replicate. Videos were analyzed by the ImageJ Software using the CASA (computer-assisted sperm analyzer) plug-in to characterize the percentage of motile spermatozoa (%) and the Velocity of the Average Path (VAP; µm.sec⁻¹) (Wilson-Leedy and Ingermann 2007). The calibration settings developed for oyster spermatozoa are described in Boulais *et al.* (2015a).

e) Flow Cytometry

All flow cytometry measurements were performed at the end of the exposures with an EasyCyte Plus cytometer (Guava Merck Millipore, USA), except for the acrosomal integrity for which a FACSverse cytometer (BD Biosciences, USA) was used. The two cytometers were equipped with a 488 nm argon laser; two fluorescent detectors were used with the EasyCyte Plus (green 525/30 nm and red 680/30 nm) and one for the FACSverse (Per-CP-Cy5.5-A 700/54 nm). Relative cell size and complexity were estimated with the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) values (U.A.) (Le Goïc *et al.* 2013).

To assess the membrane integrity of spermatozoa, the “Live/Dead Sperm Viability kit”

(Molecular Probes[®], USA) was used according to Le Goïc *et al.* (2013). Briefly, 10^6 spermatozoa were sampled and stained during 10 minutes in dark condition at room temperature with SYBR-14 (final concentration 1 μ M) and propidium iodide (PI; final concentration 10 μ g.mL⁻¹). This dual-staining allows the measure of the percentage of live and dead spermatozoa; the SYBR-14 penetrates only cells without membrane damages (live spermatozoa; green detector) while the PI enters only into cells that have lost membrane integrity (dead spermatozoa; red detector) (Garner and Johnson 1995). Results were expressed as the percentage of live spermatozoa (%).

To estimate the intracellular reactive oxygen species (ROS) production, 10^6 spermatozoa were incubated during 50 minutes in dark condition at room temperature with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; final concentration 10 μ M; Sigma-Aldrich[®]). This chemical is hydrolyzed into the cells by esterases to form the DCFH which emits a green fluorescence after oxidation by ROS into DCF (Lambert *et al.* 2003). The relative amount of ROS in cells was expressed as the mean level of green fluorescence (A.U.; green detector).

A posteriori, the acrosomal integrity was verified using the protocol of Volety *et al.* (2016) in control and treatments for which the spermatozoa's reproductive success was affected. A sample of 2×10^5 spermatozoa was incubated during 10 minutes in dark condition at room temperature with the LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes[®], USA; final concentration 1 mM). This probe stains specifically the acrosome which is an acidified organelle (Volety *et al.* 2016). A loss of the acrosomal integrity is characterized by a decrease in the mean level of red fluorescence (A.U.; Per-CP-Cy5.5-A detector).

f) Lipid analyses

Analyses were performed only on spermatozoa from the control and treatments for which an effect was detected on the spermatozoa motility. Samples (2.5×10^9 spermatozoa.treatment⁻¹; n=4) were collected on GF/F glass-fiber filters (0.2 μ m; Whatman[®]) then extracted in 6 mL chloroform: methanol (2:1 v/v) according to a modified procedure of Folch *et al.* (1957) (Da Costa *et al.* 2016). Samples were flushed with nitrogen gas and stored at -20°C until analyses. All materials were rinsed with acetone and/or burnt during 6h at 450°C before use to prevent contaminations; all chemicals were HPLC grade.

Analyses of lipid classes

Lipid classes were separated by high-performance thin layer chromatography (HPTLC). Two HPTLC glass plates coated with silica (200×100 mm; Merck® 60, Germany) were used: one to separate neutral lipids (NL) and another one to separate polar lipids (PL). HPTLC plates were first cleaned with a mixture of methyl acetate: isopropanol: chloroform: methanol: KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6; v/v) for PL and with hexane: diethyl ether (97:3; v/v) for NL according to Da Costa *et al.* (2016). Plates were then activated at 120°C during 30 minutes (TLC Plate Heater, CAMAG®; Switzerland) and lipid extracts (2 µL for PL and 5 µL for NL) were spotted on them by an automatic TLC sampler ATS4 (CAMAG®). PL were separated in a solution of methyl acetate: isopropanol: chloroform: methanol: KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6; v/v). NL were separated by 2 successive developments, first using a mixture of hexane: diethyl ether: acetic acid (20:5:0.5; v/v) then a solution of hexane: diethyl ether (97:3; v/v). Thereafter, plates were revealed through immersion in a 3% CuSO₄ and 8% H₃PO₄ (w/v in distilled water) solution and heated at 180°C (30 min). Data acquisition was achieved using a scanner densitometer at 370 nm (TLC Scanner 4 CAMAG®). Results were analyzed with the WinCATS software (v2.4; CAMAG®) by comparing retention time and intensity of bands related to each class *versus* standards (Moutel *et al.* 2016). Lipid classes were expressed as the mass percentage of each class to the total lipid content which was expressed in mg per 10⁹ spermatozoa. Nine classes were identified, 3 NL (triglycerides, sterols and free fatty acids) and 6 PL (phosphatidylcholine [PC], phosphatidylethanolamine [PE], phosphatidylinositol + ceramide amino-ethylphosphonate [PI+CAEP], phosphatidylserine [PSer] and cardiolipin [CL]). Triglycerides correspond to storage lipids and free fatty acids is considered as a proxy of lipid degradation. Sterols, PE, PSer, PI+CAEP and CL constitute membrane lipids. The PC/PE ratio was used as a proxy of the membrane stability (Li *et al.* 2006).

Analyses of fatty acids (FA)

To determine FA composition of neutral and polar lipid fractions, 1 mL of lipid extracts was evaporated to dryness under N_{2(g)} and then resuspended in 3×500 µL of chloroform: methanol (98:2; v/v). Samples were deposited at the top of a micro-column (40×5 mm) using silica gel 60 previously heated 6h at 450°C and moistened with 6% deionized water (Le Grand *et al.* 2014). Thereafter, PL and NL fractions were eluted and separated by 10 mL of methanol:

chloroform (98:2; v/v) and 20 mL of methanol, respectively. At this step, an internal standard (free fatty acid 23:0, 2.3 µg) was added to quantify fatty acids in samples (Da Costa *et al.* 2016). The last step was the transesterification of lipids to obtain fatty acid methyl esters (FAME): each fraction was evaporated to dryness under N_{2(g)}, resuspended in 800 µL of MeOH-H₂SO₄ (3.4% v/v) and heated at 100°C for 10 min. Thereafter, hexane (0.8 mL) and distilled-water saturated in hexane (1.5 mL) were added and the aqueous phase was removed after centrifugation (738 × *g*; 60 sec; 20°C). FAME were rinsed two more times with distilled-water saturated in hexane (1.5 mL). Finally, FAME were analyzed to determine the FA composition of each fraction using a Varian CP8400 gas chromatograph (HP, USA) (parameters are described in Mathieu-Resuge *et al.* (2019)). FA composition was expressed as the mass percentage of each FA to the FA content per fraction (neutral and polar).

g) Microscopy analyses

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM; JEOL 100 CXII, Japan) observations were performed to assess potential fine interactions between nano-PS beads and spermatozoa, including translocation, and the integrity of the internal structures (nucleus, mitochondria, acrosome, flagellum) of oyster's spermatozoa according to Suquet *et al.* (2010). An aliquot of spermatozoa from the control treatment and the highest exposed concentration (25 µg.mL⁻¹) for both 50-NH₂ and 50-COOH beads were immersed in successive buffers: (1) glutaraldehyde 6%: NaCl 7%: cacodylate 0.4 M (2:1:1; v/v) during 2h (2) cacodylate 0.4 M: NaCl 8%: UW (1: 1: 2; v/v) with three successive baths of 15 minutes (3) osmium tetroxide 4%: cacodylate 0.4 M: NaCl 10%: UW (1:1:1:1; v/v) during 1h. Centrifugations (100 × *g*, 10 min, 4°C) were performed between each step to remove the buffers. Next, samples were embedded in agar 1% then dehydrated by successive baths: (1) EtOH 50% (15 min); (2) EtOH 70% (30 min); (3) EtOH 90% (3 baths of 10 min); (4) EtOH 100% (3 baths of 10 min); propylene oxide 99% (3 baths of 10 min). Ultimately, samples were included in hard resin (Embed 812 kit; Electron Microscopy Sciences[®]), cut into ultrathin sections (70 nm) and double stained with lead citrate (250 mg.mL⁻¹) and uranyl acetate (7%) before observations.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM; FEI QUANTA 200, USA) observations were performed to identify potential external modifications of spermatozoa during exposures to nano-PS beads. An aliquot of spermatozoa from the control treatment and the highest exposed concentration ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for both 50-NH₂ and 50-COOH beads were immersed in a mixture of glutaraldehyde 6%: NaCl 7%: cacodylate 0.4 M (2:1:1; v/v) during 2h. Thereafter, samples were dehydrated by successive baths of ethanol (50%, 70%, 90% and 100%; 10 min each) then desiccated using a critical-point dryer (Leica CPD 300; Germany). Lastly, samples were coated with gold using an SCD 040 (Blazers, Liechtenstein).

Confocal microscopy

A confocal laser scanning microscope (CLSM) Zeiss LSM 780 (Germany) was used to observe interactions between fluorescent nano-PS beads and spermatozoa. An aliquot of spermatozoa exposed to fluorescent 50-NH₂ or 50-COOH ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) beads with the same experimental design that the toxicity experiment was sampled after 1h of exposure and fixed with 6% glutaraldehyde at 4°C for 48h. An excitation/emission of 488 nm/543 nm was used to visualize the 50-NH₂ beads and an excitation/emission of 514 nm/612 nm for 50-COOH beads. Spermatozoa were stained with DAPI 1% (40,6-diamidino-2-phenylindole; 10 min in dark condition; excitation/emission 405 nm/455 nm) to perform three-dimensional observations.

h) Assessment of the reproductive success

At the end of the exposure, spermatozoa from each treatment and replicate were placed in 2 L glass beakers filled with 1.5 L of clean FSW containing 20,000 control oocytes pooled from 3 females per replicate (n=6 replicates; total number of female oysters = 18). Oocytes were collected by stripping the gonad and sieved at 100- μm and then 20- μm with sterile equipment to eliminate debris. The spermatozoa-to-oocyte ratio was 100:1 following the same procedure described in Tallec *et al.* (2018). After 48h, beakers were sieved at 40- μm to collect larvae and samples were fixed with a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to estimate the D-larval yield under microscope (Zeiss Axio Observer Z1; $\times 10$ -63 magnification). The D-larval yield was defined as: (number of normal D-larvae / number of oocytes) $\times 100$ (Song *et al.* 2009). Abnormal D-larvae referred to shell/mantle malformations and developmental arrests

(Mottier *et al.* 2013).

i) Statistical analyses and graphical representations

Statistical analyses and graphical representations were conducted using the R Software (R Core Team, 2016). For all data, normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene test) were screened. Percentages were analyzed after angular transformations except for the percentage of motile spermatozoa for which we used a fourth root transformation to respect statistical rules. Particles' behavior between the EM and FSW were compared with the *t*-test method. To compare motility, flow cytometry analyses and lipid classes among treatments, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparisons were performed (Tukey's posthoc or Conover's posthoc test for parametric or non-parametric analyses, respectively). To identify modifications of FA composition in the polar and neutral fractions, one-way analysis of similarities (ANOSIM) were performed using a Bray-Curtis similarity matrix to separate cluster (R=1: perfect separation; R=0.5: satisfactory separation, R=0: poor separation cluster) (Long *et al.* 2018). Correlations were made with the Pearson's method between the percentage of motile spermatozoa or VAP and the D-larval yield. The significance threshold of statistical analyses was fixed at 0.05. Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

3) RESULTS

a) Characterization of nanopolystyrene beads in seminal media

The commercial size (50 nm) of both 50-NH₂ and 50-COOH beads was verified by TEM (Figure S1). In the experimental medium (EM), the 50-NH₂ suspension displayed a size of 100.2 ± 2.0 nm and a ζ -potential of 14.7 ± 3.2 mV (Figures 1A and 1B). The 50-COOH suspension formed micro-scale aggregates characterized by a size of $7,435 \pm 538$ nm and a ζ -potential of -12.5 ± 1.5 mV (Figures 1C and 1D). The size of the 50-COOH suspension increased significantly by 2.3 times in EM (p-value < 0.01) in comparison to FSW (data from Tallec *et al.*, 2018).

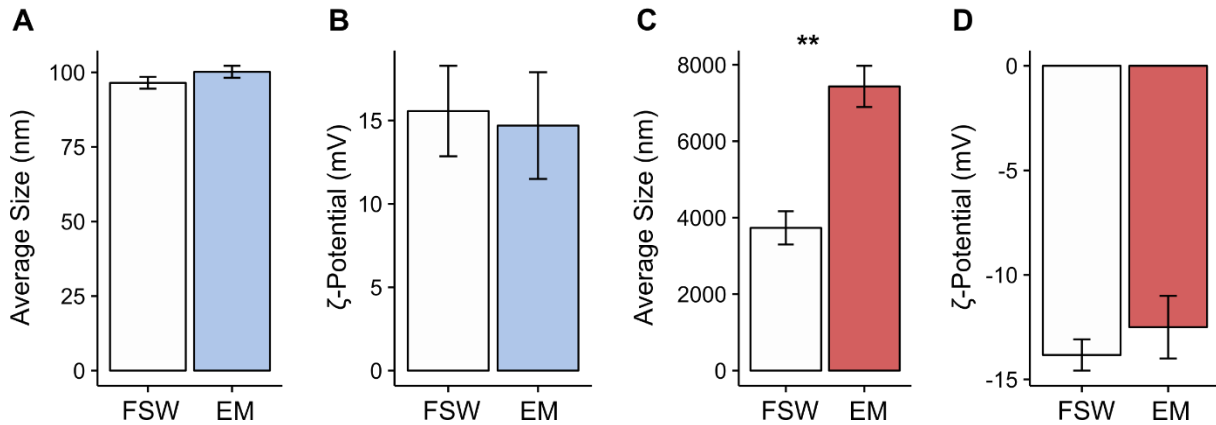


Figure 1. Size (nm; A and C) and ζ -potential (mV; B and D) in filtered seawater (FSW, from Tallec *et al.*, 2018) and the experimental medium (EM, present study) of two 50 nm nano-PS: 50-NH₂ beads (A and B); 50-COOH beads (C and D). Data are given as mean \pm SD (n=3). The *t*-test method was used to compare data between FSW and EM (** = p-value < 0.01).

b) Effects on spermatozoa motility

Compared to control treatment, both 50-NH₂ and 50-COOH beads altered significantly the motility of oyster spermatozoa (Figure 2). At 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50-NH₂ beads induced a significant reduction of the percentage of motile spermatozoa (-79 and -99%, respectively; p-values < 0.001) and VAP (-62 and -94%, respectively; p-values < 0.001) (Figures 2A and 2B). Concerning exposures to 50-COOH beads, a significant effect was observed only at the highest concentration (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) with a significant reduction of the percentage of motile spermatozoa (-66%, respectively; p-value < 0.001) and VAP (-38%, respectively; p-value < 0.001) (Figures 2C and 2D).

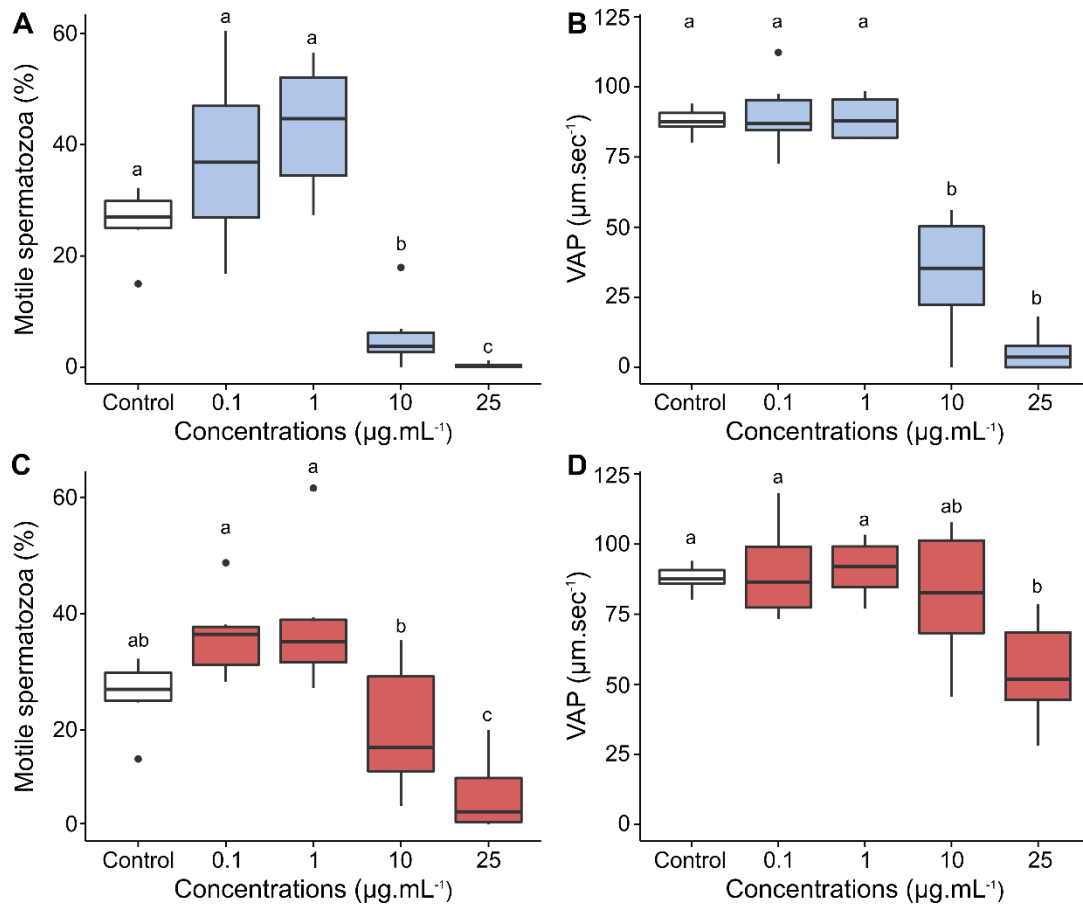


Figure 2. Percentage of motile spermatozoa (%; A and C) and VAP (Velocity of the Average Path; $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$; B and D) of oyster spermatozoa after 1h of exposure to 50-NH₂ (blue, A and B) and 50-COOH beads (red, C and D) at five concentrations: 0 – Control, 0.1, 1, 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Data are given as mean \pm SD (n= 6). ANOVA (A, C and D) or Kruskal-Wallis tests (B) with pairwise comparisons were made between treatments at the 5% level; homogeneous groups share the same letter.

c) Morphology and functional characteristics of spermatozoa exposed to nano-PS

The spermatozoa relative size and complexity (FSC and SSC, respectively) were not affected (p -values > 0.05) under exposures to 50-NH₂ beads (Table 1). The FSC was not statistically different among all concentrations of 50-COOH beads (p -value > 0.05). At 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of 50-COOH beads, the SSC increased significantly (+19% and 33%, respectively; p -values < 0.01) in comparison to the control treatment. The functional characteristics of spermatozoa (percentage of live cells, acrosomal integrity and ROS production) did not differ significantly

(p-values > 0.05) among treatments for both 50-NH₂ and 50-COOH beads (Table 1).

Table 1. Relative size (FSC; A.U.), relative complexity (SSC; A.U.), percentage of live cells (%), ROS production (green fluorescence, A.U.) and acrosomal integrity (red fluorescence, A.U.) of oyster spermatozoa after 1h of exposure to 50-NH₂ and 50-COOH beads at five concentrations: 0 – Control, 0.1, 1, 10 and 25 µg.mL⁻¹. Data are given as mean ± SD (n= 6 except for the acrosomal integrity, n= 4). ANOVA were used to compare treatments with Tukey HSD for pairwise comparisons at the 5% level; homogeneous groups share the same letter. NA = Not applicable as the acrosomal integrity was assessed only on control and treatments for which the reproductive success was affected.

Treatments	Relative Size (FSC; A.U.)	Relative Complexity (SSC; A.U.)	Live cells (%)	ROS Production (A.U.)	Acrosomal Integrity (A.U.)	
Control	64.1 ± 1.3 ^a	41.3 ± 1.7 ^a	94.2 ± 1.9 ^a	24.6 ± 11.4 ^a	259.3 ± 33.2 ^a	
50-NH ₂	0.1	64.1 ± 1.4 ^a	40.8 ± 1.5 ^a	95.5 ± 2.5 ^a	22.6 ± 8.6 ^a	NA
	1	64.5 ± 1.3 ^a	42.5 ± 1.6 ^a	95.2 ± 1.8 ^a	25.4 ± 10.8 ^a	NA
	10	65.1 ± 1.7 ^a	44.9 ± 1.4 ^a	93.1 ± 8.5 ^a	22.6 ± 8.7 ^a	250.8 ± 53.9 ^a
	25	64.6 ± 0.7 ^a	40.6 ± 3.1 ^a	97.4 ± 1.6 ^a	19.3 ± 8.2 ^a	297.8 ± 14.9 ^a
50-COOH	0.1	64.5 ± 1.2 ^a	41.6 ± 2.2 ^a	95.1 ± 2.1 ^a	20.0 ± 4.3 ^a	NA
	1	63.9 ± 1.1 ^a	39.9 ± 6.6 ^a	95.4 ± 2.5 ^a	22.7 ± 5.7 ^a	NA
	10	64.7 ± 0.9 ^a	49.5 ± 1.8 ^b	95.7 ± 2.4 ^a	20.4 ± 4.8 ^a	NA
	25	64.4 ± 0.9 ^a	55.1 ± 2.4 ^b	96.4 ± 2.2 ^a	17.3 ± 4.7 ^a	NA

d) Lipid composition of spermatozoa exposed to nano-PS

Exposure to both nano-PS beads had no effects on the total lipid content (mean value= 3.99 ± 0.17 mg.10⁹ spermatozoa⁻¹; p-value > 0.05; Table 2). The overall percentage of membrane lipids (mean value= 98.23% ± 0.03%) and storage lipids (mean value= 1.77% ± 0.03%) were statistically similar (p-values > 0.05) among treatments. Statistical analyses revealed a significantly higher proportion (+11.5%; p-value < 0.01) of phosphatidylserine at the highest concentration (25 µg.mL⁻¹) of 50-NH₂ beads in comparison to other treatments including control. Other class proportions remained unchanged among treatments (p-values > 0.05) (Table 1). No changes were observed in the PC/PE ratio (mean value= 1.58 ± 0.02; p-value >

0.05). Regarding fatty acids, one-way analysis of similarities (ANOSIM) revealed no statistical differences in the FA composition among treatments, neither for neutral ($R = -0.2$ and $p\text{-value} > 0.05$; Table S1) nor for polar lipids ($R = 0.18$ and $p\text{-value} > 0.05$; Table S2).

Table 2. Total lipid content ($\text{mg}\cdot 10^9 \text{ spermatozoa}^{-1}$) and lipid class composition of oyster's spermatozoa after 1h in various treatments: Control; 50-COOH beads ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 50-NH₂ beads ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 50-NH₂ beads ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Lipid composition was expressed as the mass percentage of each class to the total lipid content ($n=4$; mean \pm SD). ANOVA method was used to compare treatments with Tukey HSD for pairwise comparisons at the 5% level; *: $p < 0.01$. PE: phosphatidylethanolamine, PI: phosphatidylinositol, Pser: phosphatidylserine, CL: cardiolipin; CAEP: ceramide amino-ethylphosphonate, PC: phosphatidylcholine.

	Treatments			
	Control	50-COOH ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	50-NH ₂ ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	50-NH ₂ ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
% Triglycerides	1.59 \pm 0.76	1.66 \pm 0.49	1.56 \pm 0.65	1.67 \pm 0.63
% Sterols	7.04 \pm 0.60	6.79 \pm 0.48	6.93 \pm 0.90	6.37 \pm 0.30
% Free fatty acids	0.18 \pm 0.09	0.14 \pm 0.01	0.16 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
% PE	23.13 \pm 0.76	23.27 \pm 0.50	23.24 \pm 0.84	23.03 \pm 0.70
% PI+CAEP	18.90 \pm 1.24	19.19 \pm 1.20	19.15 \pm 1.51	18.99 \pm 0.79
% Pser	6.61 \pm 0.28	6.50 \pm 0.17	6.85 \pm 0.20	7.52 \pm 0.17*
% CL	5.65 \pm 0.40	5.97 \pm 0.23	5.70 \pm 0.03	5.66 \pm 0.16
%PC	36.90 \pm 0.55	36.49 \pm 1.21	36.40 \pm 0.42	36.64 \pm 0.77
% Membrane	98.23 \pm 0.03	98.20 \pm 0.05	98.28 \pm 0.07	98.22 \pm 0.02
% Storage	1.77 \pm 0.72	1.80 \pm 0.50	1.72 \pm 0.63	1.78 \pm 0.62
PC/PE	1.60 \pm 0.07	1.57 \pm 0.06	1.57 \pm 0.04	1.59 \pm 0.07
Total lipid content ($\text{mg}\cdot 10^9 \text{ spermatozoa}^{-1}$)	4.03 \pm 0.24	3.79 \pm 0.50	4.20 \pm 0.72	3.97 \pm 0.20

e) Interactions between nano-PS beads and spermatozoa

Using confocal laser scanning microscopy, the 50-NH₂ and 50-COOH beads appeared to adhere on the external membrane of spermatozoa's head (Figures 3B, 3C and 3D), notably on the acrosomal area. For the 50-COOH beads treatment, spermatozoa were embedded in aggregates of 50-COOH beads (Figure 3E; Figure S2). This pattern of large aggregates trapping spermatozoa was not observed for the 50-NH₂ beads treatment.

The adhesion of nano-PS beads on spermatozoa was observed by TEM and SEM only with 50-NH₂ beads (Figures 4 and 5). No alterations of the internal or external structures were remarked in spermatozoa exposed to both nano-PS beads in comparison to the control treatment. Regarding the presence of both 50-NH₂ and 50-COOH beads inside spermatozoa, no translocation signs were observed with the TEM observations and the orthogonal views obtained by confocal microscopy (Figures S3 and S4).

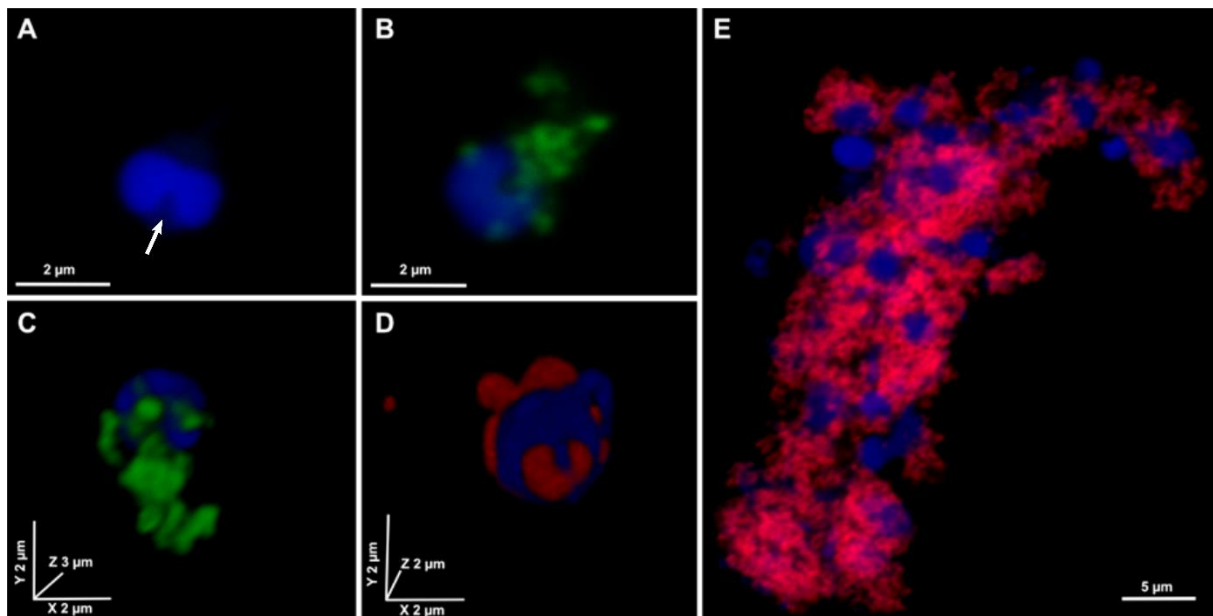


Figure 3. Confocal laser scanning microscopy of oyster spermatozoa (blue) after 1h of exposure to nano-PS beads: (A) Control treatment; (B and C) Adhesion of 50-NH₂ beads (green; 25 µg.mL⁻¹) on spermatozoa's head; (D) Adhesion of 50-COOH beads (red; 25 µg.mL⁻¹) on spermatozoa's head and (E) observation of spermatozoa embedded in micro-scale aggregates of 50-COOH beads. The arrow shows the location of the acrosome. Size is represented by the scale bar.

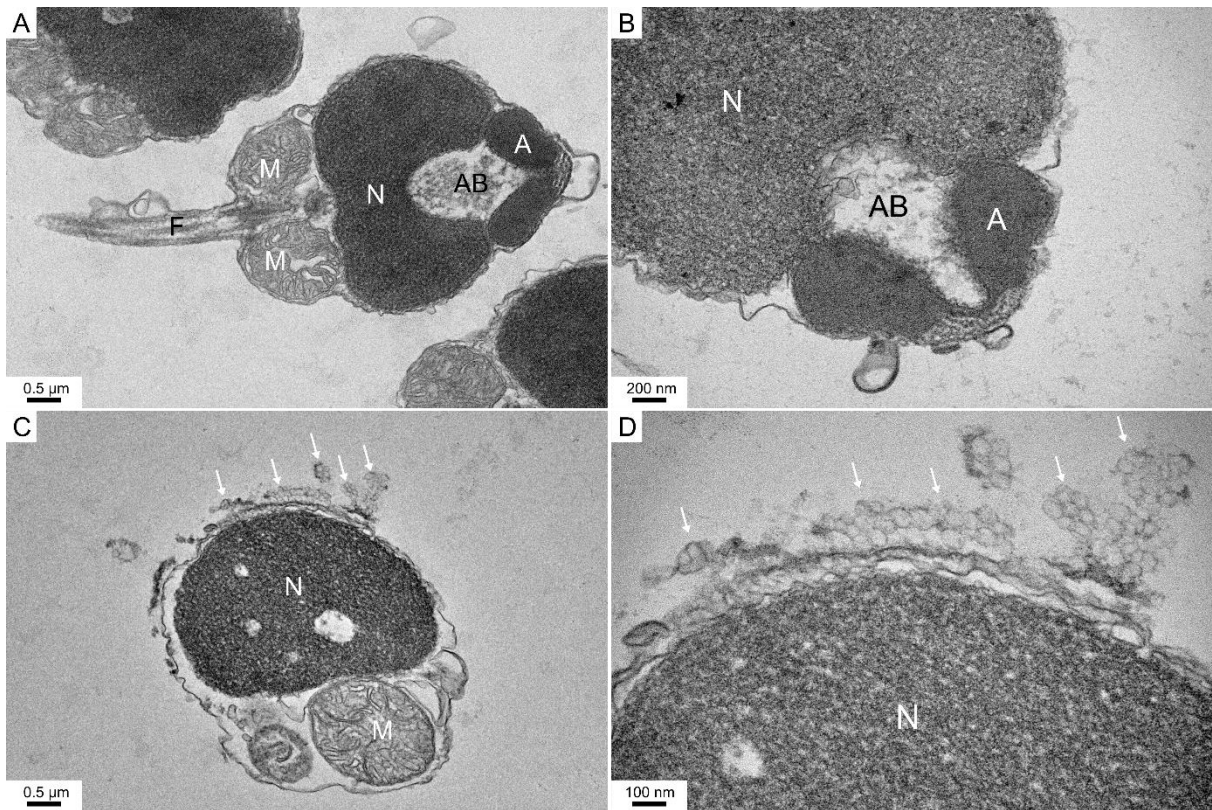


Figure 4. Transmission electron microscopy observations of oyster spermatozoa after 1h of exposure to nano-PS beads. (A and B) Longitudinal sections of spermatozoa from the control treatment; (C and D) Longitudinal sections of spermatozoa exposed to $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of 50-NH₂ beads. White arrows indicate adhesion of 50-NH₂ on spermatozoa's membrane. A: Acrosome; AB: Axial body; N: Nucleus; M: Mitochondria; F: Flagellum. Size is represented by the scale bar.

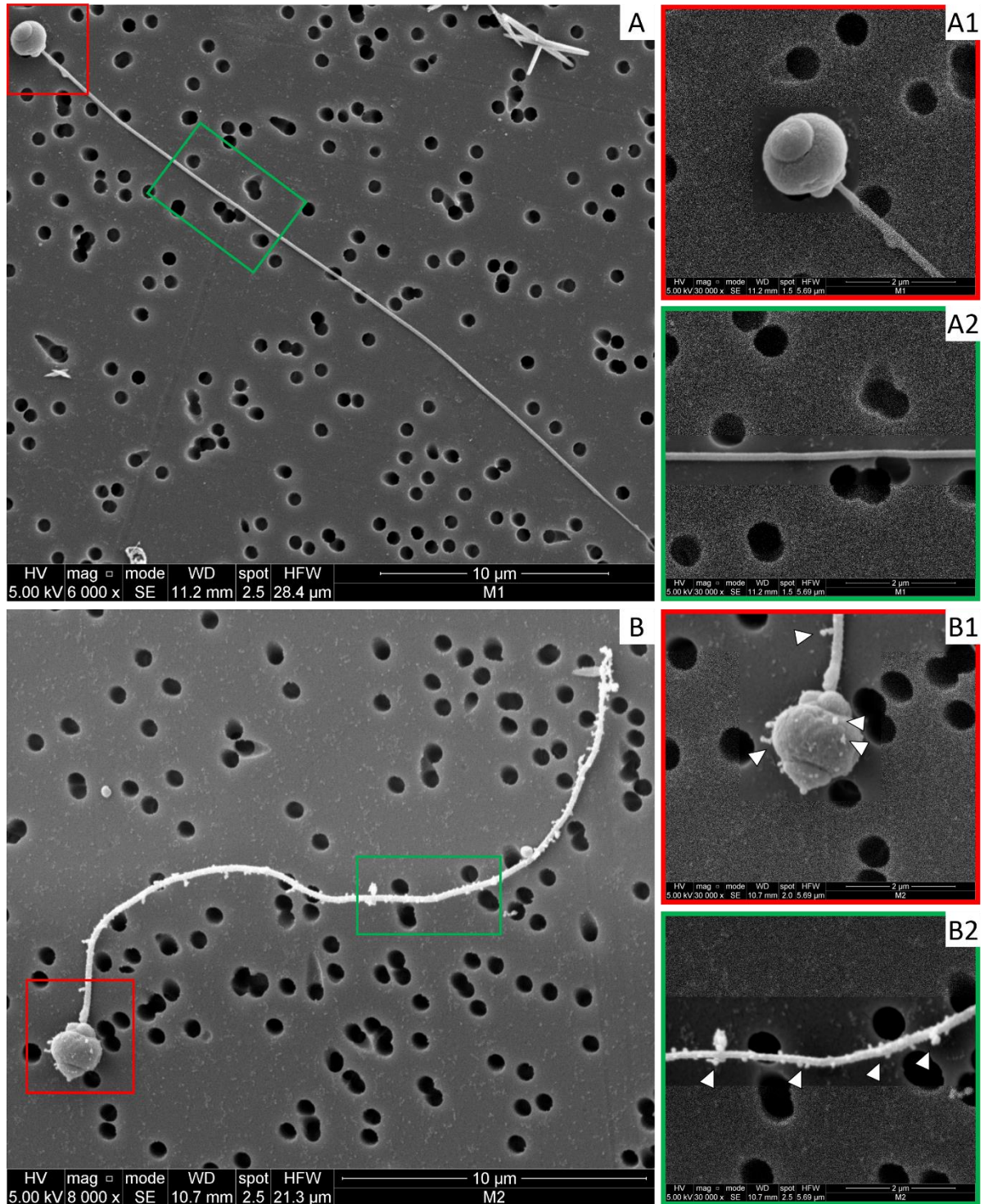


Figure 5. Scanning electron microscopy observations of oyster spermatozoa after 1h of exposure to nano-PS beads. (A, A1 and A2) Spermatozoa from the control treatment; (B, B1 and B2) Spermatozoa exposed to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of 50-NH₂ beads. White arrows indicate adhesion of 50-NH₂ beads on spermatozoa's head and flagellum. Size is represented by the scale bar.

f) Effects on the reproductive success

The 50-NH₂ beads induced significant decreases in the D-larval yield at 10 µg.mL⁻¹ (-59%; p-value < 0.05) and 25 µg.mL⁻¹ (-95%; p-value < 0.001) (Figure 6A). In contrast, exposures to 50-COOH beads caused no effects in the D-larval yield (p-value > 0.05: Figure 6B) compared to the control treatment. In addition, significant positive correlations were found in the case of exposures to 50-NH₂ beads between: (i) the D-larval yield and spermatozoa motility (p-value < 0.001; $R^2 = 0.68$; Figure 7A); (ii) the D-larval yield and VAP (p-value < 0.001; $R^2 = 0.76$; Figure 7B).

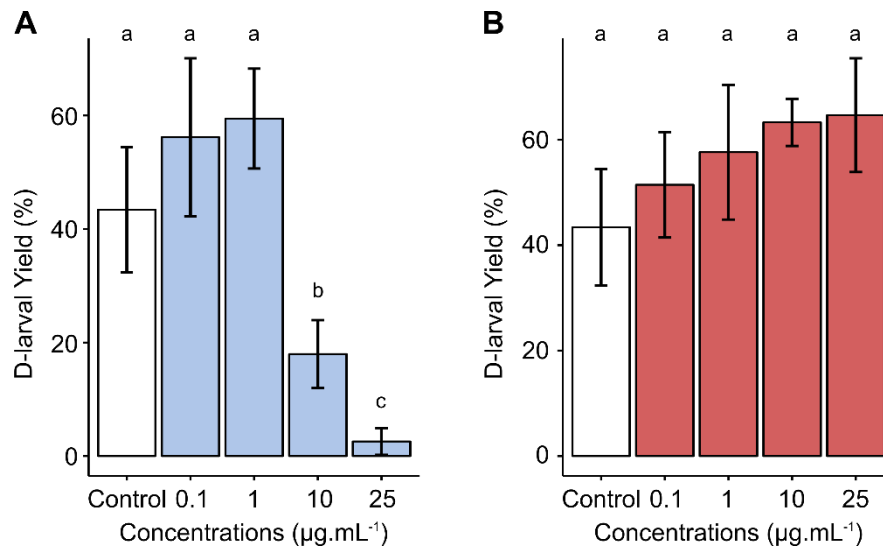


Figure 6. D-larval yield obtained from fertilization with spermatozoa exposed to five concentrations (0 – Control, 0.1, 1, 10 and 25 µg.mL⁻¹) of 50-NH₂ (A) and 50-COOH beads (B). Data are given as mean ± SD (n= 6). ANOVA and pairwise comparisons were made between treatments using Tukey's HSD at the 5% level; homogeneous groups share the same letter.

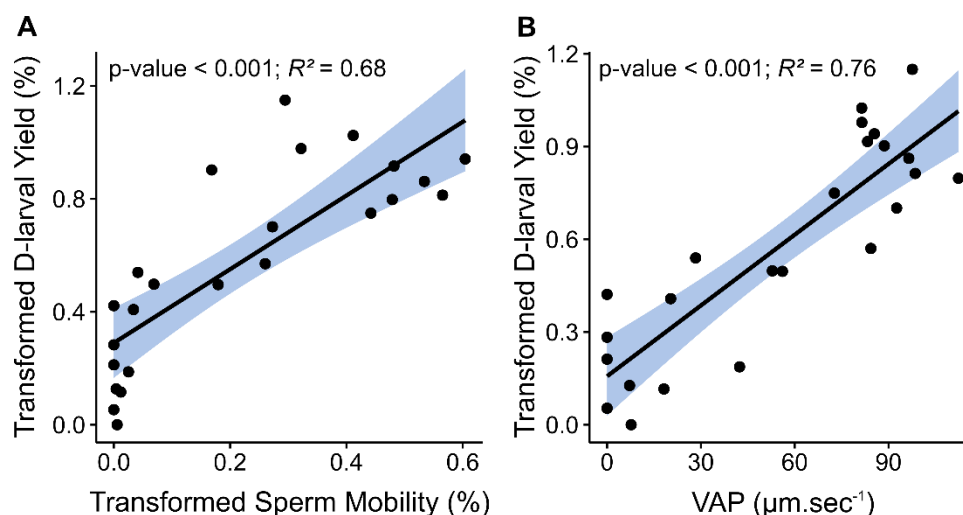


Figure 7. Correlations between spermatozoa motility (A) or VAP (B) and the D-larval yield after spermatozoa exposures to 50-NH₂ beads. Data used for the graphical representation were the transformed data as described in the materials and methods part. Statistical analyses were performed with the Pearson test at the 5% level (n=6).

4) DISCUSSION

Adverse effects on oyster spermatozoa depend on the nanoparticle type. Healthy spermatozoa are crucial to ensure the sustainability of *C. gigas* through the transfer of genetic heritage to oocytes and offspring. Among parameters defining quality of spermatozoa, the motility (*e.g.* percentage of motile spermatozoa, swimming speed) and the reproductive success are predominant (Taylor *et al.* 2014). Here, despite a very short exposure of 1h, the 50-NH₂ beads reduced the percentage of motile spermatozoa and their VAP, leading to a decrease in the D-larval yield used as a proxy of the reproductive success. While the present study showed that toxic effects on spermatozoa appeared from 10 µg.mL⁻¹ of 50-NH₂ beads, embryotoxicity was observed from 0.1 µg.mL⁻¹ in oyster embryos exposed to the same particles (Tallec *et al.* 2018). This higher embryotoxicity than spermiotoxicity was already observed in oysters and sea urchins embryos/spermatozoa exposed to PAH-contaminated sediments and xenobiotics (Geffard *et al.* 2001, Manzo *et al.* 2006). This can be related to the set of intense metabolic and morphological modifications (*e.g.* numerous cleavages, gastrulation, organogenesis, shell calcification) triggered during embryogenesis (Fitzpatrick *et al.* 2008).

By contrast, the 50-COOH beads seem to induce a transitory effect on oyster spermatozoa, *i.e.* a decrease of the motility at the highest concentration, without negative outcomes for their reproductive success as suggested by similar D-larval yield between conditions derived from control or exposed spermatozoa. Therefore, the involvement of different toxic pathways between 50-NH₂ and 50-COOH beads on oyster spermatozoa are suggested, which is consistent with previous studies (Della Torre *et al.* 2014, Manfra *et al.* 2017, Tallec *et al.* 2018). For instance, the 50-NH₂ beads decreased strongly the embryogenesis success of the oyster *C. gigas* (EC₅₀= 0.15 µg.mL⁻¹), the sea urchin *Paracentrotus lividus* (EC₅₀= 2.61 µg.mL⁻¹) and the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis* (EC₅₀= 6.62 µg.mL⁻¹) while 50-COOH beads had a lower toxicity (EC₅₀ = 11.60 µg.mL⁻¹ in the embryogenesis success of *C. gigas*) or no effect (survival of *B. plicatilis*, embryogenesis of *P. lividus*). This fact is probably linked to surface properties of nanoparticles (*e.g.* surface charge), which are key-factors affecting behavior and interactions with biological membrane (Cho *et al.* 2009, Nangia and Sureshkumar 2012, Della Torre *et al.* 2014, Tallec *et al.* 2019). The positive charge and low aggregation of the 50-NH₂ beads in seawater favor interactions with cells, increasing toxic effects in comparison to negatively-charged 50-COOH beads which formed micro-scale aggregates (Della Torre *et al.* 2014). The stronger interactions between 50-NH₂ beads and membrane than 50-COOH beads could explain results of TEM and SEM for which only 50-NH₂ beads are found to attach on spermatozoa despite numerous cleaning steps performed during the sample preparation.

The 50-NH₂ beads toxicity on oyster spermatozoa is not related to membrane breakages neither modification of cell defenses. Numerous studies reported cytotoxicity (*e.g.* decrease of cell viability, increase of ROS production) in cell lines (*e.g.* macrophage, brain astrocytoma) and aquatic organisms (*e.g.* cyanobacteria) after exposures to 50-NH₂ beads at concentrations close to the ones used in the present study, signaling a perturbation of cell defenses (Xia *et al.* 2008, Bexiga *et al.* 2011, Feng *et al.* 2019). In oyster spermatozoa, no variations in ROS production or other markers of cytotoxicity (*e.g.* acrosomal integrity) were observed despite a significant decrease in key sperm functions (motility and reproductive success) induced by 50-NH₂ beads. A similar pattern (*i.e.* decrease in spermatozoa quality without overproduction of ROS) was already described in bovine's spermatozoa exposed to gold nanoparticles at 10 µg.mL⁻¹. These authors suggested membrane perturbations due to the attachment of gold

nanoparticles to explain the decrease of motility and fertilization success (Taylor *et al.* 2014). In this regard, one toxic pathway of the nano-PS proposed in the literature is related to membrane disturbance (Rossi *et al.* 2014, Jeong *et al.* 2018, Feng *et al.* 2019). For instance, 50-NH₂ beads at 2.5 and 4 µg.mL⁻¹ induce severe alterations of *Synechococcus elongatus* membrane (increase of permeability and loss of integrity) (Feng *et al.* 2019). The present experiment was therefore designed to test this hypothesis on oyster spermatozoa. Although flow cytometry analyses suggest no effects of the 50-NH₂ beads on spermatozoa membrane integrity, an increase in the phosphatidylserine level at 25 µg.mL⁻¹ (+11.5%) was observed suggesting a rapid synthesis of this phospholipid in response to the adhesion of 50-NH₂ beads on spermatozoa membrane. This synthesis remains unexplained but we speculate that such a change could be linked to a cell response to maintain its homeostasis as phosphatidylserine can participate actively to the stability of essential transmembrane components such as Na⁺/K⁺-ATPases (Wheeler and Whittam, 1970). A perturbation of the transmembrane Na⁺/K⁺-ATPases and Ca²⁺-ATPases was suggested as responsible of the loss of motility in bovine spermatozoa displaying gold nanoparticle attachments (Taylor *et al.* 2014). Therefore, further works are needed to establish effects of 50-NH₂ beads in the membrane organization and understand the increase of phosphatidylserine due to potential defects in the homeostasis of exposed spermatozoa.

Aggregates of 50-COOH beads could trap oyster spermatozoa. Interestingly, the 50-COOH suspension in the spermatozoa experimental medium displayed a higher aggregate size (2.3 times) in comparison to seawater. The contribution of high cations content (Na⁺, Ca²⁺ and K⁺) occurring naturally in the seminal fluid (Boulais *et al.* 2018) may have promoted interactions with the negative surface charge of the 50-COOH beads, increasing homo-aggregation processes. Under such conditions, spermatozoa interact with micro-scale aggregates that may affect their movement. Indeed, confocal microscopy and SEM showed a myriad of spermatozoa trapped into large micro-scale aggregates formed by the 50-COOH beads in the experimental medium. This result suggests a physical trapping of spermatozoa by 50-COOH aggregates which could explain the decrease in spermatozoa motility at the highest dose. This mechanism was already described on coral spermatozoa when exposed to colloidal matter (suspended sediments) that formed aggregates (Humanes *et al.* 2017). The dilution of spermatozoa at the end of the exposure in 1.5 L to evaluate the reproductive success could

have liberated spermatozoa trapped in aggregates, leading to no effect in the D-Larval yield. This suggests no acute cell damages which is consistent with the other results, *i.e.* no effects on membrane (composition, integrity) and on the ROS production. However, we cannot exclude a total absence of sperm health impairments as the high spermatozoa-to-oocyte ratio (100:1) can interfere in the result of the D-Larval yield. Overall, millions of spermatozoa are produced/released but at the end one is enough to deliver genetic material in oocyte. Therefore, the fraction of unaffected spermatozoa by 50-COOH aggregates could be sufficient to ensure fertilization.

No translocation of nano-PS beads into oyster spermatozoa. Conventionally, the risk of translocation into cells depends on the size of particles, *e.g.* translocation efficiency of nano-PS beads up to 7.8% for 50 nm beads and 0.8% for 100 nm beads into human cell lines (Walczak *et al.* 2015). Here, no evidences of translocation were highlighted in oyster spermatozoa by confocal and electron microscopy for both 50-NH₂ and 50-COOH beads at 25 µg.mL⁻¹. This result could be explained by specific properties of the germ cells, *i.e.* spermatozoa do not have endocytic processes, which are important pathways to internalize nanoparticles (Taylor *et al.* 2015). Nevertheless, because (i) other works observed translocation of engineered nanoparticles into spermatozoa, *e.g.* 40 nm silver nanoparticles in mouse spermatozoa (Yoisungnern *et al.* 2015), (ii) nano-PS beads exhibit low contrast for TEM analyses (also remarked by Jeong *et al.* (2018)), it would be relevant to expose oyster spermatozoa to ¹⁴C-radiolabeled or metal-doped nano-PS which may greatly enhance nanoparticles detection and fate in marine cells and organisms (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2018, Mitrano *et al.* 2019).

5) CONCLUSION

This study demonstrated interactions between nano-PS beads and oyster spermatozoa with a spermotoxicity as a function of the surface functionalization. Whereas several cellular disruptions and possible translocation were expected, this work mostly highlighted a toxicity related to the adhesion of nano-PS beads on the spermatozoa calling for further analyses on transmembrane components such as recognition proteins or ion-channels to establish the toxic pathway.

Although this study highlighted effects of nano-PS particles on oyster spermatozoa, we remain

cautious about any extrapolation to the natural environment. Furthermore, we used model nanoparticles with spherical shape and surface functionalization available commercially whereas environmental nanoplastics could be more complex in terms of shape (*e.g.* irregular) or surface chemistry (*e.g.* presence of pollutants, eco-corona) (Paul-Pont et al., 2018). This complexity must be considered in future studies using oyster spermatozoa as a sensitive model. Characterization and quantification of environmental nanoplastics, as well as production of model particles better mimicking natural nanoplastics, are required to provide accurate risks scenarios and determine whether they constitute a threat for marine ecosystems.

6) SUPPLEMENTARY INFORMATION

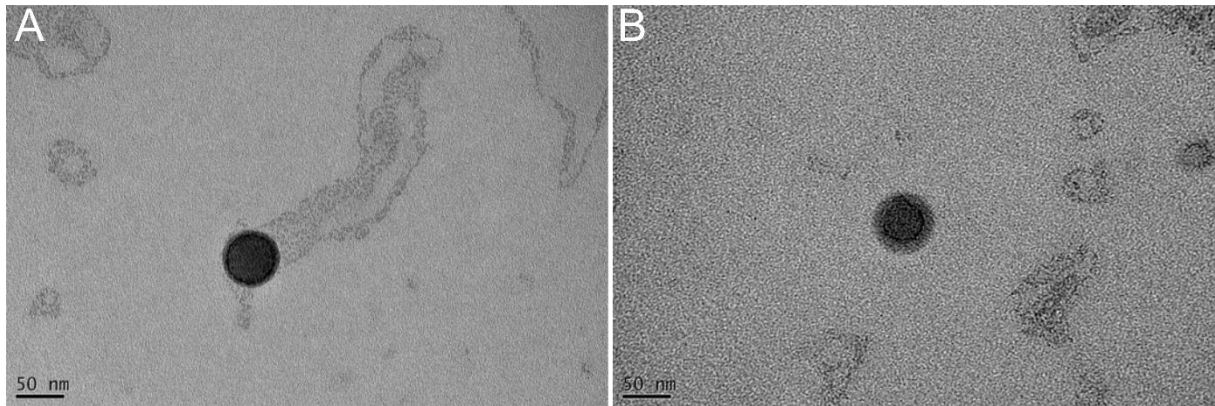


Figure S1. TEM observations of the 50-NH₂ (A) and 50-COOH (B) beads.

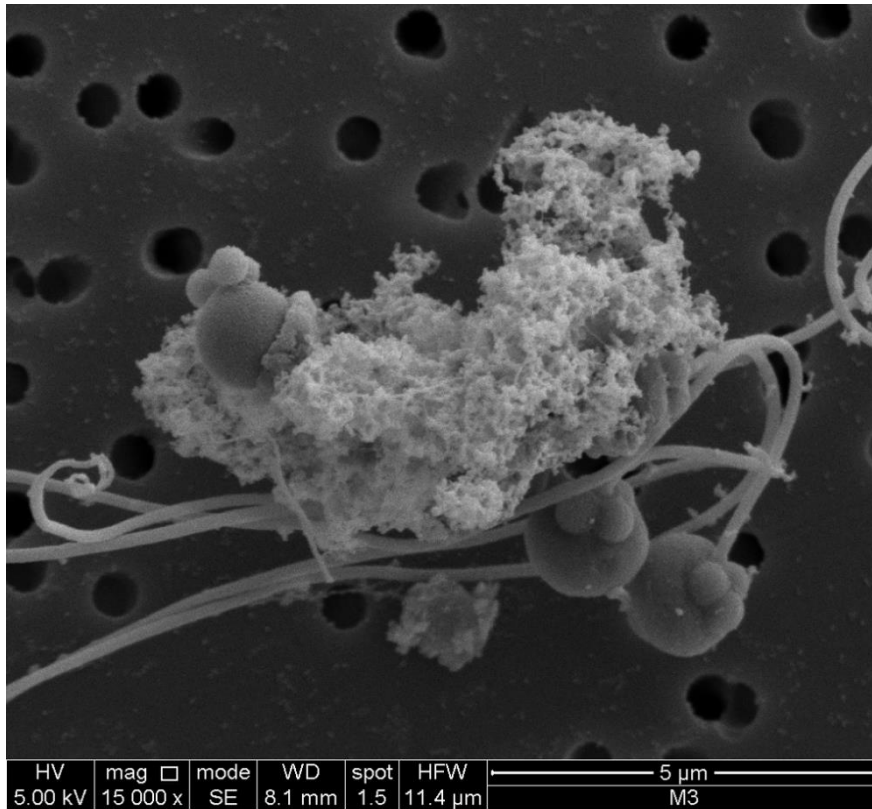


Figure S2. Scanning electron microscopy observations of oyster spermatozoa embedded in aggregates of 50-COOH beads after 1h of exposure. Size is represented by the scale bar.

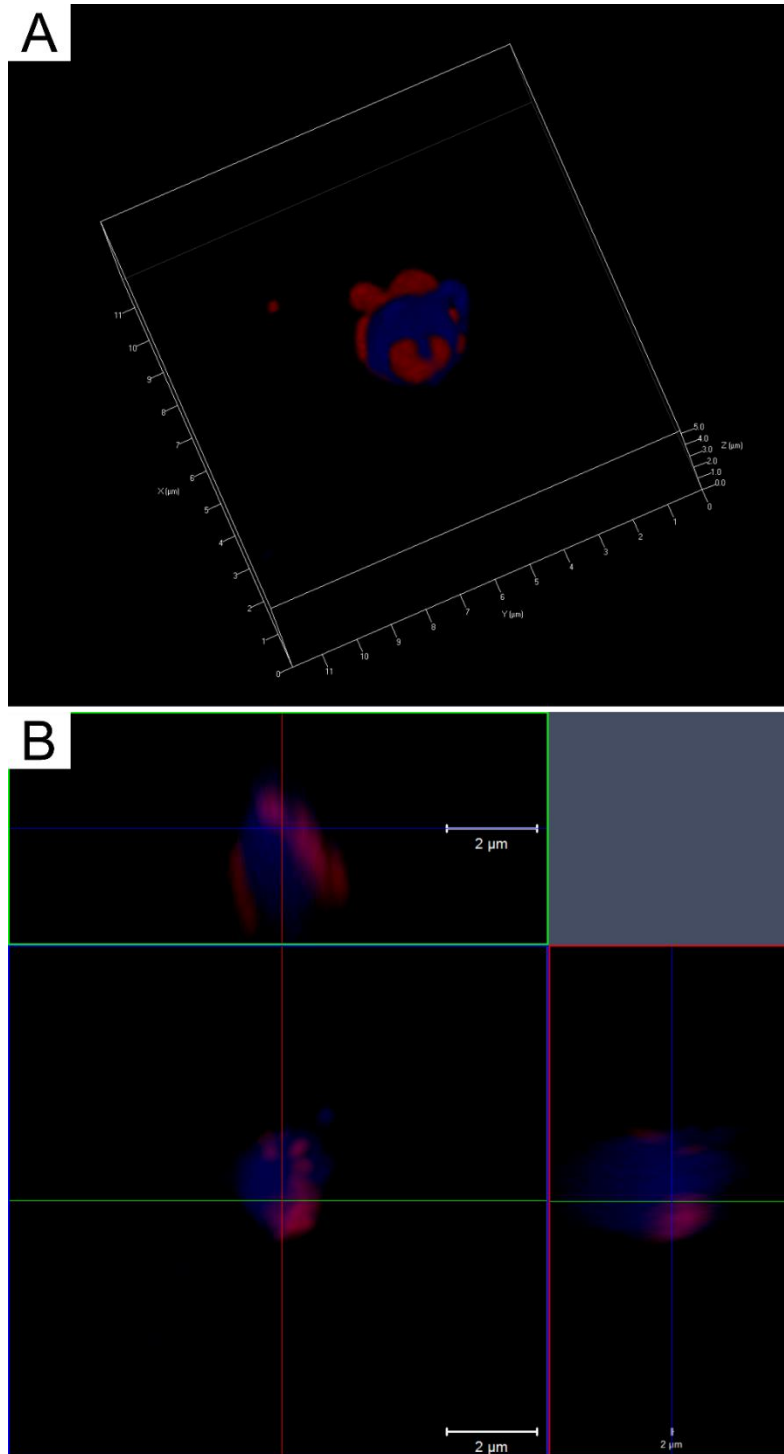


Figure S3. Confocal laser scanning microscopy of oyster spermatozoa (in blue) after 1h of exposure to 50-COOH beads at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A; red); (B) Cross-section showing the x-z (upper side) and y-z axis (right side). Size is represented by the scale bar.

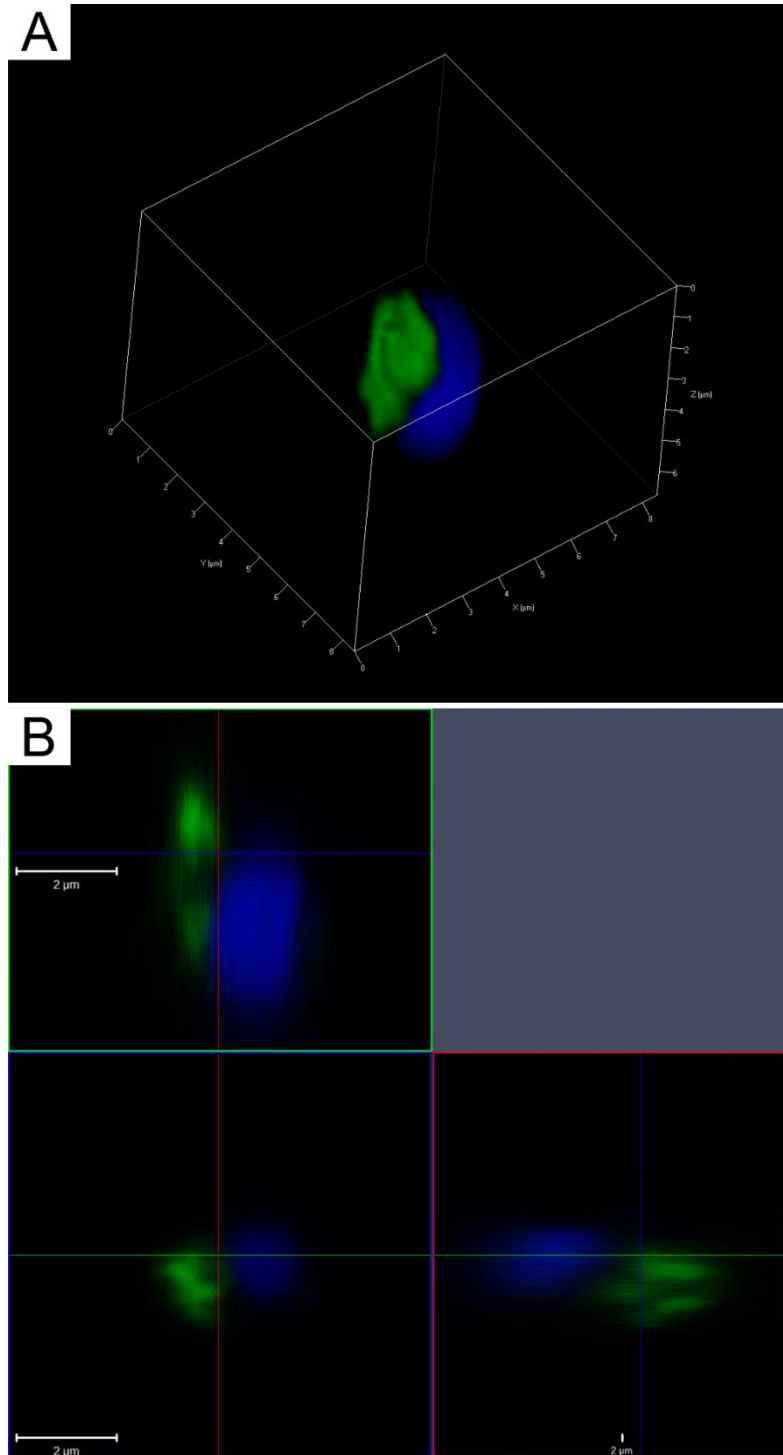


Figure S4. Confocal laser scanning microscopy of oyster spermatozoa (in blue) after 1h of exposure to 50-NH₂ beads at 25 µg.mL⁻¹ (A; green); (B) Cross-section showing the x-z (upper side) and y-z axis (right side). Size is represented by the scale bar.

Table S1. Fatty acid (FA) composition of oyster spermatozoa neutral lipids (n=4; mean \pm SD) after 1h in various treatments: Control; 50-COOH (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 50-NH₂ (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 50-NH₂ (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

	Conditions			
	Control	50-COOH (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	50-NH ₂ (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	50-NH ₂ (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
iso17:0	0.56 \pm 0.04	0.57 \pm 0.03	0.58 \pm 0.06	0.57 \pm 0.05
Σ BRANCHED	0.56 \pm 0.04	0.57 \pm 0.03	0.58 \pm 0.06	0.57 \pm 0.05
14:0	2.83 \pm 0.34	2.62 \pm 0.34	2.68 \pm 0.28	2.61 \pm 0.27
15:0	0.48 \pm 0.03	0.51 \pm 0.06	0.50 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
16:0	19.85 \pm 1.59	19.94 \pm 1.41	20.33 \pm 1.04	20.88 \pm 1.74
17:0	1.36 \pm 0.13	1.40 \pm 0.05	1.37 \pm 0.20	1.40 \pm 0.09
18:0	11.17 \pm 2.64	10.90 \pm 2.34	11.21 \pm 2.14	11.56 \pm 2.49
Σ SFA	35.44 \pm 3.89	35.37 \pm 3.47	36.10 \pm 2.95	36.96 \pm 3.95
16:1n-7	2.14 \pm 0.28	2.10 \pm 0.33	2.16 \pm 0.30	2.11 \pm 0.29
18:1n-9	2.69 \pm 0.24	2.73 \pm 0.25	2.69 \pm 0.26	2.68 \pm 0.15
18:1n-7	6.50 \pm 0.76	6.53 \pm 0.58	6.43 \pm 0.67	6.55 \pm 0.67
20:1n-11	1.35 \pm 0.09	1.34 \pm 0.07	1.35 \pm 0.12	1.35 \pm 0.07
20:1n-9	0.09 \pm 0.10	0.07 \pm 0.15	0.22 \pm 0.16	0.16 \pm 0.11
20:1n-7	4.93 \pm 0.56	5.05 \pm 0.54	4.93 \pm 0.50	4.97 \pm 0.50
Σ MUFA	17.70 \pm 1.54	17.83 \pm 1.36	17.79 \pm 1.73	17.83 \pm 1.22
18:2n-6	1.19 \pm 0.06	1.14 \pm 0.06	1.12 \pm 0.13	1.16 \pm 0.08
18:3n-6	1.33 \pm 0.27	1.29 \pm 0.27	1.27 \pm 0.27	1.29 \pm 0.25
18:4n-3	5.43 \pm 1.51	6.98 \pm 1.68	5.08 \pm 0.52	4.68 \pm 0.44
20:4n-6	1.47 \pm 0.08	1.52 \pm 0.09	1.41 \pm 0.13	1.42 \pm 0.12
20:4n-3	0.60 \pm 0.11	0.59 \pm 0.16	0.58 \pm 0.16	0.54 \pm 0.14
20:5n-3	17.36 \pm 1.76	17.07 \pm 1.75	16.18 \pm 2.55	16.47 \pm 2.21
21:5n-3	1.13 \pm 0.10	1.07 \pm 0.09	1.05 \pm 0.11	1.10 \pm 0.10
22:5n-3	1.97 \pm 0.55	1.66 \pm 0.50	2.09 \pm 0.88	1.75 \pm 0.66
22:6n-3	7.49 \pm 0.65	7.14 \pm 0.61	7.41 \pm 1.10	7.21 \pm 0.86
20:2j	1.17 \pm 0.19	1.19 \pm 0.22	1.14 \pm 0.24	1.13 \pm 0.26
22:2i	1.30 \pm 0.91	0.94 \pm 1.03	2.41 \pm 1.56	2.13 \pm 0.82
22:2j	4.28 \pm 0.27	4.19 \pm 0.48	4.32 \pm 0.44	4.40 \pm 0.51
Σ PUFA	44.74 \pm 3.68	44.80 \pm 2.82	44.03 \pm 2.16	43.29 \pm 3.01
18:ODMA	1.56 \pm 0.60	1.43 \pm 0.30	1.50 \pm 0.82	1.35 \pm 0.45
Σ DMA	1.56 \pm 0.60	1.43 \pm 0.30	1.50 \pm 0.82	1.35 \pm 0.45

Table S2. Fatty acid (FA) composition of oyster spermatozoa polar lipids (n=4; mean \pm SD) after 1h in various treatments: Control; 50-COOH (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 50-NH₂ (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 50-NH₂ (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

	Conditions			
	Control	50-COOH (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	50-NH ₂ (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	50-NH ₂ (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
iso17:0	0.66 \pm 0.02	0.67 \pm 0.02	0.70 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01
Σ BRANCHED	0.66 \pm 0.02	0.67 \pm 0.02	0.70 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01
14:0	0.73 \pm 0.06	0.77 \pm 0.02	0.78 \pm 0.07	0.75 \pm 0.08
16:0	19.96 \pm 0.07	20.51 \pm 0.17	21.40 \pm 0.34	20.87 \pm 0.57
17:0	1.01 \pm 0.01	1.06 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03	1.05 \pm 0.03
18:0	2.78 \pm 0.13	2.85 \pm 0.27	2.86 \pm 0.14	2.70 \pm 0.21
Σ SFA	24.95 \pm 0.13	25.67 \pm 0.33	26.62 \pm 0.51	25.84 \pm 0.72
18:1n-9	1.47 \pm 0.03	1.43 \pm 0.07	1.46 \pm 0.02	1.47 \pm 0.05
18:1n-7	3.37 \pm 0.36	3.33 \pm 0.40	3.37 \pm 0.40	3.35 \pm 0.40
20:1n-11	0.66 \pm 0.16	0.76 \pm 0.11	0.73 \pm 0.14	0.56 \pm 0.22
20:1n-9	0.94 \pm 0.16	1.15 \pm 0.10	1.18 \pm 0.16	1.16 \pm 0.13
Σ MUFA	7.80 \pm 0.41	8.12 \pm 0.49	8.14 \pm 0.52	7.85 \pm 0.26
16:4n-3	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.00
18:2n-6	1.35 \pm 0.08	1.37 \pm 0.06	1.33 \pm 0.05	1.32 \pm 0.14
18:3n-3	1.25 \pm 0.04	1.26 \pm 0.05	1.22 \pm 0.04	1.25 \pm 0.11
18:4n-3	1.91 \pm 0.14	1.94 \pm 0.20	1.88 \pm 0.13	1.95 \pm 0.21
20:2n-6	3.88 \pm 0.16	3.88 \pm 0.23	3.78 \pm 0.18	3.79 \pm 0.09
20:4n-6	2.76 \pm 0.15	2.70 \pm 0.12	2.70 \pm 0.14	2.74 \pm 0.15
20:5n-3	23.08 \pm 0.27	22.44 \pm 0.42	22.28 \pm 0.40	22.84 \pm 0.37
21:5n-3	2.09 \pm 0.06	2.01 \pm 0.06	1.99 \pm 0.10	2.06 \pm 0.06
22:5n-6	0.52 \pm 0.02	0.52 \pm 0.04	0.58 \pm 0.04	0.52 \pm 0.02
22:5n-3	2.53 \pm 0.12	2.43 \pm 0.08	2.43 \pm 0.16	2.48 \pm 0.11
22:6n-3	18.75 \pm 0.29	18.37 \pm 0.33	17.93 \pm 0.94	18.61 \pm 0.74
20:2i	0.59 \pm 0.05	0.58 \pm 0.06	0.57 \pm 0.02	0.57 \pm 0.05
22:2j	1.42 \pm 0.14	1.37 \pm 0.12	1.37 \pm 0.11	1.41 \pm 0.14
Σ PUFA	62.12 \pm 0.48	60.81 \pm 0.83	59.87 \pm 0.93	61.63 \pm 1.33
18:0DMA	3.65 \pm 0.65	3.98 \pm 0.43	3.88 \pm 0.52	3.15 \pm 1.16
Σ DMA	3.65 \pm 0.65	3.98 \pm 0.43	3.88 \pm 0.52	3.15 \pm 1.16
Σ Unknown (4 FA)	0.83 \pm 0.16	0.76 \pm 0.08	0.78 \pm 0.12	0.85 \pm 0.18
Others ^a	4.49 \pm 0.33	4.48 \pm 0.11	4.34 \pm 0.30	4.58 \pm 0.53

^aOthers: 15:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 16:1n-5, 18:1n-11, 18:1n-5, 20:1n-7, 16:2n-7, 16:3n-4, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 20:2j, 20:3n-6, 20:4n-3, 22:2i, 22:4n-6, each accounting for less than 0.5% of the total FA.

PARTIE 2 : TOXICITE DES NANO-PS SUR LES OVOCYTES

1) INTRODUCTION

Le succès de reproduction de *C. gigas* est dépendant de la qualité des ovocytes. Tandis que le spermatozoïde a pour principale fonction d'apporter le matériel génétique paternel lors de la fécondation, l'ovocyte supporte le développement embryo-larvaire par la présence de réserves vitellines héritées de la mère (*e.g.* protéines, ARNm, lipides; Boulais et al., 2015b). Similairement aux spermatozoïdes, les ovocytes sont sensibles aux contaminants extérieurs (*e.g.* algues toxiques, Le Goïc et al., 2014; pesticides, Mai et al., 2013a; métaux; Mai et al., 2013b). Généralement, les ovocytes affichent une résistance supérieure aux contaminants en comparaison aux spermatozoïdes que les auteurs attribuent à la présence d'une membrane moins perméable (Mai et al., 2013a; Mai et al., 2013b; Fitzpatrick et al., 2008). Cette présente étude avait ainsi pour objectif de déterminer la sensibilité des ovocytes de *C. gigas* aux nano-PS (50-NH₂ et 50-COOH) afin de compléter nos analyses sur les gamètes et de pouvoir comparer leurs sensibilités respectives.

2) MATERIEL ET METHODES

a) Caractérisation des nanosphères de polystyrène

Les mêmes nano-PS (50 nm) que celles utilisées pour l'exposition des spermatozoïdes (*i.e.* 50-NH₂ et 50-COOH) ont été utilisées pour cette nouvelle expérience. Le comportement des nano-PS a été examiné dans deux milieux différents : (i) Eau de mer filtrée sur 0,2 µm (EMF); (ii) Milieu expérimental filtré sur 0,2 µm (*i.e.* filtrat d'ovocytes) selon le protocole détaillé dans la partie 1 de ce chapitre.

b) Procédures expérimentales

Collecte des ovocytes et expositions aux nano-PS

En août 2018, les ovocytes de 12 huîtres matures provenant de la rade de Brest ont été prélevés par scarification de la gonade à l'aide d'outils stériles selon la procédure de Song et al. (2009). Des pools d'ovocytes (n= 4) ont été obtenus par le mélange des gamètes de trois femelles. La concentration en ovocytes a été mesurée par cytométrie en flux (cytomètre EasyCyte Plus ; Guava Merck Millipore, Etats-Unis). Ensuite, les ovocytes (50 000 ovocytes.mL⁻¹

¹) ont été exposés à 5 concentrations de 50-NH₂ et 50-COOH (0 – Témoin ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 µg.mL⁻¹) pendant 1h. A la fin de l'exposition, l'état physiologique (production d'espèces réactives de l'oxygène – ROS ; intégrité de la membrane) et le succès reproducteur (taux de fécondation et taux de larves D) ont été mesurés (voir ci-dessous). Une expérimentation annexe a été réalisée selon la même procédure d'exposition décrite ci-dessus à l'aide de nano-PS fluorescentes (décrites dans la partie 1 du chapitre) afin d'examiner l'interaction des particules avec les ovocytes par microscopie confocale.

Mesure de l'état physiologique des ovocytes par cytométrie en flux

L'intégrité de la membrane et la production de ROS par les ovocytes ont été évaluées par cytométrie en flux (cytomètre EasyCyte Plus) selon les procédures développées par Le Goïc et al. (2014). Brièvement, l'intégrité de la membrane a été mesurée après le double marquage (10 minutes) des ovocytes par du SYBR-Green (dilution par 100 de la solution commerciale) et du iodure de propidium (PI ; concentration finale : 10 µg.mL⁻¹). Le PI pénètre exclusivement les cellules présentant une perte d'intégrité membranaire (cellules considérées alors comme mortes) tandis que le SYBR-Green pénètre à la fois les cellules vivantes et mortes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes (%). La production de ROS a été évaluée à l'aide d'un marquage (1 heure) des ovocytes par le 2'-7'dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA ; concentration finale : 10 µM). Le DCFH-DA est clivé par les estérases en DCFH qui est oxydé par les ROS en DCF qui émet une fluorescence verte. La quantité relative en ROS est ainsi exprimée selon le niveau moyen de la fluorescence verte émise par les cellules (unités arbitraires, U.A).

Microscopie confocale

Un microscope confocale (Zeiss LSM 780, Allemagne) a été utilisé afin d'étudier l'interaction entre nano-PS et ovocytes. Les ovocytes témoins et exposés à 25 µg.mL⁻¹ de 50-NH₂ ou 50-COOH fluorescentes ont été fixés dans une solution tamponnée à l'EMF de glutaraldéhyde (6% final) et stockés à 4°C pendant 48h. Les ovocytes ont été marqués au DAPI 1% (40,6-diamidino-2-phenylindole ; 10 min à l'obscurité ; excitation/émission 405 nm/455 nm) juste avant l'observation pour permettre une visualisation 3D. Des excitations/émissions de 488 nm/543 nm et 514 nm/612 nm ont été utilisées sur le microscope afin de visualiser les 50-NH₂ et 50-COOH, respectivement.

Evaluation du succès reproducteur

A la fin de l'heure d'exposition, les ovocytes de toutes les conditions ont été filtrés sur 20 μm afin de retirer les nano-PS du milieu. Les ovocytes ont ensuite été transférés dans 30 mL d'EMF (20°C) contenant des spermatozoïdes non exposés (issus de la scarification de 4 pools de 3 mâles selon le protocole détaillé dans la partie 1) à un ratio de 100 spermatozoïdes pour 1 ovocyte et une concentration de 50 ovocytes.mL⁻¹. Après 1h30 de contact, le taux de fécondation a été mesuré sous microscope (Axio Observer microscope, Zeiss ; 100 ovocytes observés par réplica) : (nombre d'ovocytes fécondés/nombre d'ovocytes) \times 100. Après 36h, toutes les conditions ont été figées par l'ajout d'une solution tamponnée à l'EMF de formaldéhyde (0,1% final) pour permettre l'évaluation du taux de larves D normales sous microscope (Axio Observer microscope, Zeiss ; 100 larves observées par réplica) : (nombre de larves D normales/nombre de larves D normales et anormales) \times 100. Une larve anormale réfère à la présence de malformations coquillères et/ou du manteau ou d'un arrêt de développement précoce (Mottier et al., 2013).

c) Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les représentations graphiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2016). Les comparaisons des moyennes ont été réalisées par Anova à un facteur ou par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis après la vérification de la normalité (test de Shapiro-Wilk) et de l'homogénéité des variances (test de Levene). Dans le cas d'un effet significatif, le test de Tukey (paramétrique) ou de Conover (non-paramétrique) ont été utilisés pour effectuer des comparaisons par paire. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

3) RESULTATS

a) Caractérisation des nanosphères de polystyrène

Les résultats obtenus par DLS sont disponibles dans le Tableau 1. Les 50-COOH ont formé de larges agrégats ($6725,0 \pm 1127,9$ nm) dans de l'EMF tandis que la taille des agrégats a diminué significativement ($p < 0,05$) dans le filtrat d'ovocytes ($993,9 \pm 52,3$ nm). Les 50-COOH ont affiché une charge de surface négative dans les deux milieux d'eau de mer avec un potentiel zêta de $-17,8 \pm 4,3$ mV dans l'EMF et $-10,2 \pm 2,3$ mV dans le filtrat d'ovocytes. Les 50-NH₂ ont présenté une faible agrégation dans l'EMF caractérisée par une taille moyenne de $102,0 \pm 0,8$

nm alors que l'inverse fut observé dans le filtrat d'ovocytes ($1978,3 \pm 53,6$ nm). Un changement de polarité a été remarqué pour les 50-NH₂ entre l'EMF et le filtrat d'ovocytes avec une charge de surface de $23,4 \pm 5,8$ mV et $-6,3 \pm 1,7$ mV, respectivement.

Tableau 1. Taille et charge de surface des suspensions de 50-COOH et 50-NH₂ dans de l'eau de mer filtrée sur 0,2 µm (EMF) et dans le milieu expérimental (filtrat d'ovocytes). Les moyennes \pm écart-types des données sont présentées dans le tableau (n= 3 réplicas par condition).

Milieux	Particules	Taille des agrégats (nm)	Potentiel Zêta (mV)
EMF	50-COOH	$6725,0 \pm 1127,9$	$-17,8 \pm 4,3$
	50-NH ₂	$102,0 \pm 0,8$	$23,4 \pm 5,8$
Filtrat des ovocytes	50-COOH	$993,9 \pm 52,3$	$-10,2 \pm 2,3$
	50-NH ₂	$1978,3 \pm 53,6$	$-6,3 \pm 1,7$

b) Effets de l'exposition aux nano-PS sur l'état physiologique des ovocytes

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée concernant le pourcentage de cellules vivantes qui était toujours supérieur à 99% dans l'ensemble des conditions. L'incubation des ovocytes avec les 50-NH₂ n'a eu aucune incidence sur la production de ROS, quelle que soit la concentration en particules utilisée ($p > 0,05$). En revanche, une augmentation significative de la production de ROS a été observée pour les ovocytes exposés à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 50-COOH ($p < 0,05$) avec une valeur de 589 ± 183 U.A en comparaison de la condition témoin (262 ± 95 U.A ; Figure 1).

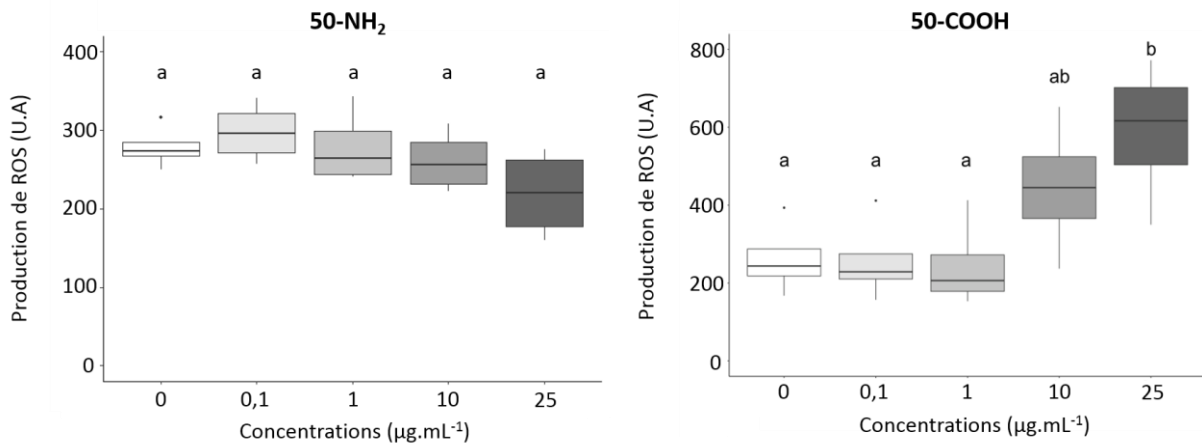


Figure 1. Production de ROS (U.A.) des ovocytes exposés durant 1h à différentes doses de 50-NH₂ ou 50-COOH (0 – Témoin ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 μg.mL⁻¹). Les conditions ont été comparées à l'aide d'une Anova et d'un post-hoc de Tukey. Les conditions non différentes significativement sont indiquées par la même lettre sur le graphique (n = 4 réplicas par condition).

c) Interactions nano-PS/ovocytes par microscopie confocale

Une adhésion des nano-PS sur les ovocytes a été observée pour les deux types de particules sous la forme d'agrégats de taille micrométrique (Figure 2). Aucun effet morphologique sur les ovocytes n'a été suggéré par les observations.

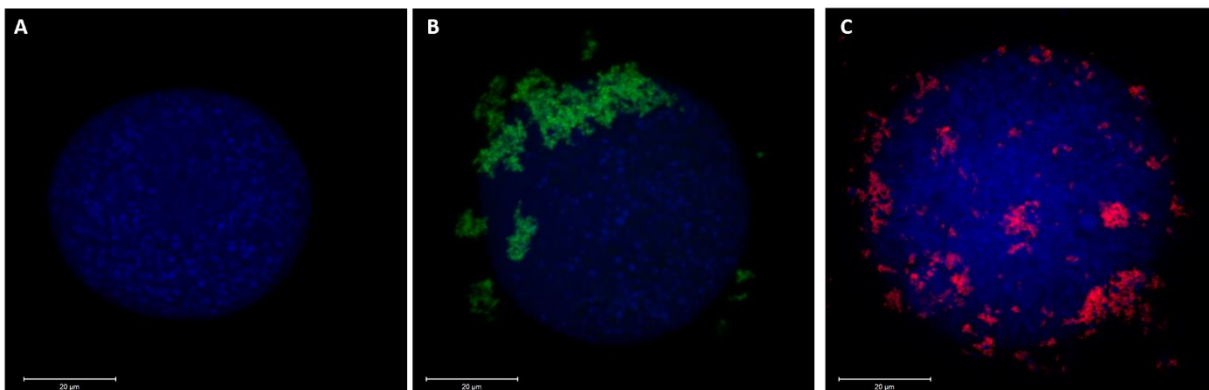


Figure 2. Observations par microscopie confocale d'ovocytes d'huîtres (en bleu) après 1h d'exposition à différents traitements : (A) Condition témoin (aucun ajout de particules), (B) Exposition aux 50-NH₂ (vert ; 25 μg.mL⁻¹), (C) Exposition aux 50-COOH (rouge ; 25 μg.mL⁻¹).

d) Effet des nano-PS sur le succès reproducteur

La plus forte concentration en 50-NH₂ a diminué de 20 % le taux de fécondation des ovocytes (72 ± 7 %) en comparaison des ovocytes témoins dont le taux de fécondation était de 91 ± 6 % (p < 0.05 ; Figure 3A). De même, une diminution significative de 15% du taux de larves D normales a été observée pour la condition correspondant aux ovocytes préalablement exposés à 25 µg.mL⁻¹ de 50-NH₂ (79 ± 8 %) par rapport à la condition avec des ovocytes témoins (94 ± 2 %, p < 0.05 ; Figure 3B). Aucun effet des trois autres concentrations en 50-NH₂ et des quatre concentrations testées en 50-COOH n'a été observé sur le taux de fécondation (valeur moyenne= 93 ± 3 %) et le taux de larves D normales (valeur moyenne= 88 ± 4 %).

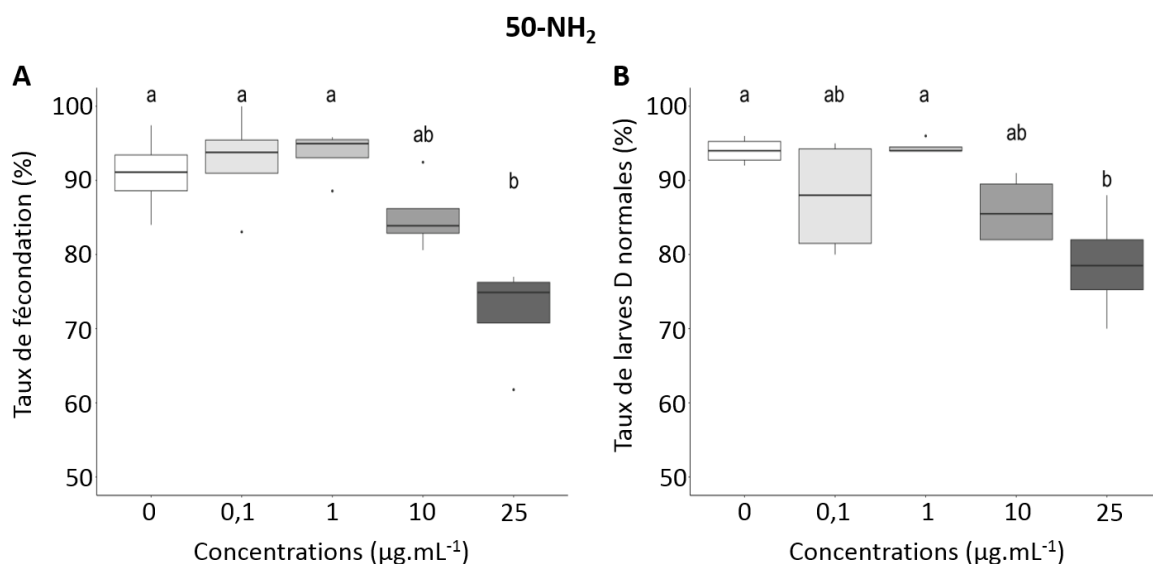


Figure 3. Taux de fécondation (A) et de larves D normales (B) après une exposition des ovocytes à cinq concentrations de 50-NH₂ : 0 – Témoin ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 µg.mL⁻¹. Pour le taux de fécondation, les conditions ont été comparées à l'aide d'une Anova et d'un post-hoc de Tukey tandis qu'un test de Kruskal-Wallis et un post-hoc de Conover ont été utilisés pour comparer les résultats du taux de larves D normales. Les conditions non différentes significativement sont indiquées par la même lettre sur le graphique (n = 4 réplicas par condition).

4) DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL

Les changements d'état d'agrégation et de charge de surface des nano-PS dans le milieu expérimental par rapport à l'EMF pourraient être attribués à la présence de composés du liquide ovarien, induisant la mise en place d'une enveloppe autour des particules (« corona ») modifiant ainsi leurs propriétés physico-chimiques (Canesi et al., 2016; Marques-Santos et al., 2018). A notre connaissance, la composition du liquide ovarien de l'huître n'a jamais été

caractérisée mais pourrait être riche en ions, protéines, lipides comme observé chez d'autres espèces marines (*e.g.* poissons ; Lahnsteiner et al., 1995).

Une interaction physique similaire entre les agrégats formés par les deux nano-PS avec la membrane ovocytaire est suggérée par les résultats de microscopie confocale. Pourtant, une toxicité supérieure des 50-NH₂ par rapport aux 50-COOH a été observée chez les ovocytes de *C. gigas* similairement aux travaux que nous avons réalisés sur les spermatozoïdes. La toxicité des 50-NH₂ sur les organismes aquatiques est généralement attribuée à sa stabilité dans l'eau de mer (échelle nanométrique conservée) et sa nature cationique conférant une forte affinité avec les membranes biologiques chargées négativement (Lehner et al., 2019). Pourtant, nos résultats ont montré à la fois une forte agrégation des 50-NH₂ ($1978,3 \pm 53,6$ nm) et un changement de polarité ($-6,3 \pm 1,7$ mV) dans le milieu expérimental, *i.e.* le filtrat d'ovocytes. Ce changement de polarité des 50-NH₂ a déjà été mis en évidence dans le fluide coelomique de l'oursin *Paracentrotus lividus* sous l'effet de l'adhésion des protéines du fluide, appuyant notre hypothèse concernant la formation d'une corona autour des particules dans le liquide ovarien de *C. gigas* (Marques-Santos et al., 2018). En raison des propriétés physico-chimiques similaires entre les deux nano-PS dans le milieu expérimental, la différence de toxicité est induite par un autre paramètre qui pourrait être la nature de la corona qui est dépendante des groupements de surface associés aux nano-PS (Lundqvist et al., 2008). La corona définit l'identité biologique de la particule et peut faciliter les interactions avec les cellules vivantes (Canesi & Corsi, 2015; Lesniak et al., 2013). Par exemple, l'incubation des 50-NH₂ dans le sérum hémocytaire de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) augmente leur toxicité sur les hémocytes par rapport à des particules non-incubées (Canesi et al., 2016). Ces auteurs attribuent cette différence d'effet par la présence de composés protéiques à la surface des particules qui permettent l'interaction avec des récepteurs membranaires spécifiques, induisant ainsi une transduction de signal et une réponse cellulaire. De ce fait, de futures analyses devraient être consacrées à (i) la caractérisation de la corona des 50-NH₂ dans le filtrat d'ovocytes de *C. gigas* et (ii) l'identification des mécanismes cellulaires responsables de la réduction du succès reproducteur après l'exposition par une analyse transcriptionnelle globale (*i.e.* RNAseq).

Un résultat intéressant de nos analyses réside dans l'augmentation significative de la production de ROS pour les ovocytes exposés à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 50-COOH sans pour autant observer d'effets sur les taux de fécondation et de larves D normales. Généralement, la

surproduction de ROS chez l'ovocyte est associée dans la littérature à l'induction d'un stress oxydant pouvant mener à une génotoxicité (*i.e.* fragmentation de l'ADN) responsable d'une perte de viabilité et donc l'inhibition de sa capacité reproductrice (Gallo et al., 2018 ; Le Goïc et al., 2014). Toutefois, l'absence d'effet sur le taux de fécondation et de larves D normales ne suggère aucune dysfonction majeure des ovocytes exposés aux 50-COOH. Nos résultats démontrent donc la nécessité d'interpréter avec grande prudence la seule augmentation de la production de ROS comme marqueur de toxicité pour les ovocytes de *C. gigas* et plus largement lors de l'exposition de cellules ou organismes à des MNP.

Dans les deux expériences de ce chapitre, le choix a été fait de ne pas exposer les gamètes au moment des fécondations afin de déterminer si les effets observés dans le chapitre précédent étaient le résultat d'une perturbation propre au fonctionnement cellulaire de chaque gamète. En tenant compte des résultats obtenus séparément pour les spermatozoïdes et les ovocytes de l'huître, le succès reproducteur semble être peu impacté par les nano-PS à l'exception de très fortes concentrations des 50-NH₂ (10 – 25 µg.mL⁻¹) lors d'une exposition avant la fécondation. Ceci est remarquable puisque l'exposition simultanée des gamètes lors de leur rencontre induit quant à elle une réduction significative du taux de fécondation dès 1 µg.mL⁻¹ pour les deux particules (Chapitre 4). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère des effets cumulatifs ou synergiques liés à la présence des nano-PS pendant l'étape clé de la fécondation qui est médiée par des réactions spécifiques (*e.g.* reconnaissance, réaction acrosomique, fusion; Vacquier, 1998), ce qui diffère des deux expériences présentées dans ce chapitre (gamètes rincées/filtrées pour éliminer la fraction nano avant fécondation). Plusieurs hypothèses (non-exclusives) peuvent être émises pour expliquer ces observations : (i) L'interaction (*e.g.* adhésion) des nano-PS sur la tête des spermatozoïdes pourrait empêcher l'action des protéines transmembranaires servant à la reconnaissance de l'ovocyte (Vacquier, 1998) ; (ii) L'adhésion des nano-PS sur l'ovocyte pourrait masquer ou perturber les microvillosités présentes à la surface de l'ovocyte servant à sa reconnaissance par les spermatozoïdes et au déclenchement de la réaction acrosomique permettant la fécondation (Rosati, 1995) ; (iii) Les nano-PS pourraient affecter la membrane des ovocytes au moment de la pénétration du spermatozoïde. En effet, l'arrimage du spermatozoïde sur l'ovocyte entraîne la libération du contenu acrosomique déclenchant un relâchement et une fragilisation de la membrane ovocytaire (Vacquier, 1998). Cette perturbation pourrait accentuer la sensibilité

des ovocytes aux interactions membranaires avec les nano-PS adsorbés à leur surface et entrainer une inhibition de la fécondation en cours.

A RETENIR

- Les effets des nano-PS sur les spermatozoïdes et ovocytes d'huître dépendent du type particulaire (-NH₂ ou -COOH).
- Dans notre contexte expérimental, les particules aminées (50-NH₂) ont diminué le succès reproducteur des spermatozoïdes et des ovocytes à partir de 10 et 25 µg.mL⁻¹ respectivement.
- La forte adhésion des 50-NH₂ sur les cellules est responsable de la perte irréversible des capacités de motilité des spermatozoïdes, potentiellement par une altération dans le fonctionnement des composés transmembranaires supportant l'homéostasie cellulaire.
- Les particules carboxylées (50-COOH) n'ont provoqué aucun effet sur le succès reproducteur des deux types de gamètes.
- Du fait des résultats obtenus dans le chapitre 4, de nouvelles investigations sont nécessaires afin de déterminer les effets spécifiques des nano-PS lors de la rencontre des gamètes.

CHAPITRE 6

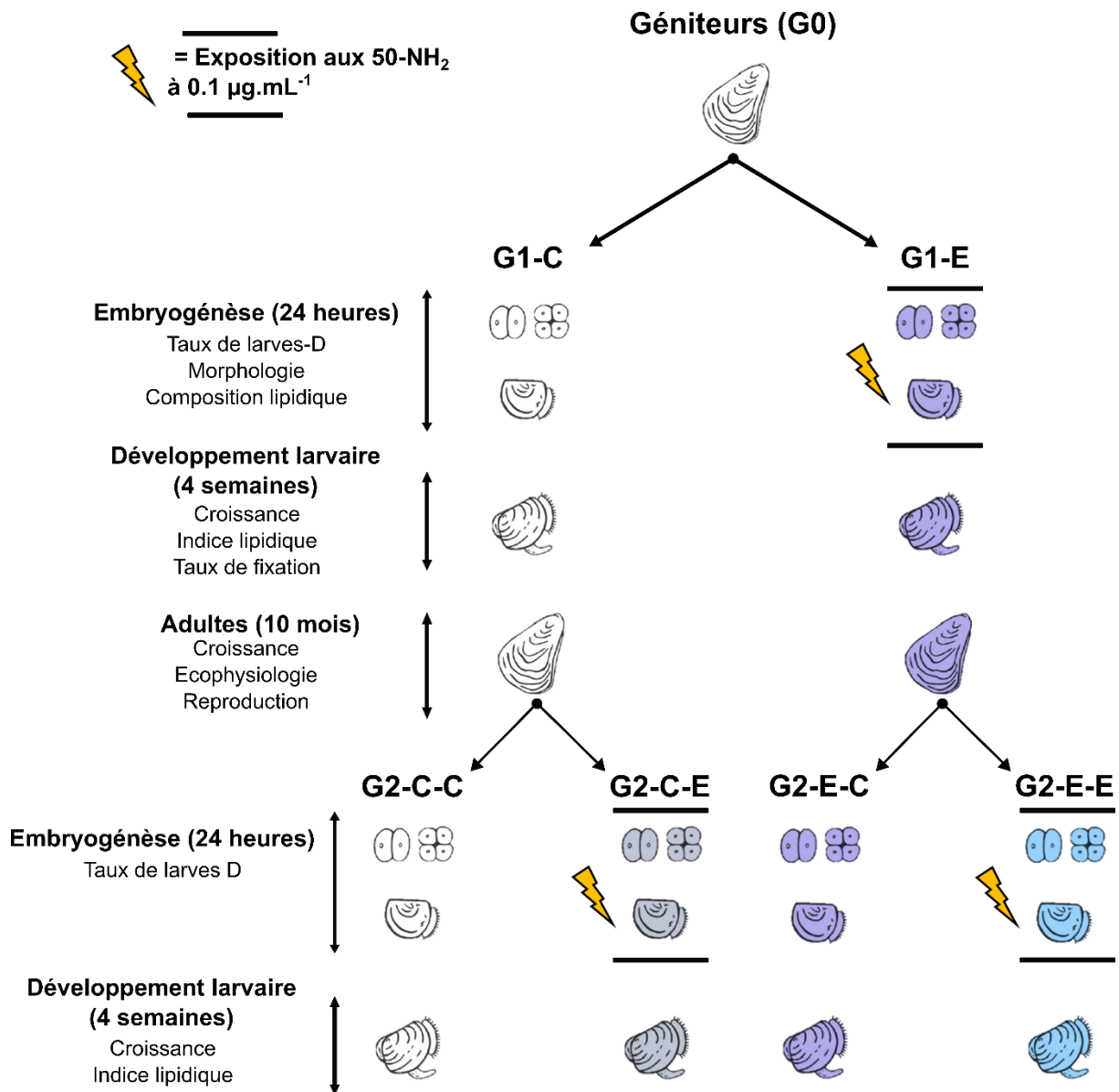
EXPOSITION EMBRYONNAIRE
AUX NANOPLASTIQUES (PS-NH₂)
SUR DEUX GENERATIONS
D'HUÎTRES : CONSEQUENCES SUR
LES PERFORMANCES LARVAIRES
ET ADULTES

PREAMBULE

Un embryon est le résultat de la fusion du matériel génétique entre un spermatozoïde et un ovocyte lors de la fécondation. Dans le cadre de la fécondation externe, cet embryon va évoluer très rapidement à travers d'importants changements morphologiques (*e.g.* division cellulaire, organogénèse) par le déclenchement de voies cellulaires spécifiques et l'utilisation du contenu énergétique hérité de la mère. Un développement embryonnaire mené avec succès est essentiel pour assurer la suite du développement larvaire et logiquement la pérennité d'une population naturelle (Hamdoun & Epel, 2007). Toutefois, les embryons doivent faire face à la diversité de perturbateurs anthropiques présents dans l'environnement. Sous l'effet de cette pression environnementale, l'embryon peut sortir de son « optimum » de croissance et présenter diverses réponses (*e.g.* stimulation des défenses embryonnaires, un retard de développement) jusqu'à un seuil à partir duquel l'environnement engendre des effets tératogènes (Hamdoun & Epel, 2007). De plus, la modification de ce développement embryonnaire peut induire des modifications phénotypiques sur les stades subséquents (*e.g.* juvénile, adulte), voir des effets à travers les générations car les embryons supportent la différenciation des cellules germinales primordiales (Hicken et al., 2011; Vignet et al., 2014; Bhandari et al., 2015).

Dans le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse, une forte toxicité dose-dépendante des nanosphères de polystyrène (50 nm) a été mise en évidence sur le succès du développement embryon-larvaire de *C. gigas*. Cette toxicité était hautement dépendante des groupements de surface associés aux nanosphères. Les particules chargées positivement présentant des groupements NH₂ ont induit la toxicité la plus forte, allant de malformations embryonnaires (-6% du taux de larves D normales à 0,1 µg.mL⁻¹) jusqu'à une « lyse » complète des embryons, probablement liée à des arrêts de développement précoces, entre 1 et 25 µg.mL⁻¹. Considérant l'importance de l'embryogénèse sur la durabilité d'une espèce, il m'est apparu important d'évaluer les conséquences d'une exposition embryonnaire à une dose non létale (0,1 µg.mL⁻¹) sur les aptitudes physiologiques de l'huître, de son stade larvaire jusqu'au stade adulte. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est le suivant :

EVALUER LES CONSEQUENCES D'UNE EXPOSTION EMBRYONNAIRE AUX 50-NH₂ A UNE DOSE NON LETHALE SUR LES PERFORMANCES LARVAIRES ET ADULTES A TRAVERS DEUX GENERATIONS D'HUÎTRES



Embryonic exposures to amino-nanopolystyrene beads affect larval performances over two generations of Pacific oyster

Kevin Tallec^{1*}, Ika Paul-Pont², Bruno Petton¹, Marianne Alunno-Bruscia¹, Charlotte Bourdon¹, Ilaria Bernardini³, Myrina Boulais², Christophe Lambert², Claudie Quéré¹, Antoine Bideau², Nelly Le Goïc², Anne-Laure Cassone², Fabienne Le Grand², Caroline Fabioux², Philippe Soudant², Arnaud Huvet^{1*}

¹Ifremer, Univ Brest, CNRS, IRD, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

²Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

³Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy

* kevintallec2@gmail.com; arnaud.huvet@ifremer.fr

ABSTRACT

Early life stages (ELS) of numerous marine invertebrates must cope with man-made contaminants during their pelagic phase, including plastic debris. Among the diversity of plastic particles, the nano-sized debris, namely nanoplastics, have the capacity to induce severe outcomes in ELS of various biological models, including the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Because ELS have crucial role in species sustainability, consequences of sub-lethal effects in ELS exposed to nanoplastics are a matter of concerns for performances of subsequent stages and generations. Here, we investigated effects of 50 nm polystyrene nanobeads (nano-PS) with amine functions in oyster embryos (24h exposure) at a sub-lethal dose (0.1 µg.mL⁻¹) and consequences in larval and adult performances over two generations of oysters. Lipid analyses revealed that first generation (G1) embryos exposed to nano-PS displayed an increase in the cardiolipin content (+9.7%) suggesting a perturbation of mitochondria functioning. Alterations of shell biomineralization in D-larvae issued from the

embryonic exposure were also demonstrated by scanning electron microscopy in addition to reduction of larval growth (-10%) and lipid accumulation (-20%). No consequences were observed at the adult stage in term of growth, ecophysiology (clearance and respiration rate, absorption efficiency) and reproductive outputs (gonadic development, gamete quality). However, second generation (G2) larvae displayed differential growth rates depending on the initial exposure conditions at G1. G2 larvae issued from control G1 displayed a significant growth reduction after G2 embryonic exposure to nano-PS (-21%) compared to control and larvae originated from embryos exposed at both generations which displayed intermediate growth rate not statistically different from the control. These results suggest that short embryonic exposures to nano-PS can have consequences in subsequent stages in oyster over several generations, highlighting the need to consider long-term effects of plastic debris for decision making and of further mechanistic exploration of this adaptive response-like mechanism supposed in G2 larvae.

Key-words: Oyster, Embryonic exposure, Nanoplastics, Larval performances, Offspring, Adaptive response.

1) INTRODUCTION

Since 1950, 6,300 million tons (Mt) of plastic waste were produced and a large part (~79%) was dropped in landfills or the environment (Geyer et al., 2017). It is estimated that 60-99 Mt were directly discarded into the environment in 2015 (Lebreton and Andrady, 2019). Plastics debris are pervasive and contaminate all ecosystems including terrestrial (*e.g.* de Souza Machado et al., 2018), freshwater (*e.g.* Eerkes-Medrano et al., 2015) and ultimately marine environments (*e.g.* Cole et al., 2011). Plastic debris are found anywhere in the Oceans (*e.g.* sea ice, sediment, deep-sea) and it is estimated that 93-236 Mt float at the Open Ocean's sea surface (Peeken et al., 2018; Van Cauwenberghe et al., 2015; van Sebille et al., 2015; Woodall et al., 2014).

Microplastics (MP; < 5 mm) represent the largest part of plastic waste in terms of number of plastic items (*e.g.* 92% of plastic items at the Open Ocean's sea surface; Eriksen et al., 2014). They include manufactured particles (*e.g.* scrubbers, exfoliates; primary MP) and particles derived from the fragmentation of larger debris in seawater (secondary MP) (Cole et al., 2011).

Owing to this fragmentation coupled with the lack of analytical methods for small MP (and below) quantification (Mintenig et al., 2018), further studies spotlighted an underestimation of MP level in oceans (Erni-Cassola et al., 2017; Peeken et al., 2018). Fragmentation processes could lead to the creation of nano-sized debris, namely the nanoplastics (NP), as demonstrated under laboratory conditions (Gigault et al., 2016; Lambert and Wagner, 2016) and recently argued with the presence of plastic particles <1 µm in the North Atlantic subtropical gyre (Ter Halle et al., 2017). To date, there is no clear size cutoff for definition of NP (<100 nm or <1 µm; Galloway et al., 2017; Gigault et al., 2018). Hartmann et al. (2019) proposed a compromise by defining NP as particles lower than 100 nm, and sub-MP for particles between 100 nm and 1 µm. Information about primary NP and sub-MP is still scarce but recent works suggested their presence in cosmetics (Hernandez et al., 2017) or waste of industrial processes (Stephens et al., 2013; Zhang et al., 2012).

Among research priorities regarding micro- and nanoplastics (MNP), the risk assessment is recognized as a major concern (Galloway et al., 2017). As a result of their size, they are bioavailable for most marine species and their ingestion can induce various damages as observed under laboratory exposures (Wright et al., 2013). Most effects were demonstrated at the individual level such as modifications of the feeding behavior (Cole et al., 2019), immune perturbations (Paul-Pont et al., 2016), inflammations of the digestive tract (Von Moos et al., 2012), dysbiosis (Jin et al., 2018), mitochondrial dysfunctions (Trevisan et al., 2019), decrease of the lifespan (Jeong et al., 2016). These physiological impairments can affect energy allocation leading to subsequent consequences as a decrease in the reproductive outputs (Cole et al., 2015; Sussarellu et al., 2016). Overall, first insights revealed that NP can induce a higher toxicity than MP due to nano-properties, *i.e.* the nano-size and the high surface-to-volume ratio enhance the reactivity and interactions with biological membranes and therefore the risk of damages and/or particle translocations into tissues/organs (Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Jeong et al., 2016; Paul-Pont et al., 2018).

Successful early life development is essential to maintain natural populations (Pechenik, 1999). Numerous marine invertebrates and fish use an external fertilization as sexual mode with a release of gametes followed by a free-larval development in seawater (Pechenik, 1999). Therefore, early life stages (ELS) must cope with stressors in seawater, notably in coastal areas that are heavily affected by human activities (Halpern et al., 2008). They are commonly used

as biological models in risk assessments notably to evaluate the toxicity of plastic debris. In this regard, MP seem to have low effects on survival, feeding, growth of ELS (Beiras et al., 2018; Cole and Galloway, 2015; Kaposi et al., 2014; Mazurais et al., 2015) while first reports indicated a higher sensitivity of ELS (notably embryos) to NP (Balbi et al., 2017; Della Torre et al., 2014; Rist et al., 2019; Tallec et al., 2018).

During early life development, embryogenesis is a key-step characterized by intense morphological, cellular and molecular changes making them highly sensitive to external disruptors (Fitzpatrick et al., 2008; Sokolova et al., 2012). Exposure of embryos to contaminants can induce effects (reduction in fertilization and embryo survival) over generations as observed in the medaka (*Oryzias latipes*) after exposure to bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol, that authors have attributed to altered epigenome in primordial germ cells (Bhandari et al., 2015). Indeed in most cases, embryos shelter the genetic information exchanged over successive generations by the presence of germline determinants differentiating quickly in primordial germ cells during first cleavages of embryogenesis (Leclère et al., 2012).

Early life stages of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) are commonly used as biological models (Boulais et al., 2018; Di Poi et al., 2014). Oyster is considered as a valuable species due to its economic importance and its key roles in coastal environments (*e.g.* bio-indicator, control of phytoplankton biomass, creation of micro-environments) (Grabowski et al., 2012). As demonstrated previously, oyster embryos were very sensitive to 50 nm nanopolystyrene beads, especially those with an amine functionalization (50-NH₂) with a half maximal effective concentration (EC₅₀) at 0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tallec et al., 2018). With the aim of testing consequences of sub-lethal effects induced by these particles on embryo-larval development up to potential imprinting to next generation, this study assessed effects of short term (24h) exposure to 50-NH₂ beads at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in oyster embryos over two generations (embryonic exposures were performed in both generations). Consequences on performances were sought at the larval (growth, development, settlement) and adult stages (growth, clearance and respiration rate, reproductive outputs) at the first generation and on larval performances at the second generation.

2) MATERIALS AND METHODS

2.1) Nanopolystyrene beads

Nanopolystyrene beads (nano-PS; 50 nm) with an amine functionalization (50-NH₂) were purchased from Bangs Laboratories (USA). This nano-PS did not display any fluorescent labelling. Polystyrene polymer chemistry was confirmed by Raman microspectroscopy (LabRAM HR800 Raman; Horiba Scientific; Japan) (Tallec et al., 2018). Particles were characterized in 1- μ m filtered and UV-treated seawater (FSW; 20°C, pH 8.1, PSU 34) by Dynamic Light Scattering (DLS; Zetasizer NanoZS; Malvern Instruments; UK) showing that the 50-NH₂ suspension formed at 0 and 24h small aggregates (97 ± 2 nm) in FSW with a positive surface charge (16 ± 3 mV) (already published in Tallec et al. (2018)). Stock suspension was kept at 4°C and diluted in ultrapure water at 1 mg.mL⁻¹ just before the final dilution in FSW for exposures.

2.2) Broodstock

The initial broodstock (18 months old mature oysters *C. gigas*; generation 0 – G0) was collected in a farming area located in the Bay of Brest (48°20'6''N, 4°19'6''W) before being transferred to Ifremer's experimental facilities (Argenton, France) in June 2018. They were acclimatized in a 350 L tank supplied with FSW (16.5°C) containing a balanced mixture of two microalgae *Tisochrysis lutea* (T-iso CCAP927/14, cell volume= 40 μ m³) and *Chaetoceros gracilis* (UTEX LB2658, cell volume= 80 μ m³) during one week.

2.3) Experimental design

The experimental design used to expose and rear oysters over two generations is summarized in the Figure 1. The first generation of oyster embryos (G1) was produced in June 2018 from the initial broodstock G0 as described in Tallec et al. (2018), *i.e.* gametes from 5 males and 5 females were collected by stripping and pooled in 1.8 L of FSW (21°C) with a spermatozoa-to-oocyte ratio of 100:1 and a final concentration of 1,000 oocytes.mL⁻¹. The concentration of gametes was estimated using an EasyCyte Plus cytometer (Guava Merck Millipore, USA). The fertilization yield (%; [(number of fertilized oocytes/number of oocytes) \times 100]) estimated after 1.5h of contact between gametes was $95 \pm 3\%$ (n= 12 beaker replicates). Thereafter, G1 embryos were placed in 5 L glass beakers (100 embryos.mL⁻¹; 21°C) and divided in two conditions (n= 12 beakers per condition; Step 1): G1 embryos without exposure corresponding

to the control condition (G1-C) and G1 embryos exposed to 50-NH₂ beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G1-E). The embryonic exposure lasted 24h, which corresponds to the time needed to reach the last embryonic stage, the D-larva. At the end of the exposure, all beakers were sieved at 40-µm to estimate the D-larval yield (%): (number of normal D-larvae / number of embryos) × 100 (Song et al., 2009). D-larvae with mantle and/or shell malformations were considered as abnormal and they have not been included in the D-larval yield. Lipid (see section 2.4) and scanning electron microscopy (see section 2.5) samplings were performed at this step. The rest of D-larvae was rinsed with FSW to remove the nano-PS and 100,000 individuals per replicate were transferred to the larval rearing system to perform a complete pelagic phase until settlement (≈ 16 days post fertilization – dpf) in order to evaluate mid-term consequences (larval performances) of the embryonic exposure (see section 2.6; Step 2).

Long-term consequences (adult performances then larval performances of next generation) of the embryonic exposure were also investigated. Once larvae settled, 2,000 G1 oyster seeds per condition (G1-C and G1-E; 50 days old) were transferred to the Ifremer's nursery (Bouin, France) in August 2018 where they were reared in onshore facilities with UV-treated and filtered seawater and microalgae *ad libitum*. Oyster growth was regularly monitored over this period (see section 2.7). In April 2019, 632 adult oysters per condition (G1-C and G1-E; 10 months old) were repatriated to the Ifremer's experimental facilities in Argenton and placed in 4 tanks of 350 L in common garden scheme (158 oysters per condition per tank) in order to avoid any bias due to putative difference among the 4 tanks and their positions in the experimental room. G1 adult oysters were maintained during 10 weeks at 17°C and fed continuously on a mixed diet of *T. lutea*/*C. neogracile* (50/50, v/v) at a mean concentration of 2,000 µm³.µL⁻¹ to ensure a complete gametogenesis (conditioning period). Oyster growth and ecophysiology (clearance and respiration rate, absorption efficiency) were monitored throughout the conditioning (see section 2.8; Step 3).

Once the G1 oysters were reproductively mature after 10 weeks of conditioning, the sex ratio and quality of germ cells were compared between conditions (G1-C and G1-E; see section 2.9). The second generation of embryos (G2) was produced by pooling oyster gametes within each condition following the same protocol described above (Step 4). A total of 4 conditions were achieved for the G2 embryonic development (n= 4 beaker replicates per condition): (i) G2 embryos from G1-C adults without G2 embryonic exposure (G2-C-C), (ii) G2 embryos from G1-

C adults with G2 embryonic exposure to 50-NH₂ beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G2-C-E), (iii) G2 embryos from G1-E adults without G2 embryonic exposure (G2-E-C), (iv) G2 embryos from G1-E adults with G2 embryonic exposure to 50-NH₂ beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G2-E-E). Similarly to G1, the embryonic development was stopped after 24h, the D-larval yield was estimated and 100,000 rinsed-larvae per replicate were placed in the larval rearing system to complete the pelagic phase.

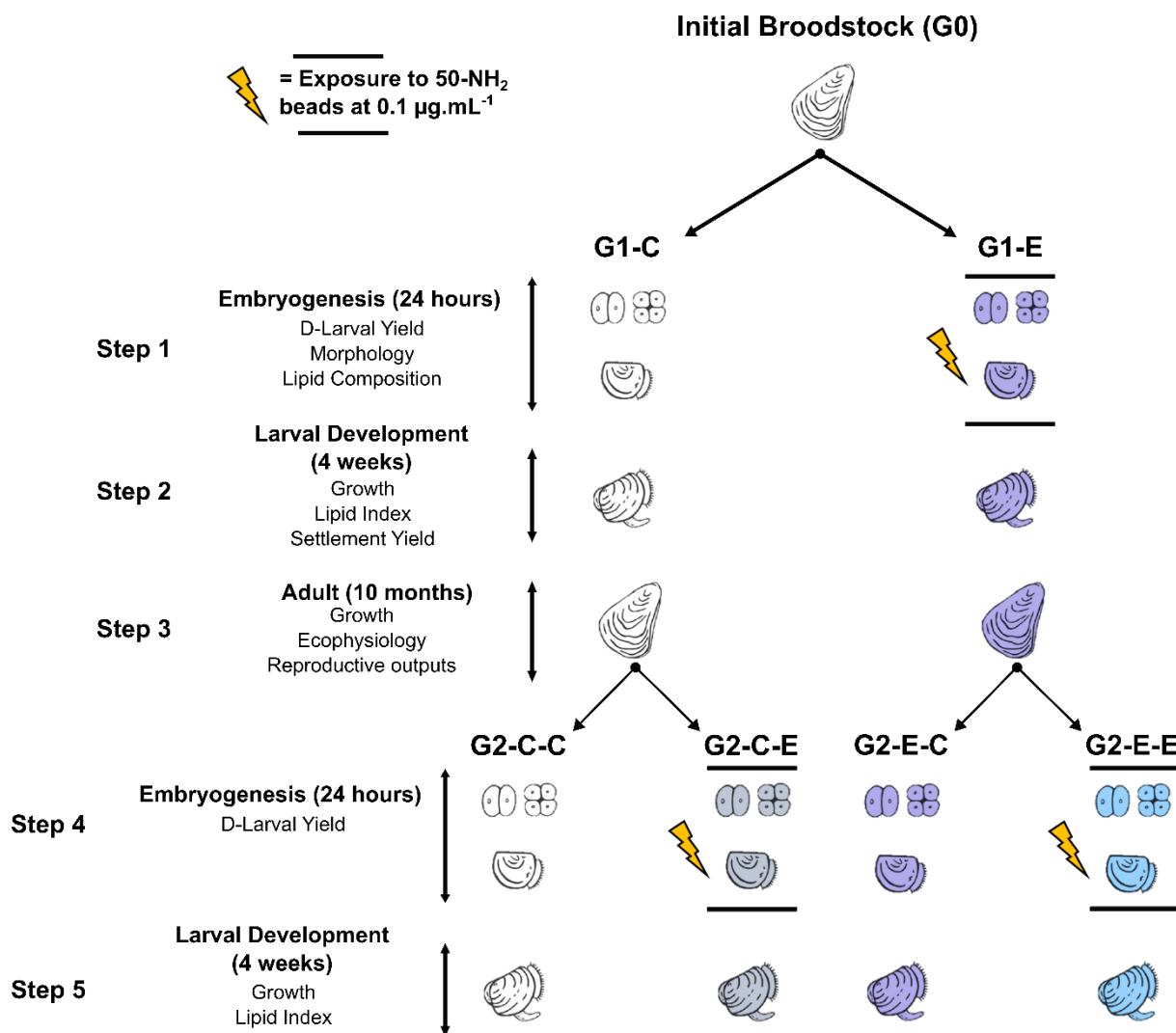


Figure 1. Experimental design of the embryonic exposures over two generations of oysters. Lightning bolts indicate the 24h embryonic exposures to 50 nm amino-nanopolystyrene beads (50-NH₂) at 0.1 µg.mL⁻¹. Performances analysed at each step are listed on the left hand side of the figure. Illustrations of the oyster life cycle were adapted from Vogeler et al. (2016).

2.4) Lipid compositions (G1 – Step 1)

At the end of the G1 embryonic development and nano-PS exposure, 200,000 D-larvae per replicate were collected on GF/F glass-fiber filters (0.2 µm; Whatman®; beforehand burnt at

450°C during 6h) and their lipid contents were extracted in 6 mL chloroform: methanol (2:1 v/v) then stored at -20°C (Da Costa et al., 2016). Lipid class compositions were determined by high-performance thin layer chromatography (HPTLC) using glass plates coated with silica (200×100 mm; Merck®60, Germany) (Da Costa et al., 2016). To separate neutral lipids (NL) and polar lipids (PL), plate preparations were conducted using different mixtures: (i) hexane: diethyl ether (97:3; v/v) for NL; (ii) methyl acetate: isopropanol: chloroform: methanol: KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6; v/v) for PL. Thereafter, lipid extracts were spotted on these plates using an automatic TLC sampler ATS4 (CAMAG®; Switzerland). Separation of NL was performed using two successive mixtures: (1) hexane: diethyl ether: acetic acid (20:5:0.5; v/v); (2) hexane: diethyl ether (97:3; v/v). Separation of PL was achieved with a mixture of methyl acetate: isopropanol: chloroform: methanol: KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6; v/v). Plates were revealed using a 3% CuSO₄ and 8% H₃PO₄ (w/v in distilled water) solution then analysed with a scanner densitometer at 370 nm (TLC Scanner 4 CAMAG®; Switzerland). Results were analyzed using the WinCATS software (v2.4; CAMAG®; Switzerland) (Moutel et al., 2016). Lipid classes were expressed as the mass percentage of each class to the total lipid content (ng.D-larva⁻¹). Analyses of NL and PL allowed identification of: (i) 3 classes of storage lipids: triglycerides (TG), sterol esters (StE) and glyceryl ethers (GE); (ii) 1 class used as a proxy of lipid degradation: free fatty acids (FFA); (iii) 7 classes of membrane lipids: phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) + ceramide amino-ethylphosphonate (CAEP), phosphatidylserine (PSer), cardiolipin (CL), phosphatidylcholine (PC) and sterols (ST).

Regarding the fatty acid (FA) composition, 1 mL of lipid extract was evaporated under N_{2(g)} and recovered by three chloroform: methanol (98:2, v/v) washings (0.5 mL) then deposited at the top of a micro-column (40×5 mm) to separate the polar and neutral fractions as described in Le Grand et al. (2014). Samples were successively evaporated under N_{2(g)} and transesterified in 800 µL of MeOH-H₂SO₄ (3.4% v/v) for 10 min at 100 °C to obtain fatty acid methyl esters (FAME). FAME were analysed using a Varian CP8400 gas chromatograph (HP, USA) according to Le Grand et al. (2014). FAs were expressed as the mass percentage of each FA to the total FA content per fraction (neutral or polar).

2.5) Scanning electron microscopy (G1 – Step 1)

Aliquots of G1-C and G1-E D-larvae were fixed for 1h in a mixture of glutaraldehyde 6%: NaCl 7%: cacodylate 0.4 M (2:1:1; v/v) then rinsed in a mixture of cacodylate 0.4 M: NaCl 8%:

ultrapure water (1: 1: 2; v/v; 3 baths, 15 min). Thereafter, samples were dehydrated in successive solutions: (1) ethanol 50% (2 baths, 10 min); (2) ethanol 70% (2 baths, 10 min); (3) ethanol 90% (2 baths, 10 min); (4) absolute ethanol (3 baths, 15 min); (5) absolute ethanol: hexamethyldisilazan (HMDS) (3:1, v/v; 15 min); (6) absolute ethanol: HMDS (1:1, v/v; 15 min); (7) absolute ethanol: HMDS (1:3, v/v; 15 min); (8) pure HMDS (2 baths, 15 min) according to Foulon et al. (2016). Lastly, samples were coated with gold palladium before scanning electron microscopy (SEM) observations (Hitachi S-3200N, Japan) performed on a dozen of larvae per condition. G2 D-larvae have unfortunately not been analyzed due to a failed fixation of larvae.

2.6) Larval rearing and settlement (G1 – Step 2 and G2 – Step 5)

G1 and G2 larvae were reared in 5 L cylinders at a density of 20 larvae.mL⁻¹ using a flow-through rearing system at 25°C (Rico-Villa et al., 2008). Cylinder replicates (12 per condition for G1 and 4 per condition for G2) were randomly disposed in the system. Larvae were continuously supplied with FSW containing the mixed diet *T. lutea*/*C. neogracile* (50/50, v/v) at a mean concentration 1,500 µm³.µL⁻¹. Aliquots of 20 to 30 larvae were sampled every 2-3 days in each cylinder and fixed in a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to evaluate the larval growth by image analysis using the ImageJ software. For G1, when more than 50% of larvae reached the metamorphosis competent stage (*i.e.* eyed-larvae stage) in each replicate per condition, the condition was sieved on 80-µm mesh and 20,000 larvae were transferred to 30 L tank at 25°C to settle on clutch using a downwelling system (n=4-6 clutches for G1 and n= 2 for G2 per condition) as described in Petton et al. (2013). All the G2 batches were settled in the same time when the first batch displayed more than 50% of larvae reached the metamorphosis competent stage. Therefore settlement results are not comparable between generations. An aliquot of competent eyed-larvae (n= 10 larvae per replicate) was sampled and stained with a FSW-Nile Red (0.00125 mg.mL⁻¹) solution for 1.5h before fixation in a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) to evaluate the lipid index (arbitrary units, U.A), *i.e.* the relative amount of storage lipids, using a Zeiss AxioObserver Z1 (Germany). The lipid index for one larva was defined as: fluorescent area/total area (Talmage and Gobler, 2010). Image analysis were performed using the ImageJ software. In the settlement system, larvae were fed continuously with the same diet used for the larval rearing. After 14 days, all tanks were sieved on 400-µm mesh to evaluate the settlement yield (%) defined as: (number of settled larvae/number of total larvae) × 100. The G1 settled larvae were again disposed in

the downwelling system before being transferred to the Ifremer's nursery (Bouin, France) for the growth period (August 2018 – March 2019).

2.7) Adult growth monitoring (G1 – Step 3)

The G1 adult growth was monitored in the Ifremer's nursery by sampling 30 oysters per condition in November 2018, January, February and March 2019. Collected oysters were stored at -20°C until measurements of the dry flesh mass used as a proxy of the oyster growth (Savina and Pouvreau, 2004). Similarly, 20 oysters per condition per tank were sampled for growth measurements at 3, 5, 7 and 10 weeks after the beginning of the conditioning in Argenton (April – June 2019).

2.8) Ecophysiological measurements (G1 – Step 3)

An ecophysiological measurement system was used to determine the individual clearance (CR; L.h⁻¹.ind⁻¹) and respiration (RR; mg O₂.h⁻¹.ind⁻¹) rate of G1 adult oysters (G1-C and G1-E). This system consists of 9 flow-through individual chambers (0.54 L) that are supplied with seawater pumped into the conditioning tank at a constant flow rate of 30 mL.min⁻¹. These chambers are managed by a programmable controller that enables high-frequency automatic recordings of fluorescence (food supply), oxygen concentrations, and water flow in the seawater outflow (Pousse et al., 2018). We used a WTW multiparameter meter (WTW Multi 3430), a WETstar chlorophyll fluorimeter (WETLABS; USA) and an ultrasonic flow rate meter SONOFLOW CO.55 (Sonotec; Germany). For each set of measurements (also called trials), all the biological and physico-chemical parameters mentioned above were recorded each 3.5h over 4 days on 4 oysters per condition, each placed in a separate individual chamber. This part was replicated 4 times, therefore data from 16 oysters per condition were obtained at the end of the adult experiment. For each trial, one chamber was empty, corresponding to the control chamber (CC). The clearance rate is estimated as: $CR = (fl \times (C_{CC} - C_N) / C_{CC})$ where fl is the flow rate through the chamber (L.h⁻¹), C_{CC} is the concentration of microalgae in the control chamber and C_N is the concentration of microalgae in the chamber with one oyster (Bayne et al., 1987). The respiration rate is defined as: $RR = fl \times (O_{CC} - O_N)$ where fl is the flow rate through the chamber (L.h⁻¹), O_{CC} and O_N are the concentrations of O₂ (mg O₂.L⁻¹) in the control chamber and in the chamber with one oyster, respectively (Savina and Pouvreau, 2004). At the end of each trial, all oysters were sacrificed and stored at -20°C to quantify the dry flesh mass in order to

calculate mass standardized clearance and respiration rates for an equivalent individual of 1 g dry tissue (dw std) (Bayne et al., 1987). In addition, feces were collected twice a week in each chamber to calculate the absorption efficiency (AE, %) of organic matter from microalgae ingested using the Conover's method: $AE = (f - e) / ((1 - e) \times f)$ where f corresponds to the organic fraction of the diet and e is the organic fraction of the feces (Conover, 1966).

2.9) Reproductive measurements (G1 – Step 3)

The gonadic development and sex ratio were assessed by sampling 20 oysters per conditions every 2 weeks during the conditioning for histology analyses. A 3 mm cross-section of the visceral mass was cut and fixed in modified Davidson's solution at 4°C for 48h. Thereafter, samples were dehydrated in ascending ethanol solutions, embedded in wax paraffin and stained with Harris' hematoxyline-eosin (as described in Fabioux et al., 2005). Sections were observed under a microscope (Leica DMIRB; Germany). Gametogenic stages were determined according to Steele and Mulcahy (1999).

Once the G1 oysters were reproductively mature, 4 pools of spermatozoa and oocytes each issued from 5 males and 5 females, respectively (total number = 40 oysters per condition), were used to examine the gamete quality and fertilization efficiency. Sperm behavior (percentage of motile spermatozoa and Velocity of the Average Path (VAP; $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$) were analysed using a CASA (computer-assisted sperm analyzer) plug-in for Image J software according to Boulais et al. (2018); a minimum of 100 spermatozoa per replicate were analyzed. Briefly, 100 μL of the spermatozoa solution (1×10^8 spermatozoa. mL^{-1}) of each replicate were diluted in 300 μL of FSW containing pluronic acid ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) then placed in FastRead cells (Fischer Scientific®, USA) to acquire videos (Camera Qicam Fast 1394, 60 frames. sec^{-1} , 6 sec.treatment⁻¹) under microscope (Olympus BX51, Japan; $\times 20$ magnification with phase contrast). Regarding oocytes, aliquots were fixed in a formaldehyde-seawater solution (0.1% final) and oocyte pictures were taken under microscope (Olympus BX51, Japan; $\times 10$ magnification). Oocyte diameter (μm) was assessed using the ImageJ software (30 oocytes per replicate were measured) as done in Sussarellu et al. (2016). Gametes from the same condition were mixed using the method described in the section 2.3 (spermatozoa-to-oocyte ratio of 100:1 and 1,000 oocytes. mL^{-1} ; final volume: 1.8 L; n= 4 replicates per condition) to estimate the fertilization yield (used as a proxy of the reproduction capacity) after 1.5h of contact.

2.10) Statistical analyses

All statistical analyses and graphical representations were conducted using the R software (R Core Team, 2016). Normality and variance homogeneity were verified using the Shapiro-Wilk and Levene's method, respectively. To compare the fertilization yield, the D-larval yield, the lipid index, the settlement yield, the absorption efficiency and the gamete quality, the Student's method or one-way ANOVA were performed according to the number of conditions. Percentages were analyzed after angular transformations. Repeated measures ANOVA were conducted on growth (adults and larvae) and ecophysiological measurements with pairwise comparisons using the Tukey's method when necessary. Comparisons between lipid classes were made using the Student's method while comparisons between fatty acid compositions were screened using one-way analyses of similarities (ANOSIM) and a Bray-Curtis similarity matrix to separate cluster (R=1: perfect separation; R=0.5: satisfactory separation, R=0: low separation cluster). Fischer tests were used to compare sex ratio and gonadic development between conditions. Data are expressed as the mean \pm standard error (SE) and significant differences were considered when p-values < 0.05.

3) RESULTS

3.1) Effects of the embryonic exposure to amino-nanopolystyrene beads (50 nm) on the first oyster generation (G1)

3.1.1) D-larval development (Step 1)

At the end of the embryonic development (24 hours post fertilization – hpf), the D-larval yields were similar in the control (G1-C; 73.9 \pm 1.8%) and exposed conditions (G1-E; 74.3 \pm 2.3%). Scanning electron microscopy (SEM) observations suggested morphological differences between conditions (Figure 2). The G1-E D-larvae presented shell biomineralization abnormalities with the presence of holes and/or surface asperities in 72% of cases while these abnormalities were observed in 25% of G1-C D-larvae (Figure 2).

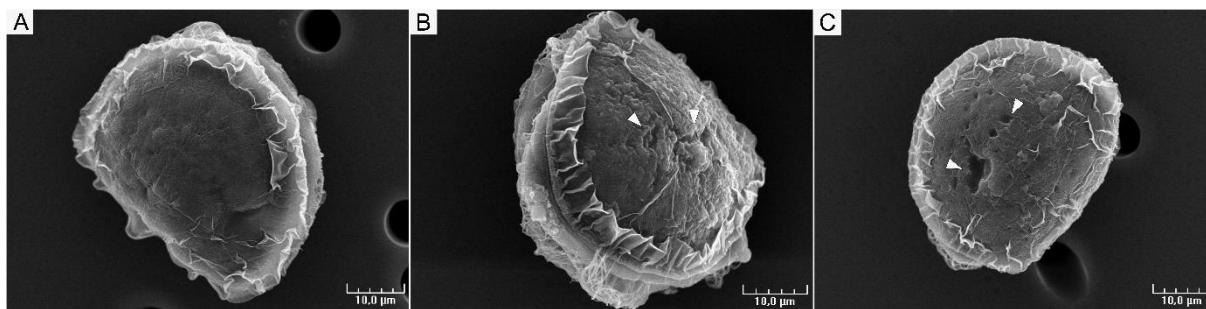


Figure 2. Scanning electron microscopy panel of G1 D-larvae (24 hpf) issued from (A) control embryos (G1-C) or (B and C) embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (G1-E). White arrows indicate asperities and holes at the surface of the D-larvae. Size in μm is represented by the scale bar.

3.1.2) Lipid compositions in D-larvae (Step 1)

Lipid classes. D-larvae presented a similar total mass of lipids between conditions (G1-C: $9.22 \pm 0.14 \text{ ng.D-larva}^{-1}$; G1-E: $9.45 \pm 0.27 \text{ ng.D-larva}^{-1}$; $p\text{-value} > 0.05$) and no significant differences were observed in the percentage of storage and membrane lipids in G1-E D-larvae ($55.32 \pm 0.73\%$ and $44.68 \pm 0.73\%$, respectively) in comparison to G1-C D-larvae ($55.35 \pm 0.54\%$ and $44.65 \pm 0.54\%$, respectively). In terms of lipid class composition, only the percentage of cardiolipin (CL) displayed a statistical difference between conditions, increasing by 9.7% ($p\text{-value} < 0.01$) in G1-E D-larvae compared to G1-C D-larvae (Table 1).

Fatty acids (FA) composition. The FA composition of the G1-E D-larvae was similar to that of G1-C D-larvae according to the one-way ANOSIM ($R = 0.109$ and $R = -0.031$ for polar and neutral fractions, respectively; $p\text{-values} > 0.05$; Supplementary Tables 1 and 2).

Table 1. Lipid class composition of G1 D-larvae (24 hpf) originated from control embryos (G1-C) and embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G1-E). Lipid classes were expressed as the mass percentage of each class to the total lipid content (n= 12; mean ± SE). Comparisons were made using the Student's method; **: p < 0.01.

	Conditions	
	G1-C	G1-E
% TG	50.89 ± 0.59	50.35 ± 0.71
% FFA	0.64 ± 0.08	0.85 ± 0.09
% GE	1.07 ± 0.03	1.09 ± 0.04
% StE	2.75 ± 0.09	3.03 ± 0.15
% Σ Storage lipids	55.35 ± 0.54	55.32 ± 0.73
% ST	3.33 ± 0.12	3.19 ± 0.11
%PC	17.70 ± 0.25	17.38 ± 0.45
% PE	10.17 ± 0.18	10.39 ± 0.20
% PI+CAEP	8.37 ± 0.11	8.19 ± 0.11
% PSer	1.74 ± 0.06	1.67 ± 0.10
% CL	2.51 ± 0.04	2.75 ± 0.05**
% Σ Membrane lipids	44.65 ± 0.54	44.68 ± 0.73
Total lipid content (ng.D-larva ⁻¹)	9.22 ± 0.14	9.45 ± 0.27

TG: triglycerides; StE: sterol esters; GE: glyceryl ethers; FFA: free fatty acids; PE: phosphatidylethanolamine, PI: phosphatidylinositol, PSer: phosphatidylserine, CL: cardiolipin; CAEP: ceramide amino-ethylphosphonate, PC: phosphatidylcholine; ST: sterols

3.1.3) Larval performances: growth, lipid index and settlement yield (Step 2)

G1 larvae from the G1-E condition displayed a significantly lower growth rate (GR) than larvae issued from control embryonic development (G1-C; p-value < 0.01; Figure 3A). The GR decreased by 9.1 % in G1-E larvae (18.0 ± 0.5 µm.day⁻¹) compared to G1-C larvae (19.8 ± 0.4 µm.day⁻¹). Consequently, the G1-E larvae displayed a delay of 1 day to reach the competent larval stage as demonstrated by the percentages of eyed-larvae (ready to settle) at 16 dpf: 55.5 ± 3.3% for G1-C and 24.8 ± 2.6% for G1-E larvae. The lipid index (U.A.) differed significantly between conditions with a mean reduction of 19.6% in G1-E larvae compared to G1-C larvae (p-value < 0.01; Figure 3B). The settlement yield (%) was statistically similar between G1-C (73.8 ± 7.2%) and G1-E (86.7 ± 4.1%) conditions (p-value > 0.05; Figure 3C).

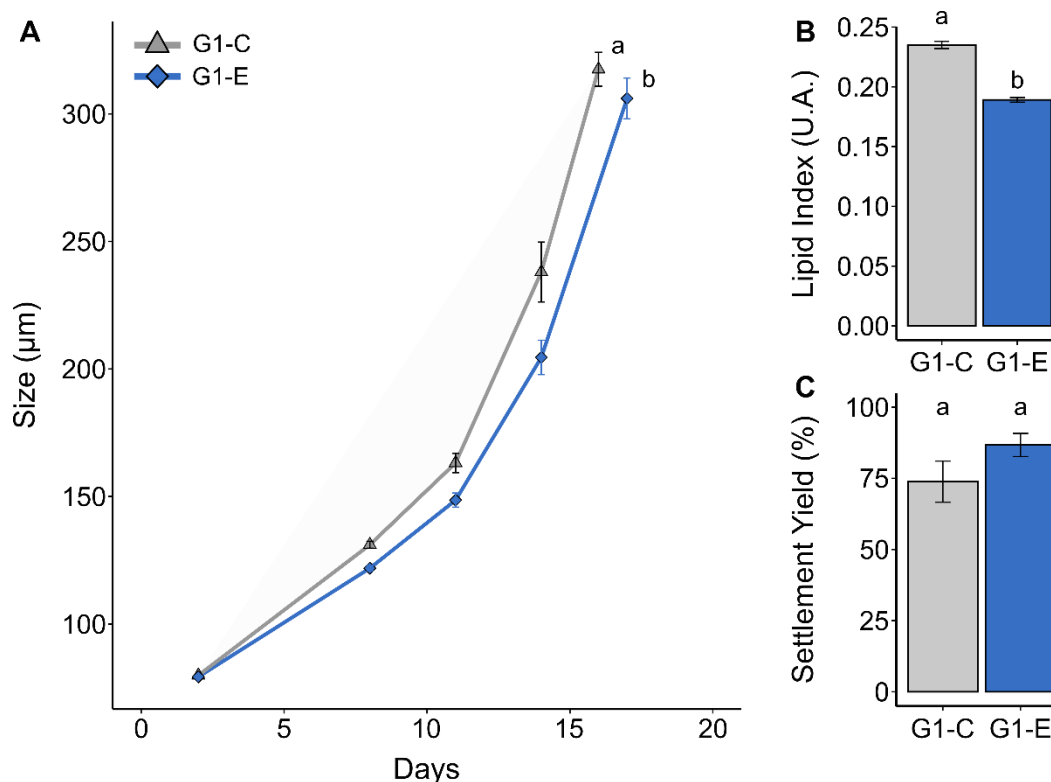


Figure 3. Size (μm ; A), lipid index (U.A; B) and settlement yield (%; C) of G1 larvae issued from control embryos (G1-C; grey) and embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (G1-E; blue). Results are expressed as mean \pm SE ($n=12$). Repeated measures ANOVA were conducted to compare conditions for the size while the Student's method was used for the lipid index and the settlement yield at the 5% level; homogeneous groups are indicated by the same letter.

3.1.4) Adult growth and ecophysiological performances (Step 3)

Growth. The monitoring of G1 juvenile and adult growth revealed no statistical differences whether they originate from control or exposed embryos ($p\text{-value} > 0.05$; Figure 4). Focusing on data collected in the nursery (November 2018 – March 2019), the dry weight increased 3-fold for G1-C (T_{November} : $0.06 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$; T_{March} : $0.16 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$) and G1-E oysters (T_{November} : $0.05 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$; T_{March} : $0.17 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$). Similarly during the adult experiment (*i.e.* conditioning), the dry weight was $0.15 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$ for G1-C and G1-E oysters at T_0 (April 2019) and increased up to 0.48 ± 0.03 and $0.53 \pm 0.04 \text{ g}\cdot\text{oyster}^{-1}$ for G1-C and G1-E oysters, respectively, at T_f (June 2019), corresponding to a 3-fold increase in both conditions.

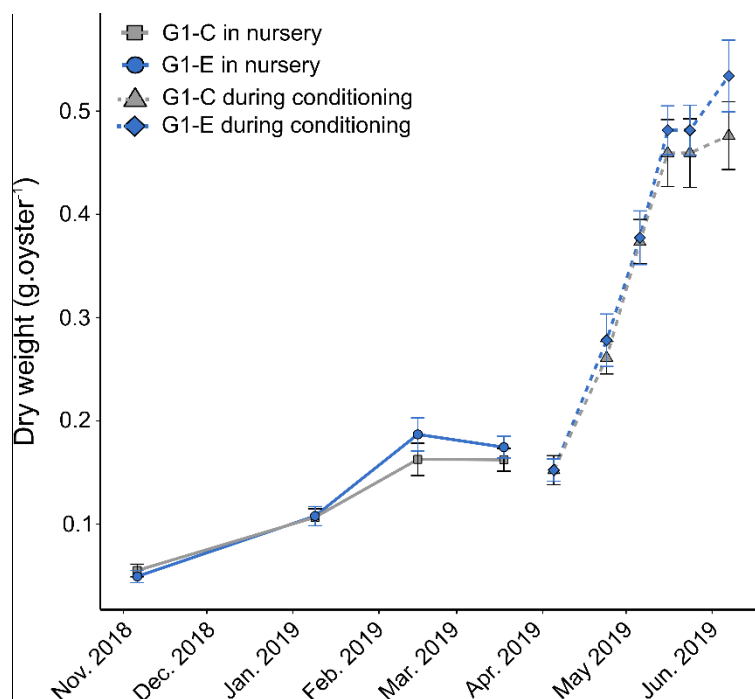


Figure 4. Dry weight (g.oyster⁻¹) of G1-C (grey; originated from control embryos) and G1-E oysters (blue; originated from embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹) during the nursery phase (solid lines; November 2018 – March 2019) and the G1 adult experiment (dashed lines; April 2019 – June 2019). Results are expressed as mean ± SE (n= 30 oysters per sampling point in the nursery monitoring (in common tank) and 4 replicates (corresponding to 4 tanks) of 20 oysters per sampling point during the adult experiment). Repeated measures ANOVA were conducted to compare conditions at the 5% level.

Ecophysiological parameters. No significant differences (p-values > 0.05) in the clearance rate (CR; L.h⁻¹.g⁻¹ dw std), respiration rate (RR; mg O₂.h⁻¹.g⁻¹ dw std) and absorption efficiency (AE; %) were observed between adults of both conditions throughout the experiment (Figure 5; Supplementary Figure 1). G1-C oysters had a mean CR of 4.55 ± 0.40 L.h⁻¹.g⁻¹, a mean RR of 0.36 ± 0.04 L.h⁻¹.g⁻¹ and a mean AE of 57.0 ± 4.7 % while G1-E oysters had a mean CR of 4.62 ± 0.50 L.h⁻¹.g⁻¹, a mean RR of 0.37 ± 0.04 L.h⁻¹.g⁻¹ and a mean AE of 53.0 ± 6.8 %.

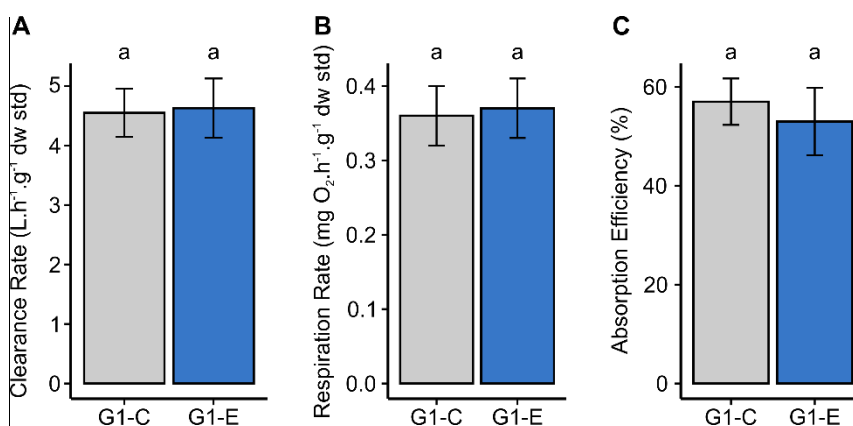


Figure 5. Clearance rate (A; L.h⁻¹.g⁻¹ dw std), respiration rate (B; mg O₂.h⁻¹.g⁻¹ dw std) and absorption efficiency (%) of G1-C (grey; originated from control embryos) and G1-E adult oysters (blue; originated from embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹). Results are expressed as mean ± SE (n= 16 oysters per condition). Detailed data of the clearance and respiration rates are in the Supplementary Figure 1. Repeated measures ANOVA were conducted to compare conditions for the clearance and respiration rates while the Student's method was used for the absorption efficiency at the 5% level; homogeneous groups are indicated by the same letter.

3.1.5) Reproductive outputs (Step 3)

Overall, adult oysters issued from the two conditions showed similar sex ratio and distribution of gonadic stages (p-values > 0.05), resulting in 85% and 95% of ripe oysters after 10 weeks of conditioning for G1-C and G1-E conditions, respectively (Table 2; Supplementary Figure 2).

Regarding the gamete quality, the percentage of motile spermatozoa (%) was similar (p-value > 0.05) between G1-C (41.8 ± 1.6%) and G1-E oysters (43.6 ± 3.0%) as well as the mean velocity (VAP; µm.sec⁻¹) estimated at 72.1 ± 1.1 µm.sec⁻¹ and 79.8 ± 4.4 µm.sec⁻¹, respectively. Similarly, the oocyte diameter (µm) was identical (p-value > 0.05) in G1-C (30.5 ± 0.2 µm) and G1-E oysters (30.7 ± 0.4 µm). Lastly, the reproductive capacity was not affected as demonstrated by a high and similar fertilization yield (%) of 90.5 ± 1.2% for G1-C oysters and 87.3 ± 2.3% for G1-E oysters.

Table 2. Distribution of sex and gametogenic stages of G1-C (originated from control embryos) and G1-E oysters (originated from embryos exposed to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹) after 10 weeks of conditioning. Results are expressed as percentages (n= 20 oysters per condition). According to Steele and Mulcahy (1999), gametogenic stages correspond to: (1) developing early active; (2) developing late active; (3) ripe.

Condition	N	Sex (%)			Gametogenic stage (%)		
		Female	Male	Hermaphrodite	1	2	3
G1-C	20	55	40	5	0	15	85
G1-E	20	50	50	0	0	5	95

3.2) Effects of the embryonic exposure to amino-nanopolystyrene beads (50 nm) on the second oyster generation (G2)

3.2.1) D-larval development (Step 4)

Overall, no significant differences were observed in the D-larval yield among the 4 conditions (p-value > 0.05) with mean values of 67.1 ± 4.8% and 60.4 ± 3.5% for G2-C-C and G2-E-C, respectively, and 64.4 ± 5.1% and 59.5 ± 8.1% for G2-C-E and G2-E-E, respectively.

3.2.2) Larval performances: growth, lipid index and settlement yield (Step 5)

The G2 larval growth fell into two statistical groups (p-value < 0.05; Figure 6A). G2-C-C and G2-E-C larvae had a similar growth rate (p-value > 0.05) with mean values of 17.9 ± 0.4 µm.day⁻¹ and 17.3 ± 0.5 µm.day⁻¹, respectively. G2-C-E larvae (13.9 ± 0.9 µm.day⁻¹) displayed a significantly slower growth (-21%) than G2-C-C and G2-E-C larvae (p-value < 0.05) while G2-E-E larvae appeared intermediate and non-significantly different from these two groups with a mean growth rate of 15.5 ± 1.3 µm.day⁻¹. At the end of the larval rearing (17 dpf), a delay to reach the competent larval stage was suggested with a lower percentage of eyed-larvae in the G2-C-E condition (20.0 ± 8.2%) in comparison to G2-C-C (49.0 ± 4.5 %), G2-E-C (43.7 ± 12.0%) and G2-E-E (32.8 ± 10.9%) larvae. Conversely to G1 larvae, no significant differences (p-value > 0.05) in the lipid index (U.A) were observed among G2 larvae conditions with mean values of 0.24 ± 0.01, 0.22 ± 0.01, 0.22 ± 0.03, 0.20 ± 0.02 for G2-C-C, G2-E-C, G2-E-E and G2-C-E larvae, respectively (Figure 6B). The settlement yield appeared similar (no statistical test owing to only 2 replicates per condition; Figure 6C) between G2-C-C (49.6 ± 4.8%), G2-C-E (56.6 ± 4.7%), G2-E-C (59.0 ± 4.4%), G2-E-E (62.6 ± 2.6%).

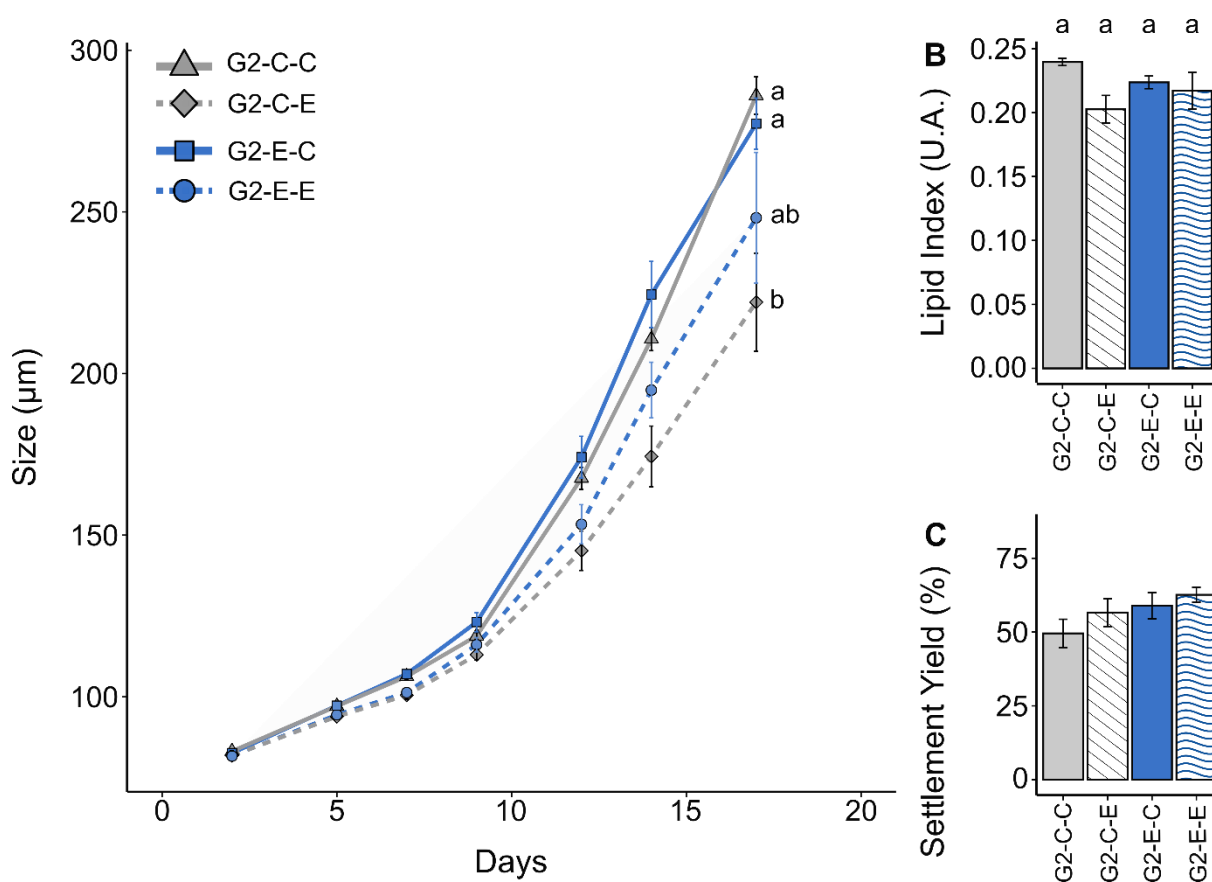


Figure 6. Size (µm; A), lipid index (U.A; B) and settlement yield (%; C) of G2 larvae issued from (1) G1 and G2 control embryos (G2-C-C; grey), (2) G1 control embryos and G2 embryos exposed to 50-NH₂ at 0.1 µg.mL⁻¹ (G2-C-E; dashed grey), (3) G1 embryos exposed to 50-NH₂ at 0.1 µg.mL⁻¹ and G2 control embryos (G2-E-C; blue), (4) G1 and G2 embryos exposed to 50-NH₂ at 0.1 µg.mL⁻¹ (G2-E-E; dashed blue). Results are expressed as mean ± SE (n= 4; n= 2 for the settlement yield). Repeated measures ANOVA were conducted to compare conditions for the size while one-way Anova was used for the lipid index at the 5% level; homogeneous groups are indicated by the same letter.

4) DISCUSSION

Mitochondrial functioning and shell mineralization appeared modified in oyster embryos exposed to nano-PS

Embryogenesis is a sensitive step in the life cycle of marine invertebrates. The reason is linked to the balance between embryogenic trajectories governed by a molecular/cellular programming and the surrounding conditions with external pressures, notably stressors, for which embryos could exhibit developmental plasticity (Hamdoun and Epel, 2007). Energy metabolism, *e.g.* glucose metabolism and lipid catabolism, is crucial for the respect of development (*e.g.* Jaekle and Manahan, 1989; Rafalsky et al., 2012). Here, cardiolipin (CL) appeared modified with an increase of its level in D-larvae originated from exposed embryos

(+9.7%) suggesting modifications of mitochondrial functioning. Indeed, CL is a key and unique phospholipid almost exclusively localized in inner membrane of mitochondria, the primary supplier of ATP corresponding to the energy used by organisms to achieve basal maintenance, growth, development and storage (Houtkooper and Vaz, 2008; Sokolova et al., 2012). Specifically, CL has a major role in the oxidative phosphorylation allowing the formation of ATP from ADP as CL binds to oxidative phosphorylation complexes in order to ensure their stability and ATP production (Houtkooper and Vaz, 2008; Paradies et al., 2014). For instance, decreases in activity of three of the four oxidative phosphorylation complexes (I, II and IV) led to a decrease in the electron flux into rats membrane supplemented by CL in comparison to control membrane (Shaikh et al., 2014). Therefore, the observed increase in the CL level suggests a potential modification in the respiratory chain in oyster embryos exposed to 50-NH₂ beads. This may have expected consequences on ATP production as previously demonstrated with a 49-65% decrease in ATP production in zebrafish embryos exposed to 50 nm nano-PS beads (10 µg.mL⁻¹; Trevisan et al., 2019). Such impairment may alter the overall embryos energy balance at the expense of key maintenance and developmental processes. Although obvious malformations or developmental arrests were not observed by optical microscopy, indicating no strong acute toxicity, SEM revealed holes and asperities on the shell of D-larvae in response to embryonic exposure to 50-NH₂ beads, suggesting incomplete shell biomineralization. In natural environment, incomplete shell biomineralization can have consequences for bivalve embryos (*e.g.* survival) due to the protective role of the shell against physical damages, pathogens, predators or pollutants (Arivalagan et al., 2017). Disruption of the calcium carbonate production and deposition was already supposed in mussel embryos after 50-NH₂ exposures (0.15 µg.mL⁻¹), based on transcriptomic profile (Balbi et al., 2017). These fine observations of biomineralization modifications could be the premises of the high embryotoxicity observed in oyster embryos exposed to 50-NH₂ beads at higher doses 1-25 µg.mL⁻¹ (Tallec et al., 2018). For now, origins of this effect cannot be addressed but we hypothesize two main explanations which can be intertwined. In one hand, shell defects could be linked to the potential disruption of the ATP production discussed above. Indeed, shell biomineralization is energetically expensive for marine invertebrates (Sokolova et al., 2012). Therefore, disturbance in the energy production in exposed embryos could indirectly affect the shell biomineralization processes notably because energy allocation to maintenance is

prioritized for the protection to stressors (Sokolova et al., 2012). On the other hand, modifications of the shell mineralization could be linked to a direct toxicity of 50-NH₂ beads on oyster embryos due to physical interactions with embryos membranes, leading to a perturbation of mineralization processes through molecular changes. Indeed, nanoparticles can interact with membrane components (*e.g.* protein receptors, ions channels) affecting intracellular machinery (*e.g.* induction of oxidative stress, DNA fragmentation, apoptosis) (Della Torre et al., 2014; Frölich, 2013). Even though interactions between 50-NH₂ beads were not sufficiently strong to affect membrane integrity (as suggested by similar membrane composition and fluidity in D-larvae originated from control and exposed embryos), we cannot exclude that higher concentrations can lead to membrane disruptions as suggested by drastic developmental arrests observed in oyster embryos exposed to higher doses of 50-NH₂ beads (Tallec et al., 2018). For instance, a loss of membrane integrity was also highlighted in cyanobacteria exposed to 50-NH₂ beads at 2.5 and 4 µg.mL⁻¹ (Feng et al., 2019). Further investigations performing transcriptomic analyses and biochemical assay of mitochondrial functioning at each step of embryo development coupled with bioenergetics modeling would help to decipher the toxic pathways induced in oyster embryos by the 50-NH₂ beads.

Embryonic exposure to nano-PS affected oyster larval development

A large amount of research studying effects of contaminants to early life stages (ELS) is available but the consequences of sub-lethal effects in ELS on animal performances remain mostly undetermined despite their crucial role in species sustainability. Typically, the time used by *C. gigas* to reach the competent stage in the rearing system used here at 25°C is around 16 dpf as observed in control conditions (Rico-Villa et al., 2008). However, the decrease in larval growth and the delay to reach the competent stage observed in conditions exposed only once, *i.e.* G1-E and G2-C-E conditions, may be viewed as consequences of effects in exposed embryos. The observed slowdown in larval growth could be associated to a lower accumulation of storages during the pelagic phase as remarked with the 20% reduction of the lipid index in the first generation larvae originated from exposed embryos; a similar trend was observed at the second generation even if the decrease was not significant (probably due to the lower number of replicates with n=4 vs. n=12 at G1). Indeed, bivalve larvae that accumulate less lipids can need more time to be competent for metamorphosis (Talmage and Gobler, 2010) showing the crucial role of lipids among entry, use and accumulation of stored

energy along larval development. Their changes in response to embryonic exposure may originate from perturbation in the establishment of larval digestive functions, already suggested by transcriptional profiles in mussel embryos exposed to 50-NH₂ beads (Balbi et al., 2017). Furthermore, metamorphosis and settlement success require high amount of the energy stored during larval development (Bochenek et al., 2001). In the present study, the settlement yield was similar among conditions, highlighting that suspected effects in the energy accumulation have not been sufficiently pernicious to impair larval ability to metamorphose and settle on hard substrates. This is especially true considering that the favorable rearing conditions used here may have concealed any adverse effect. Indeed, the extension of time to reach metamorphosis can expose bivalve larvae to more *in situ* mortality (e.g. predation, pathogens; Talmage & Gobler, 2010) diminishing the settlement yield. The larval growth difference and the delay in settlement seem to have been relatively quickly compensated as evidenced by the same dry weight of G1 oyster seeds whatever the conditions from the first monitoring in the nursery.

The affected larval development did not result in phenotype variations at the adult stage

By monitoring the growth, ecophysiology and gametogenesis of the G1 adult oysters over several months, we investigated a potential “maladaptive tuning”, *i.e.* emergence of new phenotype at the adult stage in response to embryonic exposure leading to a reduced fitness (Hamdoun and Epel, 2007). For instance, zebrafish exposed to PAH during embryonic development had reduced cardiovascular performances at the adult stage (Hicken et al., 2011). Here, adult oysters originated from control or exposed embryos displayed similar growth, ecophysiological characteristics and reproductive outputs (gametes and larval quality). Therefore, these results assume that embryonic exposure to 50-NH₂ at 0.1 µg.mL⁻¹ did not induce any delayed effect in the ecophysiological, growth and reproductive performances of adult oysters in our experimental conditions and over a single generation.

The successive embryonic exposures modulated the response across generations

To understand the risk of contaminants to population stability and estimate the resilience of populations, an important feature is to determine how the sensitivity of animals can evolve across generations. Early life stages correspond especially to sensitive window which can induce effects across generations owing to the differentiation of primordial germ cells during

early development, *i.e.* the environment during early life can induce inter-generational effect in progeny of the next generation (Burton and Melcalfe, 2014). Stressors occurring during early life could engage the progeny to gain tolerance. For instance, progeny of fruit flies needed less time to metamorphosis when parents underwent larval development in poor-food conditions (Vijendravarma et al., 2010). In the present study, larvae originated from the double exposure (*i.e.* G1 and G2 exposed embryos to 50-NH₂ beads) displayed an intermediate growth rate in comparison to other G2 larvae, *i.e.* the control groups of the second generation (G2-C-C and G2-E-C) and the embryos exposed only at the second generation (G2-C-E). This suggests that successive events of embryonic exposures to 50-NH₂ beads have modulated the response in oyster embryos to 50-NH₂ beads, corresponding potentially to an adaptive response which allows for better tolerance (Burton and Melcalfe, 2014). This “stress-memory mechanism” could be linked to epigenetic changes in G1 embryos exposed to 50-NH₂ beads. Epigenetic inheritance, *i.e.* modification of gene expression by adding chemical marks (*e.g.* DNA methylation), could modify positively or negatively the response to a stress over the next generations (Vandegheuchte and Janssen, 2014). Although research in epigenetics for marine invertebrates is at its beginning, first insights indicated that DNA methylations are of great importance in the embryonic development success of *C. gigas* (Riviere et al., 2013). A recent work also suggested that exposures to contaminants (copper) can induce DNA methylation changes during the oyster embryonic development with a potential implication in the observed embryotoxicity (Sussarellu et al., 2018), which remains of interest to test over generations. Therefore, analysis of epigenetic marks in future works would be valuable to understand this potential adaptive response observed here in oysters in response to successive 50-NH₂ beads exposure.

Environmental implications and conclusions

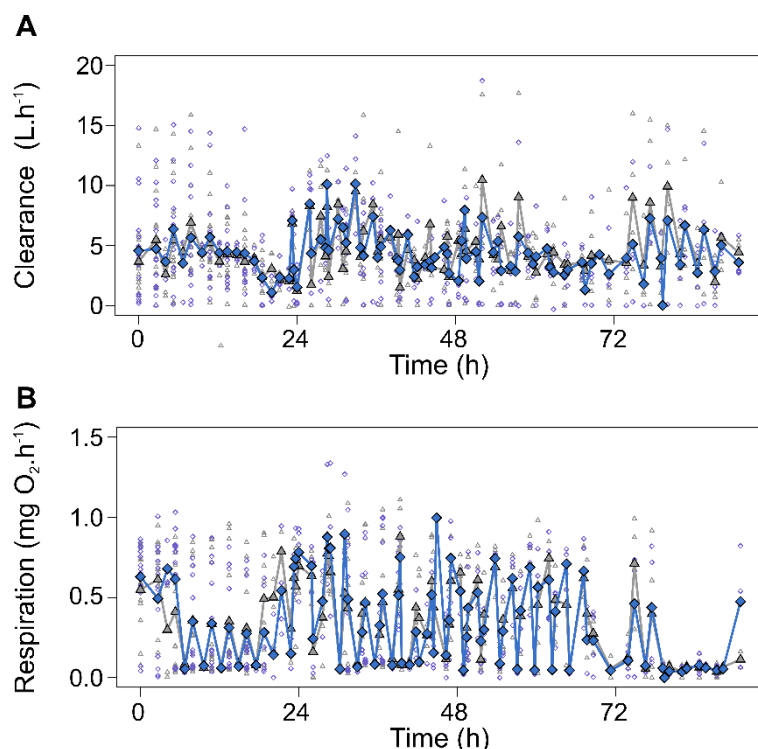
While previous studies demonstrated harmful effects of model nano-PS beads in early life stages (gametes, embryos, larvae), the present work presents delayed effects after an early exposure at the embryo stage. Nevertheless, delayed-effects did not appeared consistent over the entire life cycle as no consequences were highlighted in oyster spat and adults of the first generation in terms of growth, feeding/respiration and reproductive performances. Intriguingly, repeated embryonic exposures over two generations led to modification of the second stress response that may be considered as adaptive. This stress-memory mechanism

could be related to epigenetic changes during the first embryonic exposure that “prepared” the next progeny but the underlying mechanisms remain to be explored.

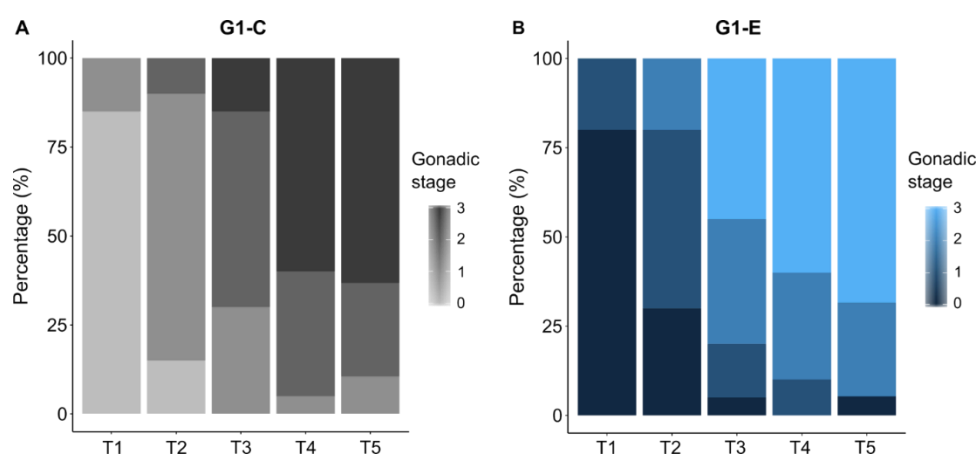
The mass concentration used in the present study may be considered as environmentally relevant (Goldstein et al., 2012), but the number of particles (1.47×10^9 particles.mL⁻¹) exceeds largely the highest – to our knowledge – amount of microplastics (> 10 µm) reported in natural environments (12 particles.mL⁻¹ in sea ice; Peeken et al., 2018). Nevertheless, no information is available about *in situ* concentrations of NP due to a lack of adapted methods (Mintenig et al., 2018). Results provided in the present study demonstrate the crucial importance to determine NP concentrations in oceans for environmental toxicology studies to avoid an overestimation of their risks for marine life and help decision making.

Here we used 50-NH₂ beads as model particles to investigate nano-toxicity due to their properties: (i) no aggregation in experimental seawater and (ii) positive charge promoting interactions with biological membranes (Della Torre et al., 2014; Lehner et al., 2019; Tallec et al., 2018, 2019). Beyond its merits as model nanoparticle in ecotoxicology studies for knowledge and to design methodological approaches, the environmental relevance of this type of nanoplastic is questionable due to oxidation processes occurring in environment leading to a carboxylic surface and anionic charge (Fotopoulou and Karapanagioti, 2012). Overall, the relative toxicity of model plastic particles vs. natural particles remains a relevant and open question that must be addressed in the near future. Recently, methods mimicking environmental processes were published to produce model NP with different polymers and shapes (Magrì et al., 2018; Mitrano et al., 2019; Pessoni et al., 2019). These methods would be very useful in the coming works to approach more precisely *in situ* toxic potential of NP.

5) SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Figure 1. Standardized clearance (A) and respiration (B) rate of G1-C (grey; originated from control embryos) and G1-E adult oysters (blue; originated from exposed embryos to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) over the 4 trials ($n = 16$ oysters per condition). Empty symbols correspond to all individual measurements while filled symbols correspond to the mean values of each acquisition cycle.



Supplementary Figure 2. Distribution of gametogenic stage at 0 (T1), 2 (T2), 4 (T3), 6 (T4) and 8 (T5) weeks of conditioning for G1-C oysters (A) and G1-E oysters (B). For each date, 20 oysters per condition were sampled.

Supplementary Table 1. Polar fatty acids of oyster D-larvae originated from control embryos (G1-C) or exposed embryos to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G1-E). FAs were expressed as the mass percentage of each FA to the total polar FA content (n=12; mean ± SE). Comparisons were made between treatments using a one-way analysis of similarities (ANOSIM) at the 5% level.

	Conditions	
	G1-C	G1-E
iso17:0	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01
ant17:0	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Σ BRANCHED	0.69 ± 0.01	0.67 ± 0.01
14:0	1.07 ± 0.04	1.10 ± 0.04
15:0	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01
16:0	16.49 ± 0.23	16.36 ± 0.21
17:0	0.87 ± 0.01	0.86 ± 0.02
18:0	5.10 ± 0.09	4.84 ± 0.07
Σ SFA	23.79 ± 0.29	23.42 ± 0.27
16:1n-9	0.24 ± 0.04	0.28 ± 0.02
16:1n-7	1.08 ± 0.06	1.12 ± 0.05
18:1n-9	1.49 ± 0.02	1.54 ± 0.02
18:1n-7	2.57 ± 0.07	2.62 ± 0.07
18:1n-5	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02
20:1n-11	1.90 ± 0.03	1.80 ± 0.03
20:1n-9	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.01
20:1n-7	3.61 ± 0.04	3.54 ± 0.04
22:1n-11	0.93 ± 0.03	0.89 ± 0.02
22:1n-9	5.11 ± 0.06	4.79 ± 0.07
Σ MUFA	17.67 ± 0.11	17.32 ± 0.13
18:2n-6	0.84 ± 0.01	0.88 ± 0.02
18:3n-3	1.11 ± 0.03	1.19 ± 0.02
18:4n-3	1.76 ± 0.04	1.84 ± 0.03
20:4n-6	1.80 ± 0.04	1.72 ± 0.02
20:5n-3	19.93 ± 0.16	20.84 ± 0.17
21:5n-3	0.83 ± 0.01	0.85 ± 0.01
22:5n-6	0.79 ± 0.03	0.80 ± 0.02
22:5n-3	1.88 ± 0.04	1.95 ± 0.04
22:6n-3	15.59 ± 0.32	15.40 ± 0.32
20:2j	0.63 ± 0.02	0.56 ± 0.05
Σ PUFA	45.16 ± 0.29	46.03 ± 0.36
16:1n-7DMA	1.52 ± 0.04	1.62 ± 0.06
18:0DMA	7.31 ± 0.12	7.18 ± 0.23
Σ DMA	8.83 ± 0.10	8.80 ± 0.21
Σ Unknown (3 FA)	0.93 ± 0.03	0.98 ± 0.04

Supplementary Table 2. Neutral fatty acids of oyster D-larvae originated from control embryos (G1-C) or exposed embryos to 50 nm amino-polystyrene beads at 0.1 µg.mL⁻¹ (G1-E). FAs were expressed as the mass percentage of each FA to the total neutral FA content (n=12; mean ± SE). Comparisons were made between treatments using a one-way analysis of similarities (ANOSIM) at the 5% level.

	Conditions	
	G1-C	G1-E
iso17:0	0.41 ± 0.00	0.42 ± 0.01
Σ BRANCHED	1.03 ± 0.01	1.08 ± 0.03
14:0	5.72 ± 0.16	5.92 ± 0.18
15:0	0.44 ± 0.00	0.47 ± 0.02
16:0	25.61 ± 0.10	26.70 ± 0.94
17:0	0.86 ± 0.01	0.90 ± 0.03
18:0	4.05 ± 0.06	4.41 ± 0.18
Σ SFA	36.82 ± 0.25	38.58 ± 1.24
16:1n-9	0.30 ± 0.00	0.29 ± 0.03
16:1n-7	5.83 ± 0.35	5.78 ± 0.33
16:1n-5	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.01
18:1n-11	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01
18:1n-9	3.77 ± 0.02	3.65 ± 0.12
18:1n-7	5.02 ± 0.11	4.92 ± 0.09
18:1n-5	0.24 ± 0.01	0.29 ± 0.05
20:1n-11	0.93 ± 0.02	0.90 ± 0.03
20:1n-9	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
20:1n-7	2.44 ± 0.04	2.32 ± 0.11
Σ MUFA	19.31 ± 0.45	18.93 ± 0.36
16:2n-4	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01
16:3n-4	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01
18:2n-6	2.03 ± 0.02	1.96 ± 0.07
18:2n-4	0.36 ± 0.01	0.33 ± 0.01
18:3n-3	3.14 ± 0.06	3.02 ± 0.13
18:4n-3	5.87 ± 0.07	5.65 ± 0.19
20:4n-6	0.57 ± 0.00	0.55 ± 0.01
20:4n-3	0.79 ± 0.01	0.76 ± 0.02
20:5n-3	12.57 ± 0.11	12.12 ± 0.34
21:5n-3	1.09 ± 0.01	1.03 ± 0.04
22:5n-6	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01
22:5n-3	0.81 ± 0.02	0.89 ± 0.06
22:6n-3	8.24 ± 0.12	7.88 ± 0.29
20:2j	1.38 ± 0.03	1.29 ± 0.06
22:2j	2.85 ± 0.05	2.71 ± 0.14
22:2i	0.36 ± 0.01	0.33 ± 0.01
Σ PUFA	42.22 ± 0.32	40.64 ± 1.01

18:0DMA	0.45 ± 0.01	0.57 ± 0.05
Σ DMA	0.45 ± 0.01	0.57 ± 0.05
Σ Unknown (2 FA)	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.02
Σ Others ^a	2.09 ± 0.01	2.12 ± 0.01

^a Others: iso15:0, ant15:0, iso16:0, ant17:0, 24:0, 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:4n-1, 20:2i, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:3n-3, each accounting for less than 0.2% of the total FA.

A RETENIR

- Les 50-NH₂ semblent affecter le fonctionnement des mitochondries et les processus de biominéralisation durant l'exposition embryonnaire.
- L'exposition embryonnaire a diminué les performances larvaires (réduction de 10-20% du taux de croissance) de *C. gigas*.
- L'exposition embryonnaire de la première génération (G1) n'a eu aucune incidence sur le phénotype des huîtres au stade adulte (croissance, alimentation, respiration, reproduction, viabilité de la progéniture).
- Les résultats obtenus sur la seconde génération (G2) supposent la création d'une empreinte précoce lors de la première exposition (G1), conduisant à des effets amoindris sur le développement larvaire de la condition résultant des deux expositions embryonnaires.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Depuis 70 ans, les débris plastiques dont la fin de vie a été négligée par les sociétés humaines s'accumulent et persistent dans les océans (Ostle et al., 2019). La découverte des microplastiques (MP < 5 mm) en 2004 a révélé à la communauté scientifique le postulat suivant : un macrodéchet plastique dans l'environnement marin peut se fragmenter en particules microscopiques (Thompson et al., 2004) auxquelles vont s'ajouter des entrées directs de MP en provenance d'activités industrielles ou domestiques (Cole et al., 2011). Depuis, de nombreux protocoles ont été développés pour accéder aux particules les plus fines et chaque nouveau développement s'accompagne du même résultat, *i.e.* leur présence ubiquitaire et leur abondance croissante lorsque l'on descend en taille de débris. Par exemple, dans les sédiments côtiers de la mer du Nord (max : 1189 particules.kg⁻¹ ; Lorenz et al., 2019), dans la glace de mer arctique (max : 12 particules.mL⁻¹ ; Peeken et al., 2018) ou encore dans les sédiments arctiques (max : 6695 particules.kg⁻¹ ; Bergmann et al., 2017), les particules de 10-50 µm représentent plus de 80% des MP échantillonnés. Cette fragmentation devrait atteindre des tailles nanométriques comme le suppose des données expérimentales (*e.g.* Gigault et al., 2016; Lambert & Wagner, 2016) et la présence d'empreintes chimiques associées aux plastiques dans la fraction colloïdale d'échantillons issus du Gyre Atlantique Nord (Ter Halle et al., 2017). Cependant, aucune donnée quantitative ni qualitative (*e.g.* comportement dans la colonne d'eau) n'est disponible pour les petites particules inférieures à 10 µm à ce jour en raison de verrous méthodologiques (Mintenig et al., 2018; Schwaferts et al., 2019).

Malgré les incertitudes liées aux micro- et nanoplastiques (MNP) concernant leurs distributions depuis la surface jusqu'aux abysses et leurs concentrations environnementales, la caractérisation de leurs potentiels effets est une problématique majeure pour la communauté scientifique et l'aide à la décision (*e.g.* Galgani et al., 2013; Galloway et al., 2017; GESAMP, 2015; Lusher et al., 2017). Du fait de leur petite taille, les MNP sont biodisponibles pour la plupart des organismes marins et peuvent être ingérés accidentellement (Wright et al., 2013). Des effets délétères sont suspectés à différentes échelles biologiques (cellulaire, individuelle, populationnelle, écosystémique) selon les informations obtenues par des expositions en milieu contrôlé de laboratoire (Galloway et al., 2017). Les travaux réalisés dans ce travail de thèse s'intègrent dans cette problématique et avaient pour objectif d'explorer les effets des particules plastiques de fractions micro- et nanométriques (< 5 µm) sur les jeunes

stades de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Cette espèce est un modèle d'étude pertinent car en plus d'être la première espèce aquacole au niveau mondial, elle joue un rôle écologique majeur puisque c'est une espèce ingénieure des habitats côtiers et estuariens (Bayne, 2017). De plus, l'utilisation de l'huître comme modèle biologique permet de profiter des nombreux outils expérimentaux (*e.g.* éclosion et nurserie expérimentales) et analytiques (*e.g.* connaissance du génome) disponibles. Une synthèse des résultats marquants obtenus durant ce projet de recherche ainsi que leurs limites et les perspectives à court et long termes sont présentées dans cette discussion générale.

1) LES EFFETS DES MNP SUR LES JEUNES STADES DE *C. GIGAS*

1.1. Les jeunes stades de l'huître sont-ils sensibles aux particules plastiques ?

Le bon déroulement de la vie pélagique est essentiel à la stabilité et la pérennité des populations naturelles d'huîtres (Bayne, 2017; Pechenik, 1999). **Nos analyses ont mis en évidence une sensibilité des premiers stades de vie de *C. gigas* aux nanosphères de polystyrène (nano-PS ; 50 nm) dépendante du stade de développement considéré.** A l'exception des larves pédivéligères (dernier stade du développement pélagique), les nano-PS ont induit une toxicité aiguë sur l'ensemble des stades et étapes de développement exposé(e)s, *i.e.* spermatozoïdes, ovocytes, fécondation et développement embryo-larvaire (Figure 1). En revanche, **les sphères de 500 nm et 2 µm n'ont induit aucun effet phénotypique**, peu importe le stade/étape concerné(e), même à la plus forte concentration utilisée, *i.e.* 25 µg.mL⁻¹. L'innocuité des MP sphériques observée dans ce travail corrobore les données obtenues précédemment lors d'expositions chroniques ou aiguës sur les stades larvaires de l'huître (Cole & Galloway, 2015; Sussarellu et al., données non publiées) et les jeunes stades (embryons, larves) d'autres modèles biologiques (*e.g.* *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, Beiras et al., 2018; *Tripneustes gratilla*, Kaposi et al., 2014). Le faible rapport surface/volume de ces microparticules comparativement aux fractions nanométriques limite la possibilité d'interactions avec les membranes des gamètes/embryons et donc le risque d'effets toxiques associés (*e.g.* mortalité, altération cellulaire, immobilisation des spermatozoïdes) tandis que la forme sphérique et lisse favorise une excrétion rapide par

les larves capables de les ingérer, limitant la rétention et donc les perturbations physiques pouvant mener à des effets néfastes (Frydkjær et al., 2017; Mazurais et al., 2015).

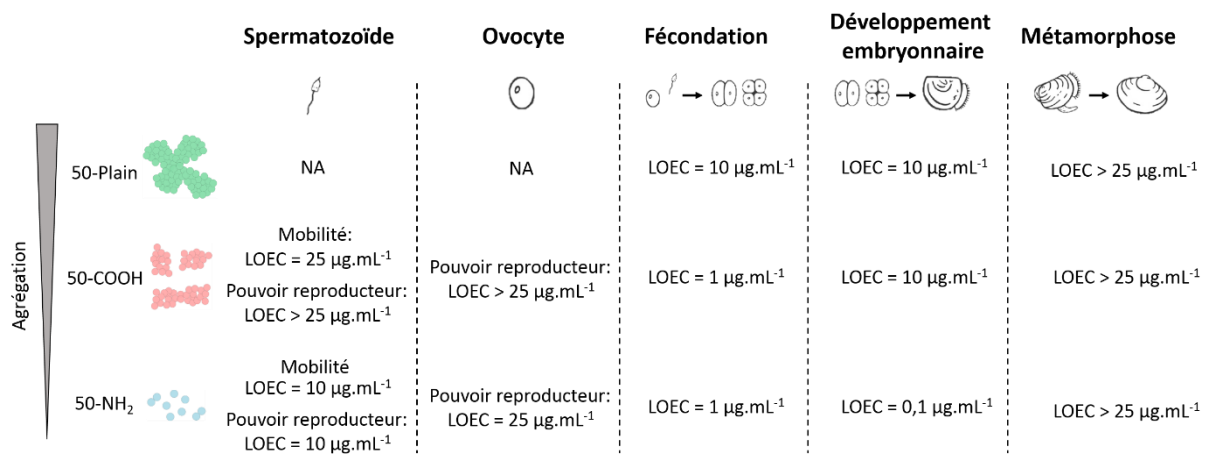


Figure 1. Sensibilités des stades et étapes de développement exposé(e)s aux trois types de nano-PS de 50 nm (aminée – 50-NH₂ ; carboxylée – 50-COOH ; neutre – 50-Plain) exprimées en terme de « LOEC = Lowest Observed Effect Concentration » correspondant à la concentration minimale pour laquelle un effet a été observé.

1.2. Les propriétés de surface modulent le comportement et la toxicité des nanosphères (50 nm) de polystyrène

Théoriquement, la différence de toxicité entre les trois types de nano-PS (neutre – 50-Plain, carboxylée – 50-COOH, aminée – 50-NH₂) pourrait être associée simplement à la toxicité des groupements de surface (Bannunah et al., 2014). La nature cationique des 50-NH₂ favorise naturellement les interactions avec les membranes biologiques, *via* un mécanisme d'attraction lié à la charge négative des membranes, par rapport aux 50-COOH et 50-Plain qui présentent une charge de surface négative (Figure 2; Cho et al., 2009; Verma & Stellacci, 2009). Cependant, le comportement (*i.e.* agrégation) des particules dans le milieu expérimental est apparu déterminant dans la toxicité évaluée sur les jeunes stades de l'huître, soulignant ainsi que sa caractérisation est essentielle afin de comprendre la dangerosité des particules (Lowry et al., 2012). En effet, selon les paramètres environnementaux (*e.g.* salinité et présence de matière organique, Chapitre 3; température, Singh et al., 2019) et les propriétés intrinsèques des particules (*e.g.* taille, charge de surface, groupements chimiques associés), des processus d'agrégation peuvent se mettre en place dans le microenvironnement étudié. Tandis que le comportement vertical des particules

micrométriques est dirigé principalement par la densité du polymère, la diminution de taille dans le domaine colloïdal va favoriser les interactions avec les molécules d'eau, *i.e.* l'obtention d'un mouvement brownien. La stabilité des nanoparticules dans un milieu repose sur l'équilibre entre forces attractives et répulsives décrit par la théorie de Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO). Dans l'eau de mer, les ions interagissant avec la surface des nano-PS peuvent affecter cet équilibre et provoquer l'agrégation des particules dont l'intensité est dépendante de leurs propriétés de surface. Cette agrégation a une implication biologique importante car les agrégats micrométriques formés par les 50-COOH et 50-Plain dans l'eau de mer perdent en biodisponibilité et présentent un rapport surface/volume réduit par rapport aux nano-PS libres, diminuant les interactions avec les cellules. La différence de toxicité entre les nano-PS est ainsi exacerbée en faveur des 50-NH₂ qui restent stables dans l'eau de mer avec une agrégation à hauteur de 100 nm (Figure 2). **Ainsi, la toxicité des nano-PS est dépendante à la fois des propriétés de surface des particules qui déterminent l'affinité avec les membranes biologiques et du comportement des particules qui régule l'intensité des interactions avec les cellules.**

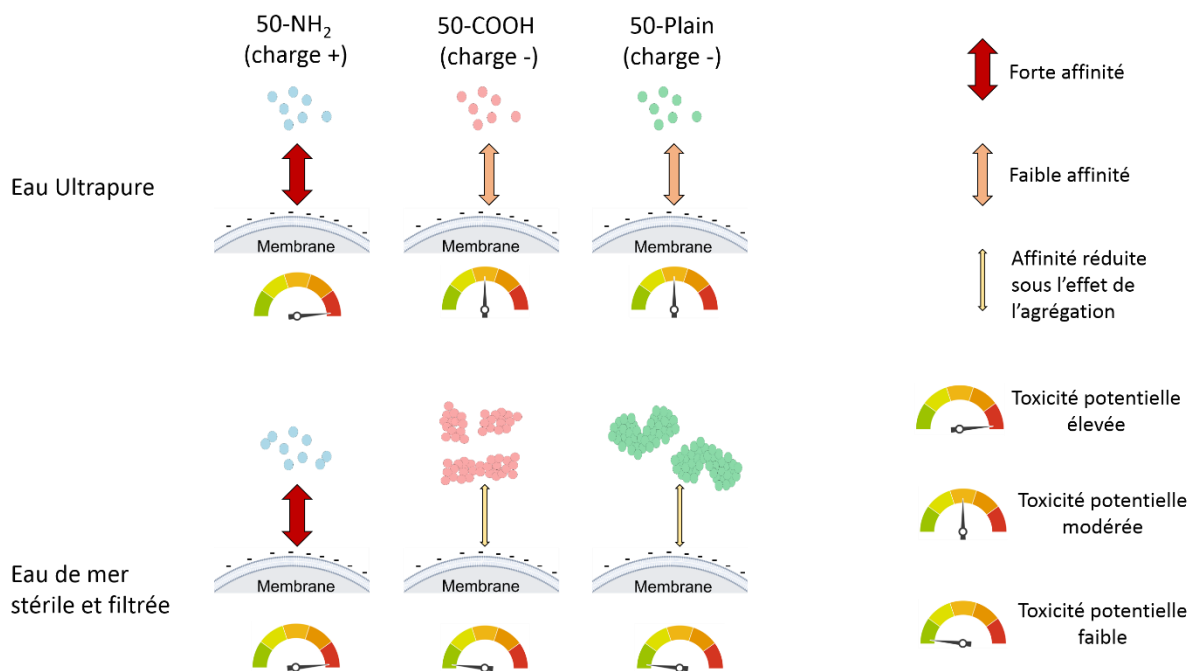


Figure 2. Intensité de l'affinité entre nano-PS et une membrane cellulaire selon les propriétés de surface de la particule et l'état d'agrégation dans de l'eau ultrapure (eau purifiée sans ajout d'ions) ou de l'eau de mer stérile et filtrée.

Durant ce travail de thèse, je me suis intéressé au comportement des nano-PS dans des microenvironnements simplifiés (*e.g.* gradient de salinité, présence/absence de matière organique), qui ne représentent en aucun cas la complexité inhérente du compartiment aquatique. Selon le milieu considéré, les macromolécules (*e.g.* polluants, protéines, polysaccharides) présentes peuvent s'adsorber sur les nanoparticules, formant une corona (éco-corona dans l'environnement ; bio-corona dans les organismes) (Canesi & Corsi, 2016). La formation de la corona étant dépendante de la taille, de l'agrégation et des propriétés de surface des particules (Lundqvist et al., 2008; Strojan et al., 2017), il serait intéressant d'évaluer ses effets dans l'eau de mer naturelle sur le comportement et la toxicité des différents nano-PS à court, moyen et long termes. Ce type d'expérience permettrait d'appréhender l'influence de la corona sur l'évolution de la stabilité des nanoplastiques dans l'environnement aquatique et de la dangerosité associée selon leurs propriétés intrinsèques (taille, nature chimique du polymère, propriétés de surface). La corona joue un rôle clé car elle définit l'identité biologique d'une particule et peut entraîner des interactions spécifiques avec les organismes vivants (Canesi & Corsi, 2016; Lesniak et al., 2013; Nasser & Lynch, 2016). Par exemple, l'adsorption de composés protéiques produits par la daphnie sur des nano-PS (100 nm ; -NH₂) a augmenté le taux d'ingestion des particules par la daphnie et l'effet sur sa survie, diminuant l'EC₅₀ de 26 µg.mL⁻¹ pour les particules sans éco-corona à 8 µg.mL⁻¹ pour les particules avec corona (Nasser & Lynch, 2016). Les changements de polarité et de comportement des 50-NH₂ dans le liquide ovarien suggèrent également la formation d'une éco-corona. Afin de clarifier l'influence de cette corona dans de la toxicité des 50-NH₂ observée sur les ovocytes, il serait intéressant de réitérer l'expérience présentée au chapitre 5 sur des ovocytes filtrés sur 20 µm et rincés afin de retirer le fluide ovarien et les macromolécules qui le composent.

1.3. Quel est le mode d'action des nano-PS ?

Les gamètes et embryons de l'huître se distinguent des stades véligères et pédivéligères par l'absence de processus d'ingestion. De ce fait, **la toxicité des nano-PS est liée aux contacts directs avec la barrière externe de ces cellules, leur membrane cellulaire**. Cette dernière est une structure complexe et dynamique composée de deux grandes familles de macromolécules, les lipides formant la bicouche lipidique et les protéines qui y sont insérées

(protéines transmembranaires) ou attachées (protéines périphériques). Les protéines transmembranaires jouent des rôles essentiels dans l'homéostasie (*e.g.* canaux ioniques) et la communication avec le milieu intracellulaire (*e.g.* transduction de signal). Leur activité dépend de leur conformation spatiale qui est dirigée par l'état (*e.g.* composition en lipide, fluidité) de la bicouche lipidique (Weil, 2009). Ainsi, une modification des propriétés physiques de la membrane peut induire des effets néfastes dans le fonctionnement cellulaire. Une modification de la fluidité et de l'organisation de bicouches lipidiques modèles a notamment été démontrée sous l'effet de nano-PS par modélisation moléculaire (Rossi et al., 2014).

Les analyses lipidiques que j'ai réalisées sont des méthodes permettant de déterminer si les cellules (gamètes, embryons) ont répondu à l'adhésion des nano-PS à la membrane par la modification de leur composition lipidique. Ainsi, une augmentation de la teneur en phosphatidylsérine a été détectée chez les spermatozoïdes exposés à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de 50-NH₂. En raison du rôle clé de ce phospholipide dans le fonctionnement de pompes membranaires (*e.g.* Na⁺/K⁺-ATPase) qui sont essentielles à la mobilité des spermatozoïdes, nous supposons que les effets phénotypiques observés (perte de mobilité des spermatozoïdes inhibant leurs capacités de fécondation) sont liés à un effet direct des 50-NH₂ sur le fonctionnement de la membrane (*e.g.* modification des échanges ioniques). Ainsi, l'utilisation de dosages colorimétriques permettant de mesurer les flux d'ions à la membrane des spermatozoïdes (*e.g.* Alavi et al., 2014) et/ou d'un fluorochrome utilisable par cytométrie en flux pour mesurer un changement de potentiel membranaire (*e.g.* is-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethineoxonol – Dibac4(3); Rossato et al., 2001) pourraient s'avérer pertinents afin de valider cette hypothèse dans de futurs travaux.

Bien que je n'ai pas étudié l'effet des nano-PS sur la composition des membranes des embryons de *C. gigas* lors des expositions aux doses induisant des arrêts de développement précoces ($> 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les 50-NH₂; $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les 50-COOH), ces effets phénotypiques majeurs peuvent être aussi attribués à des interactions membranaires. En effet, l'adhésion des nano-PS aux membranes est capable d'induire différentes réponses cellulaires, notamment des phénomènes de mort cellulaire programmée comme démontré chez l'embryon de l'oursin exposé aux 50-NH₂ (Della Torre et al., 2014). Ce phénomène pourrait être lié à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme observé chez différentes lignées cellulaires et organismes aquatiques lors d'expositions aux nano-PS

(Bexiga et al., 2011; Canesi et al., 2015; Gonzalez-Fernandez et al., 2019; Jeong et al., 2017; Paget et al., 2015). Une surproduction de ROS peut affecter les macromolécules des cellules (*e.g.* peroxydation lipidique, fragmentation de l'ADN) et induire le déclenchement de l'apoptose (Fu et al., 2014; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). A une dose non-létale, la fragmentation de l'ADN (*i.e.* génotoxicité) peut induire des changements transcriptionnels (Sussarellu et al., 2018). Une génotoxicité pourrait être ainsi impliquée dans les conséquences subcellulaires sur la biominéralisation et le fonctionnement des mitochondries observées chez les larves D issues d'une exposition embryonnaire aux 50-NH₂ (0,1 µg.mL⁻¹). Ainsi, une future expérimentation sur les embryons de *C. gigas* devrait viser à l'analyse du fonctionnement cellulaire et d'une potentielle génotoxicité à différents stades de développement (2-4 cellules, morula, blastula, gastrula, trochophore, larve D) afin de déterminer l'initiation de la toxicité et les voies cellulaires impliquées. La fragmentation de l'ADN pourrait être détectée à l'aide du test des « Comètes » (Akcha et al., 2012) ou par qPCR via l'analyse du rapport entre la quantité d'ADN amplifié d'un fragment PCR court et d'un fragment PCR long de différents gènes cibles (Bennett et al., 2005). Ce protocole est en cours de développement au laboratoire. Pour évaluer les perturbations cellulaires, l'utilisation des outils -omics est à prioriser car leur puissance permet d'avoir un aperçu sans à priori du fonctionnement des cellules au moment du prélèvement et donc d'identifier les modifications cellulaires responsables de la modulation du phénotype (Revel et al., 2017; Paul-Pont et al., 2018). Durant cette thèse, j'ai utilisé une approche de protéomique sur les larves D issues de l'exposition embryonnaire aux 50-NH₂ (0,1 µg.mL⁻¹) permettant d'identifier au total 2540 protéines sans pour autant déceler des différences significatives dans leurs quantités par rapport à des larves D témoins. Toutefois, cette approche ne permet pas de détecter l'ensemble des protéines des larves mais seulement les plus abondantes. Nous avons tenté de coupler cette analyse avec une approche RNAseq mais un problème expérimental lié au protocole d'extraction des ARN totaux a empêché sa réalisation. Une nouvelle tentative serait pertinente car le RNAseq permet l'obtention d'un plus grand nombre d'informations que l'approche protéomique utilisée grâce à une importante profondeur de séquençage.

Il est à noter que la perturbation physique de la membrane modifiant l'homéostasie cellulaire n'est pas la seule possibilité pour expliquer les effets toxiques des nano-PS. D'une part, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un relargage de composés chimiques (*e.g.* additifs)

incorporés durant la production des sphères de polystyrène par le fournisseur, une analyse chimique des particules et des milieux d'exposition permettrait de vérifier cette hypothèse (Sussarellu et al., 2016). D'autre part, ces particules pourraient entrer à l'intérieur des cellules (*e.g.* via endocytose ou création de nanopores) et affecter directement les différents organites subcellulaires (Bexiga et al., 2011; Lesniak et al., 2013; Wang et al., 2013). **L'internalisation des nano-PS au contact des membranes des embryons, ovocytes et spermatozoïdes (faible risque pour ces derniers car absence des mécanismes d'endocytoses ; Taylor et al., 2015) de *C. gigas* restent à éclaircir dans de futures études.** Au regard du faible contraste des nano-PS par microscopie électronique à transmission et du risque de biais lié à l'utilisation de particules fluorescentes (Catarino et al., 2019; Schür et al., 2019), le développement et l'utilisation de nanoparticules de plastique traçables est inévitable. L'utilisation de nano-PS marquées au ^{14}C dans de futures études permettrait de compenser le faible contraste des particules et de déterminer s'il y a franchissement de la membrane ou non. Par l'utilisation de ces particules, une accumulation de nano-PS (24 nm) dans différents organes (*e.g.* gonade, muscle) de la coquille Saint-Jacques a notamment pu être démontrée (Al-Sid-Cheikh et al., 2018).

1.4. Les réponses des embryons aux 50-NH₂ pourraient être modulées à travers les générations

Les conditions environnementales rencontrées par un individu durant ses premiers stades de vie peuvent affecter la machinerie qui coordonne son développement (*e.g.* mise en place des organes et fonctions exercées) et par conséquent influencer le phénotype du stade adulte (Hamdoun & Epel, 2007; Hicken et al., 2011; Vignet et al., 2014). L'exposition embryonnaire de *C. gigas* aux 50-NH₂ et la réduction des performances larvaires associées n'ont eu aucune incidence sur les performances écophysiologiques (croissance, respiration, filtration) et reproductives (rythme de gamétogénèse, qualité des gamètes) du stade adulte. Toutefois, les performances larvaires de la génération issue de deux expositions embryonnaires (à la génération 1 et 2) sont apparues supérieures à celles de larves issues d'embryons exposés seulement à la seconde génération. **Ce résultat suggère un mécanisme de type « stress-memory » chez des individus de deuxième génération et donc un effet intergénérationnel à la suite d'une exposition embryonnaire aux 50-NH₂.** En effet, les conditions rencontrées durant les premiers stades de développement peuvent influencer la génération suivante potentiellement par des changements épigénétiques (Burton & Metcalfe, 2014). Par

définition, l'épigénétique est la modification de l'expression des gènes sans altération de la structure nucléotidique, par l'ajout de marques chimiques (*e.g.* méthylation) sur certaines régions de l'ADN ou sur les protéines structurantes de la chromatine (*i.e.* les histones) (Feil & Fraga, 2012). Ces processus épigénétiques sont influencés par les facteurs environnementaux et peuvent être altérés sous l'effet des perturbateurs anthropiques induisant le développement d'un nouveau phénotype chez l'organisme touché (Feil & Fraga, 2012; Flores et al., 2013). Par exemple, la modification du niveau de méthylation de gènes homéotiques serait impliquée dans l'embryotoxicité induite par le cuivre chez l'huître (Sussarellu et al., 2018). Théoriquement, une modulation de la réponse au même stress à travers les générations pourrait être associée à ces marques épigénétiques (Flores et al., 2013; Burton & Metcalfe, 2014). L'ontologie chez *C. gigas* est notamment associée à une coordination de facteurs épigénétiques qui pourrait dépendre du méthylome hérité (Rivière et al., 2013; 2017). Ainsi, la détermination d'une potentielle empreinte épigénétique précoce représente une piste pertinente pour de futures analyses afin de comprendre les effets intergénérationnels d'une exposition embryonnaire aux 50-NH₂. Dans le cadre d'une première approche, il pourrait s'avérer intéressant de coupler l'analyse RNAseq avec l'évaluation du taux de méthylation des gènes différentiellement exprimés entre les embryons exposés ou non à la première génération, puis de vérifier si les patterns sont similaires ou différents à la génération suivante selon une nouvelle exposition embryonnaire ou non.

De nombreuses pistes restent donc à explorer pour mieux comprendre les mécanismes de toxicité liés aux NP chez les jeunes stades de vie de l'huître *C. gigas* et autres organismes marins. Cependant, la réalisation de ces nouvelles expériences doit impérativement prendre en compte l'évolution de la thématique ainsi que les données et développements méthodologiques régulièrement mis à jour dans la littérature. Les résultats écotoxicologiques de ce manuscrit de thèse doivent ouvrir sur de nouvelles explorations dont la pertinence environnementale devra être améliorée, notamment pour l'aide à la décision. En effet, les travaux présentés dans ce manuscrit permettent l'avancée des connaissances d'un point de vue toxicologique et mécanistique, ce qui est essentiel aux premières étapes de compréhension des effets de tout contaminant émergent et permettent de mettre à disposition des outils et méthodes, mais elles manquent de réalité environnementale en raison de différentes limites discutées dans les paragraphes ci-dessous.

2) COMMENT S'APPROCHER DE LA REALITE ENVIRONNEMENTALE ?

2.1. Utiliser des particules représentatives de l'environnement

Durant ce projet, nous avons travaillé avec des sphères de polystyrène disponibles dans le commerce et communément utilisées par la communauté écotoxicologique du fait du faible choix disponible actuellement concernant les MNP. Ces particules modèles facilitent la compréhension des mécanismes de toxicité mais ont une pertinence environnementale faible pour plusieurs raisons :

- Le polymère. Bien que le polystyrène soit un des principaux polymères produits (7% de la demande européenne en 2017; PlasticsEurope, 2018), ces particules commerciales ne reflètent pas la diversité de polymères ayant des propriétés physico-chimiques et toxicologiques distinctes (*e.g.* polyéthylène, polypropylène, polyamides, résidus pneumatiques; Lambert et al., 2017).
- Les groupements de surface. Les particules les plus toxiques pour les jeunes stades de *C. gigas* dans ce travail sont les nano-PS aminées, corroborant la littérature (*e.g.* Della Torre et al., 2014; Gonzalez-Fernandez et al., 2019; Nolte et al., 2017). Dans l'environnement, les seuls polymères susceptibles de présenter « naturellement » des groupements aminés sont les polyamides dont la présence dépend des environnements étudiés mais qui représentent plus de 37% des microplastiques récoltés lors d'échantillonnages des eaux côtières d'Hawaii par exemple (Brignac et al., 2019; Lehner et al., 2019). Néanmoins, la présence de groupements de surface aminés paraît peu probable car du fait des processus d'oxydation sous l'effet des rayonnements UV, les débris plastiques ont tendance à présenter des surfaces carboxylées anioniques (Fotopoulou & Karapanagioti, 2012; Ter Halle et al., 2017).
- La forme. Du fait de l'abondance majoritaire des débris secondaires aux formes irrégulières (>97% des MP dans l'environnement ; Hüffer et al., 2017), l'utilisation de particules parfaitement sphériques n'est pas représentative des MNP environnementaux

que l'on retrouve principalement sous la forme de fragments et de fibres. La forme influence l'ingestion par les organismes et l'interaction des (nano)particules avec les cellules, donc les potentiels effets toxiques (Cole et al., 2019; Gratton et al., 2008).

- Le vieillissement. Les polymères sont naturellement associés à des composés chimiques potentiellement toxiques, les additifs, qui peuvent être relargués dans le milieu naturel sous l'effet du vieillissement (Bejgarn et al., 2015; Hermabessiere et al., 2017; Li et al., 2016; Tetu et al., 2019). Un effet confondant entre impact direct des particules et relargage de composés toxiques a notamment été suggéré chez *C. gigas* pour expliquer à la fois la réduction du nombre de gamètes et leur qualité après l'exposition des adultes à des microsphères de 2 et 6 μm pendant la gamétogénèse, ceci par l'observation de patrons d'expression génique caractéristiques d'une perturbation endocrinienne et par la modification de l'allocation énergétique pour la reproduction des géniteurs exposés (Sussarellu et al., 2016). Le vieillissement des particules induit également d'autres modifications (*e.g.* formation d'une corona puis d'un biofilm, adsorption de polluants organiques persistants, modification de la surface) pouvant affecter la distribution dans la colonne d'eau, les interactions avec les organismes et les effets néfastes (Rummel et al., 2017; Vroom et al., 2017).

Ces différents paramètres montrent que les résultats obtenus à l'aide de particules modèles disponibles dans le commerce doivent être interprétés dans leur contexte et sans extrapolation environnementale. Concernant les MP, du fait des connaissances acquises ces dernières années par l'évaluation de la contamination *in situ*, il est urgent de prendre en compte la complexité des MP environnementaux dans les futures expériences écotoxicologiques (Figure 3). Il paraît évident que l'utilisation des MP récoltés directement dans l'environnement représente l'approche la plus pertinente (Cormier et al., 2019). Toutefois, la récolte de la quantité nécessaire de particules pour l'expérimentation pourrait être problématique selon le niveau de contamination des zones. Par exemple, en rade de Brest, la récolte de MP pour l'expérimentation nécessiterait un très gros effort d'échantillonnage en raison du faible niveau de contamination (0,24 particules. m^{-3} en eau de surface, 0,91 particules. kg^{-1} pour les sédiments ; Frère et al., 2017). Ainsi, un bon compromis serait d'utiliser des particules de différentes formes et natures de polymères que l'on peut

produire en laboratoire (Cole, 2016; Revel et al., 2019) avec une quantité connue d'additifs préalablement caractérisés (Hermabessière, 2018) puis de les déployer dans l'environnement afin de prendre en compte l'adsorption de polluants organiques persistants et la formation du biofilm par exemple (Asmonaite et al., 2018). L'exposition des jeunes stades de vie de *C. gigas* à ces particules permettrait d'extrapoler, au sens large des MP, l'innocuité des microsphères de PS que suggèrent nos résultats et la littérature (Cole & Galloway, 2015).

Au regard de la méconnaissance totale des particules plastiques nanométriques de l'environnement, le simple fait de produire des nanoparticules de différents polymères, de différentes formes et dont la composition est contrôlée (*e.g.* propriétés de surface, ajout de polluants/additifs) sera une avancée majeure pour obtenir de nouvelles informations sur les risques associés pour cette gamme de taille. Récemment, six études ont été publiées avec des protocoles permettant la production de particules plastiques nanométriques plus pertinentes d'un point de vue environnemental que les nano-PS pour plusieurs raisons (Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Balakrishnan et al., 2019; Baudrimont et al., 2019; Magrì et al., 2018; Mitrano et al., 2019; Pessoni et al., 2019). Premièrement, la synthèse de ces NP n'implique pas nécessairement l'utilisation de surfactants dont la présence peut induire un effet confondant dans les tests de toxicité utilisant des nano-PS disponibles dans le commerce (Al-Sid-Cheikh et al., 2018; Pessoni et al., 2019; Pikuda et al., 2019; Magrì et al., 2018). Deuxièmement, la production de particules autres que du polystyrène est possible (PE, Balakrishnan et al., 2019 et Baudrimont et al., 2019; PET, Magrì et al., 2018). Troisièmement, les particules peuvent avoir des formes différentes (lisse vs. « framboise ») permettant de tester un effet de la forme des particules (Pessoni et al., 2019). Quatrièmement, les particules peuvent présenter des propriétés de surface (*e.g.* densité des groupes carboxylées) mimant l'effet du rayonnement UV sur les particules dans l'océan (Magrì et al., 2018; Pessoni et al., 2019). Enfin, certaines particules peuvent être traçables dans des environnements complexes (*e.g.* organismes, boues de station d'épuration) par un marquage radioactif (Al-Sid-Cheikh et al., 2018) ou par l'incorporation d'un élément métallique interne qui ne devrait pas perturber le comportement de la particule par rapport à une particule plastique « nue » (Mitrano et al., 2019). Toutefois, il est essentiel de vérifier si le vieillissement de ces particules traçables lors de longues expositions ne provoque pas de biais liés à la perte du marquage. L'idéal pour des futures expériences sur les jeunes stades de l'huître (également valable pour toutes les études

écotoxicologiques portant sur les NP) serait d'obtenir des particules mixant ces différents avantages (aucun surfactant, différentes formes, propriétés de surface environnementales et traçabilité) et de confronter les résultats obtenus avec ceux de cette thèse pour prendre en compte la diversité des NP dans l'évaluation des risques.

Par ailleurs, au regard de l'hétérogénéité de débris présents dans l'océan (*e.g.* polymère, forme), l'utilisation des termes « microplastiques » et « nanoplastiques » doit être repensée car les MNP ne représentent pas seulement un unique groupe de contaminants mais abritent un ensemble de contaminants aux propriétés physico-chimiques et toxicologiques différentes (Rochman et al., 2019).

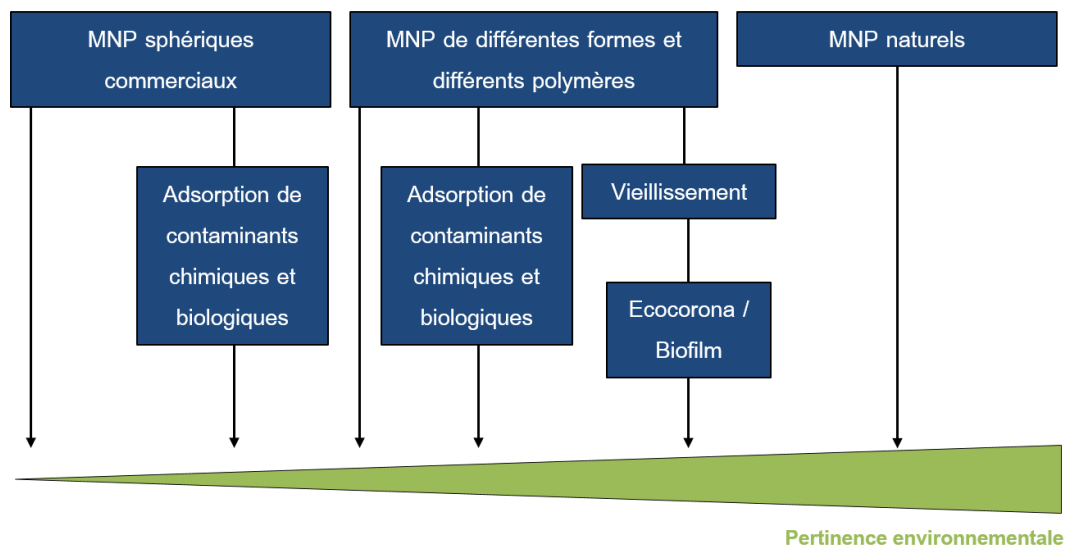


Figure 3. Représentation schématique de la pertinence environnementale des différents types de particules utilisables pour l'écotoxicologie de la thématique plastique.

2.2. Améliorer la démarche expérimentale afin d'approcher les effets à long terme des MNP

Durant cette thèse, j'ai favorisé une approche impliquant des expériences à durée réduite et nécessitant peu de volume d'eau à traiter car aucune méthode n'est disponible pour la récupération des nano-PS dans les eaux expérimentales. Ainsi, nous avons utilisé entre autres le bio-essai embryo-larvaire (AFNOR XP-T-90-382) défini initialement pour évaluer la toxicité de pesticides et différents protocoles permettant d'identifier la sensibilité des gamètes. Cette approche permet de tester une multitude de particules et de concentrations afin de

déterminer des seuils de toxicité aiguë. Du fait de la sensibilité des gamètes mis en évidence dans nos travaux et durant leur exposition à d'autres contaminants (*e.g.* Akcha et al., 2012; Mai et al., 2013a,b; Vignier et al., 2017), il pourrait être intéressant de développer une méthode standardisée spécifique aux gamètes de *C. gigas* qui serait utilisée en complément du test embryon-larvaire dans l'évaluation de la qualité des eaux. Toutefois, cette approche « bio-essai » a des limites. Elle permet d'avoir une information de la toxicité potentielle d'un contaminant mais ne représente qu'une vue superficielle des effets toxiques que celui-ci peut engendrer (Jager, 2011). **L'absence de changements phénotypiques majeurs après une courte exposition ne signifie pas une absence de toxicité et donc un risque négligeable.** En effet, l'exposition embryonnaire à une dose non létale de 50-NH₂ a diminué le taux de croissance larvaire et modulé la réponse larvaire à la génération suivante. De plus, les organismes font face de manière chronique aux contaminants anthropiques dans le milieu naturel. L'exposition continue à des faibles doses peut induire des modifications sur le long terme alors qu'aucune toxicité aiguë n'est remarquée à la même concentration (Panacek et al., 2011; Völker et al., 2013). Par exemple, aucune toxicité aiguë des MP (PVC > 250 µm ; 1% en poids de la ration alimentaire) n'est observée chez le médaka (*Oryzias melastigma*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) alors que des diminutions de la croissance et de la reproduction des individus ont été observées lors de l'exposition chronique de 4,5 mois (Cormier et al., 2019).

Dans cette thèse, j'ai évalué les effets des MNP sur les jeunes stades de l'huître, ce qui permet d'avoir seulement un aperçu de leur dangerosité pour l'espèce. En effet, les bivalves à l'état adulte peuvent également être sensibles aux MNP (*e.g.* Sussarellu et al., 2016; Gardon et al., 2018; Wegner et al., 2012). La prise en compte de l'ensemble du cycle de vie de l'huître est essentielle dans les futures expositions aux MNP car la combinaison des effets sur le stade adulte et les stades pélagiques via leurs expositions chroniques peut influencer la stabilité des populations naturelles comme démontré pour d'autres menaces environnementales (*e.g.* acidification, Parker et al., 2015). Pour aller encore plus loin dans cette réflexion, **l'objectif ultime des études écotoxicologiques doit être de déterminer si un contaminant à des effets non seulement sur l'organisme testé mais aussi sur l'environnement qui l'entoure et la stabilité de l'écosystème dont il fait partie** (Galloway et al., 2017; Paul-Pont et al., 2018). Au travers de sa fonction d'espèce ingénieure, *C. gigas* abrite de fortes communautés benthiques

et régule la productivité de l'écosystème côtier (*e.g.* production primaire, flux de nutriments). L'évaluation *in situ* des effets d'un contaminant est extrêmement difficile en raison de la complexité inhérente de l'environnement marin (*e.g.* large écosystème, variations des paramètres physico-chimiques, présence de divers contaminants) et de l'impossibilité de contenir un contaminant en milieu aquatique tout en maintenant un hydrodynamisme inchangé. L'utilisation de mésocosmes apparaît comme l'approche à favoriser car elle permet de garder un contrôle expérimental tout en apportant une complexité environnementale (Sagarin et al., 2016). Une approche de type mésocosme permet notamment d'étudier les interactions entre les organismes, *i.e.* la dynamique d'une communauté, et donc d'obtenir une vue simplifiée du fonctionnement d'un écosystème sous l'effet d'un contaminant (Sagarin et al., 2016). Sur un banc d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) incluant sa biodiversité associée et disposé en « petits mésocosmes », il a déjà été montré que la perturbation de la filtration d'*O. edulis* sous l'effet de MP (50 jours d'exposition) engendrait une diminution de la diversité des communautés associées au récif (*e.g.* polychètes et oligochètes), de la biomasse des producteurs primaires (*e.g.* cyanobactéries), et du flux de nutriments (*e.g.* ammonium) à l'interface eau/sédiment (Green 2016 ; Green et al., 2017). Ainsi, la réalisation d'une expérience similaire portant sur un récif reconstitué d'huîtres creuses mais à une échelle temporelle plus large pourrait être intéressant afin d'obtenir des informations sur un potentiel effet populationnel (*e.g.* recrutement larvaire), intergénérationnel (*i.e.* modulation de la réponse des individus) et écosystémique via le suivi de la stabilité des communautés associées au récif d'huîtres dans un environnement reconstitué. Au regard du challenge expérimental d'un tel projet, une approche transdisciplinaire doit être utilisée afin de maîtriser à la fois (i) la stabilité des mésocosmes (ii) les caractéristiques des particules (*e.g.* comportement, additifs, contaminants adsorbés) ; (iii) les procédures d'exposition et de vieillissement (*e.g.* distribution des particules, relargage de contaminants chimiques) ; (iv) la compréhension des effets sur la biodiversité et la physiologie des organismes (*e.g.* couplage de mesures moléculaires et physiologiques, modifications phénotypiques, évaluation des effets sur l'écosystème artificiel).

2.3. Les concentrations d'aujourd'hui ne sont pas celles de demain

Le rôle de l'écotoxicologie est de fournir des informations sur la dangerosité d'un contaminant dans l'environnement. L'utilisation de concentrations réalistes doit être un objectif majeur

afin d'apporter des informations précises aux décideurs (Weltje & Sumpter, 2017). Récemment, des critiques à ce sujet ont été publiées du fait de l'utilisation de concentrations numériques en MNP (les concentrations massiques étant souvent dans une gamme réaliste) très largement supérieures aux concentrations reportées pour les fractions supérieures à 330 μm dans l'environnement (Cunningham & Sigwart, 2019; Burton, 2018). Néanmoins, **en l'absence de données sur les concentrations des MNP inférieurs à 10 μm , les études actuelles peuvent être également perçues comme des expériences de toxicologie prospectives afin d'avoir des informations sur une toxicité potentielle pour les organismes.** A défaut de pouvoir se targuer d'être représentatif de l'environnement et dans l'attente de données nouvelles sur les quantités de MNP dans les océans, la réalisation d'expériences en dose-réponse permet à minima d'identifier des seuils au-delà desquels des phénomènes de toxicité sont démontrés. Ce type d'information est crucial (pour les décideurs et la communauté scientifique) au regard des scénarios futurs de contamination des écosystèmes par les MNP. En effet, parce que la demande en plastique va augmenter (Lebreton & Andrady, 2019), la quantité de débris rejetés dans les océans pourrait s'accroître d'un ordre de grandeur d'ici 10 ans (Jambeck et al., 2015). Ainsi, en tenant compte de la fragmentation des déchets plastiques dans l'environnement marin, la concentration en MNP devrait augmenter dans les prochaines décennies malgré la mise en place de lois comme par exemple la directive interdisant les plastiques à usage unique d'ici à 2021 dans l'union européenne, sources de macrodéchets en mer. En effet, une récente étude suggère que les déchets plastiques secondaires (~97% MP océaniques ; Hüffer et al., 2017) présents dans les océans aujourd'hui sont essentiellement issus de la fragmentation des macroplastiques déposés dans l'environnement marin dans les années 90 et les décennies précédentes (Lebreton et al., 2019). En écotoxicologie, un concept d'évaluation des risques est basé sur le rapport entre la concentration environnementale prédite (PEC en anglais) et la plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement (PNEC). Lorsque le rapport PEC/PNEC atteint une valeur supérieure à 1, alors on considère qu'il y a un risque pour l'environnement. Récemment, Backhaus & Wagner (2019) ont calculé un rapport PEC/PNEC de 0,3 pour la période actuelle mais prévoient l'atteinte de la valeur critique (*i.e.* 1) d'ici une vingtaine d'années (Figure 4).

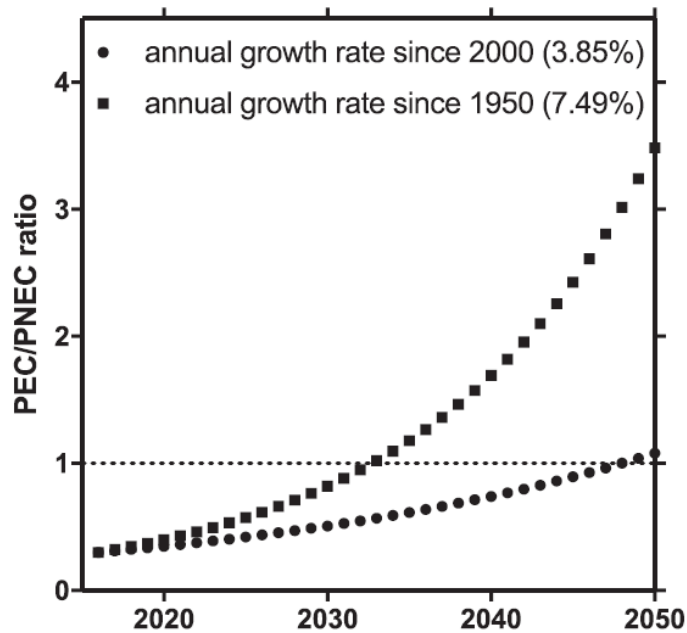


Figure 4. Projections du rapport PEC/PNEC des MNP selon le taux de production des plastiques depuis 1950 ou 2000. D'après Backhaus & Wagner (2019).

Dans notre cas, le risque d'une toxicité par les MNP sur les jeunes stades de l'huître dans l'environnement semble faible d'après nos résultats même si les concentrations environnementales en NP ne sont pas encore déterminées. Bien que la plus faible concentration à laquelle les nano-PS (cas des 50-NH₂) ont induit un effet néfaste (*i.e.* 0,1 µg.mL⁻¹) soit proche d'une concentration environnementale en terme massique (0,08 µg.mL⁻¹ dans les eaux côtières de Corée du Sud ; Song et al., 2014), il y a un facteur 10¹¹ entre le nombre maximal de MP 10-1000 µm quantifiés dans l'environnement marin (16 particules.L⁻¹) et le nombre de particules correspondant à 0,1 µg.mL⁻¹ de nano-PS (*i.e.* 1,47 × 10⁹ particules.mL⁻¹), or le ratio attendu entre MP et NP serait plutôt de l'ordre de 10⁵ (Julien Gigault, Com. Pers.). Ce faible risque est de plus accentué par la faible pertinence environnementale des 50-NH₂ dont les propriétés de surface ont tendance à exacerber la toxicité des particules comme nous l'avons observé durant cette thèse. Toutefois, cette conclusion n'est que préliminaire et appelle à tester les effets de particules plus réalistes grâce aux moyens expérimentaux et analytiques mis en place dans cette thèse et à étudier l'ensemble du cycle de vie de l'huître creuse sur plusieurs générations afin d'avoir un aperçu exhaustif du risque des MNP pour cette espèce.

3) REFLEXION PERSONNELLE

Dans les médias, la thématique plastique est omniprésente pour des raisons très simples qui ne font pas intervenir des faits scientifiques : les déchets plastiques sont visibles, palpables et les images de cette contamination océanique sont particulièrement percutantes. Le résultat de ces images amène à la perception d'un risque élevé pour les sociétés humaines. Pour valider cette perception, le rôle des scientifiques est d'apporter le plus de preuves tangibles sur leur (omni)présence dans l'océan et leur toxicité. Néanmoins aujourd'hui est-ce que les scientifiques sont capables d'affirmer ce risque ? Non. Est-on capable de l'infirmer ? Non plus. Il y a encore bien trop d'inconnus (*e.g.* distribution dans la colonne d'eau, taille et nombre des débris, quantité de polluants associés, intensité du relargage d'additifs, influence des espèces microbiennes) pour pouvoir tirer des conclusions sur le risque posé par cette contamination ubiquitaire qui ne cesse de s'accroître au fil des années en raison de notre mode de vie axé sur la consommation et donc l'utilisation de plastiques. Toutefois, je me suis posé une question durant mon travail de thèse : Doit-on attendre que les scientifiques démontrent un risque avéré d'un contaminant sur les écosystèmes et/ou la santé humaine pour limiter son utilisation ou l'interdire totalement ? Le cas des plastiques est parfaitement adapté à cette question car l'interdiction des plastiques à usage unique (*e.g.* coton tiges, couverts, pailles) dans l'union européenne d'ici 2021 et la déclaration de Brune Poirson (Secrétaire d'État auprès du ministre de la Transition écologique et solidaire) le 7 juillet 2019 « Nous déclarons la guerre aux plastiques » semblent indiquer le contraire. Ces interdictions représentent simplement du bon sens, le plastique est fantastique à bien des égards (*e.g.* domaine médical, ingénierie) mais le recyclage de seulement 9% des déchets plastiques produits dans le monde entre 1950 et 2015 est à mon sens suffisant pour réduire l'ampleur du problème. A-t-on besoin, ou est-ce utile ou futile, d'avoir dans un paquet de 20 madeleines, 20 petits sachets plastiques individuels par exemple ? Il est de notre devoir de modifier notre consommation, de réduire notre utilisation de plastiques et enfin d'améliorer la gestion de la fin de vie de nos déchets afin de soutenir la création d'une économie circulaire efficace. Ces éléments de réflexion m'apparaissent essentiels afin de préserver notre environnement de nos déchets et de pouvoir maintenir ses services pour les générations actuelles et futures.

BILAN DE LA THESE

Publications (4)

Tallec, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A., & Paul-Pont, I. (2019). Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere*, 225, 639-646.

Paul-Pont, I., **Tallec, K.**, Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J-L., Brotons, G., Largarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., & Huvet, A (2018). Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Frontiers in Marine Science*, 5(252).

Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goïc, N., Berchel, M., Soudant, P., & Paul-Pont, I. (2018). Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environmental pollution*, 242, 1226-1235.

González-Fernández, C., **Tallec, K.**, Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Suquet, M., Berchel, M., & Paul-Pont, I. (2018). Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles. *Chemosphere*, 208, 764-772.

En préparation (3)

Tallec, K., Paul-Pont, I., Boulais, M., Le Goïc, N., González-Fernández, C., Bideau, A., Quéré, C., Cassone, A-L., Lambert, C., Soudant, P., & Huvet, A. Nanopolystyrene beads affect motility and reproductive efficiency of oyster's spermatozoa (*Crassostrea gigas*).

Tallec, K., Paul-Pont, I., Petton, B., Alunno-Bruscia, M., Bourdon, C., Bernardini, I., Boulais, M., Lambert, C., Quéré, C., Bideau, A., Le Goïc, N., Cassone, A-L., Le Grand, F., Fabioux, F., Soudant, P., & Huvet, A. Embryonic exposures to amino-nanopolystyrene over two generations of Pacific oyster affect larval but not adult performances.

Boulais, M., **Tallec, K.**, Paul-Pont, I., Cassone, A-L., Bideau, A., Le Grand, F., & Huvet., A. Effects of nanopolystyrene beads on oocytes of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*).

Publications annexes à la thèse (2)

Long, M., **Tallec, K.**, Soudant, P., Lambert, C., Le Grand, F., Sarthou, G., Jolley, D.F., & Hégaret, H. (2018). A rapid quantitative fluorescence-based bioassay to study allelochemical interactions from *Alexandrium minutum*. *Environmental pollution*, 242, 1598-1605.

Long, M., **Tallec, K.**, Soudant, P., Le Grand, F., Donval, A., Lambert, C., Sarthou, G., Jolley, D.F., & Hégaret, H. (2018). Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. *Algal research*, 35, 508-518.

Présentations orales à des conférences internationales (3)

Tallec, K., Paul-Pont, I., Boulais, M., Fabioux, C., Soudant, P., & Huvet, A. Nanoplastic exposures to gametes and embryos affect oyster larval development. MICRO 2018 Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, Lanzarote, Spain, Nov 2018.

Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., & Paul-Pont, I. Nanoplastics but not microplastic affect oyster free-living stages, gametes and embryos. 6th Marine Debris, San Diego, USA, Mar 2018.

Tallec, K., González-Fernández, C., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., & Paul-Pont, I. Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. International Conference on Microplastic pollution in the Mediterranean Sea, Capri, Italia, Sep 2017.

Enseignements

64 heures de TP/TD durant l'année universitaire 2017/2018 dans les unités d'enseignement suivantes :

- Biologie des Populations
- Biologie Animale
- Ecologie Générale
- Analyse Fonctionnelle du Génome

Sciences et Sociétés

- Pint of Sciences « Submersion dans les plastiques », Brest, 15 janvier 2017.
- Nuit des chercheurs, Océanopolis, Brest, 27 septembre 2019.
- Fête de la Science, Brest, 12-14 octobre 2018.

REFERENCES

- A -

- Aguirre-Rubí, J. R., Ortiz-zarragoitia, M., Izagirre, U., Etxebarria, N., Espinoza, F., and Marigómez, I. (2019). Prospective biomonitor and sentinel bivalve species for pollution monitoring and ecosystem health disturbance assessment in mangrove – lined Nicaraguan coasts. *Sci. Total Environ.* 649, 186–200. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.269.
- Akcha, F., Spagnol, C., and Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018.
- Al-Sid-Cheikh, M., Rowland, S. J., Stevenson, K., Rouleau, C., Henry, T. B., and Thompson, R. C. (2018). Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 52, 14480–14486. doi:10.1021/acs.est.8b05266.
- Alavi, S. M. H., Matsumura, N., Shiba, K., Itoh, N., Takahashi, K. G., Inaba, K., et al. (2014). Roles of extracellular ions and pH in 5-HT-induced sperm motility in marine bivalve. *Reproduction* 147, 331–345. doi:10.1530/REP-13-0418.
- Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M., and Tufenkji, N. (2018). Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environ. Sci. Technol.* 52, 1704–1724. doi:10.1021/acs.est.7b05559.
- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Durántez Jiménez, P., Simonneau, A., et al. (2019). Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nat. Geosci.* doi:10.1038/s41561-019-0335-5.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Andrady, A. L. (2015). “Persistence of Plastic Litter in the Oceans,” in *Marine Anthropogenic Litter* (Cham: Springer International Publishing), 57–72. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_3.
- Anguissola, S., Garry, D., Salvati, A., O’Brien, P. J., and Dawson, K. A. (2014). High content analysis provides mechanistic insights on the pathways of toxicity induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0108025.
- Antonelis, K., Huppert, D., Velasquez, D., and June, J. (2011). Dungeness Crab Mortality Due to Lost Traps and a Cost–Benefit Analysis of Trap Removal in Washington State Waters of the Salish Sea. *North Am. J. Fish. Manag.* 31, 880–893. doi:10.1080/02755947.2011.590113.
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., et al. (2017). Insights from the shell proteome: Biomineralization to adaptation. *Mol. Biol. Evol.* 34, 66–77. doi:10.1093/molbev/msw219.
- Arthur, C., Baker, J., and Bamford, H. (2009). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. *NOAA Tech. Memo.* Sept 9-11, 49.
- Ašmonaitė, G., Sundh, H., Asker, N., and Carney Almroth, B. M. (2018). Rainbow trout maintain intestinal transport and barrier functions following exposure to polystyrene microplastics. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.8b04848. doi:10.1021/acs.est.8b04848.
- Auby, I., and Maurer, D. (2004). Study of the reproduction of oysters in the Arcachon Basin. Ifremer Report, R.INT.DEL/AR 04-05. 203p. 203. Available at: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00040/15145/>.

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., D'Errico, G., et al. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ. Pollut.* 198, 211–222. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.021.

Avio, C. G., Gorbi, S., and Regoli, F. (2016). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.012.

- B -

Baalousha, M. (2009). Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* 407, 2093–2101. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.022.

Baalousha, M., Manciuola, A., Cumberland, S., Kendall, K., and Lead, J. R. (2008). Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1875. doi:10.1897/07-559.1.

Backhaus, T., and Wagner, M. (2018). Microplastics in the environment: Much ado about nothing? A debate. *PeerJ Prepr.* 6, e26507v6. doi:10.7287/peerj.preprints.26507v6.

Badawy, A. M. El, Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., and Tolaymat, T. M. (2010). Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260–1266. doi:10.1021/es902240k.

Balakrishnan, G., Déniel, M., Nicolai, T., Chassenieux, C., and Lagarde, F. (2019). Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. *Environ. Sci. Nano* 6, 315–324. doi:10.1039/C8EN01005F.

Balbi, T., Camisassi, G., Montagna, M., Fabbri, R., Franzellitti, S., Carbone, C., et al. (2017). Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation. *Chemosphere* 186, 1–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.120.

Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J., and Stolnik, S. (2014). Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol. Pharm.* 11, 4363–4373. doi:10.1021/mp500439c.

Barnes, D. K. a, Galgani, F., Thompson, R. C., and Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1985–1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205.

Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chícharo, L., and Matias, D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014.

Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., and Braunbeck, T. (2016). Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1656–1666. doi:10.1002/etc.3361.

Baudrimont, M., Arini, A., Guégan, C., Venel, Z., Gigault, J., Pedrono, B., et al. (2019). Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-019-04668-3.

- Bayne, B. (2017). *Biology of Oysters*. Academic P.
- Bayne, B. L., Ahrens, M., Allen, S. K., D'auriac, M. A., Backeljau, T., Beninger, P., et al. (2017). The Proposed Dropping of the Genus *Crassostrea* for All Pacific Cupped Oysters and Its Replacement by a New Genus Magallana: A Dissenting View. *J. Shellfish Res.* 36, 545–547. doi:10.2983/035.036.0301.
- Bayne, B. L., Hawkins, A. J. S., and Navarro, E. (1987). Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 111, 1–22. doi:10.1016/0022-0981(87)90017-7.
- Beaumont, N. J., Aanesen, M., Austen, M. C., Börger, T., Clark, J. R., Cole, M., et al. (2019). Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 189–195. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.022.
- Beck, M. W., Brumbaugh, R. D., Airoidi, L., Carranza, A., Coen, L. D., Crawford, C., et al. (2011). Oyster Reefs at Risk and Recommendations for Conservation, Restoration, and Management. *Bioscience* 61, 107–116. doi:10.1525/bio.2011.61.2.5.
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., and Akcha, F. (2016). Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: Implication of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.* 175, 249–259. doi:10.1016/j.aquatox.2016.04.003.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., et al. (2018). Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *J. Hazard. Mater.* 360, 452–460. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.101.
- Bejgarn, S., MacLeod, M., Bogdal, C., and Breitholtz, M. (2015). Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere* 132, 114–119. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.010.
- Bennetts, L. E., and Aitken, R. J. (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 77–87. doi:10.1002/mrd.20285.
- Bergami, E., Bocci, E., Luisa, M., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K. A., et al. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123, 18–25. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.021.
- Bergmann, M., Mützel, S., Primpke, S., Tekman, M. B., Trachsel, J., and Gerdts, G. (2019). White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. *Sci. Adv.* 5, eaax1157. doi:10.1126/sciadv.aax1157.
- Bergmann, M., Wirzberger, V., Krumpfen, T., Lorenz, C., Primpke, S., Tekman, M. B., et al. (2017). High Quantities of Microplastic in Arctic Deep-Sea Sediments from the HAUSGARTEN Observatory. *Environ. Sci. Technol.* 51, 11000–11010. doi:10.1021/acs.est.7b03331.
- Bernard, I. (2011). Écologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage. Available at: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00688131>.
- Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu, M. (2000). Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2, 136–145. doi:10.1007/s101269900017.
- Besseling, E., Quik, J. T. K., Sun, M., and Koelmans, A. A. (2017). Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environ. Pollut.* 220, 540–548.

doi:10.1016/j.envpol.2016.10.001.

- Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., and Koelmans, A. A. (2014). Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12336–12343. doi:10.1021/es503001d.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J., and Koelmans, A. A. (2013). Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 47, 593–600. doi:10.1021/es302763x.
- Bexiga, M. G., Varela, J. a., Wang, F., Fenaroli, F., Salvati, A., Lynch, I., et al. (2011). Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicology* 5, 557–567. doi:10.3109/17435390.2010.539713.
- Bhandari, R. K., vom Saal, F. S., and Tillitt, D. E. (2015). Transgenerational effects from early developmental exposures to bisphenol A or 17 α -ethinylestradiol in medaka, *Oryzias latipes*. *Sci. Rep.* 5, 9303. doi:10.1038/srep09303.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., and Ke, P. C. (2010). Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *J. Phys. Chem. C* 114, 16556–16561. doi:10.1021/jp1054759.
- Bittner, G. D., Denison, M. S., Yang, C. Z., Stoner, M. A., and He, G. (2014). Chemicals having estrogenic activity can be released from some bisphenol a-free, hard and clear, thermoplastic resins. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 13, 1–18. doi:10.1186/1476-069X-13-103.
- Bochenek, E., Klinck, J., Powell, E. ., and Hofmann, E. . (2001). A biochemically based model of the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae. *J. Shellfish Res.* 20, 243–265.
- Boulais, M., Corporeau, C., Huvet, A., Bernard, I., Quere, C., Quillien, V., et al. (2015b). Assessment of oocyte and trochophore quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 437, 201–207. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.025.
- Boulais, M., Soudant, P., Le Goïc, N., Quéré, C., Boudry, P., and Suquet, M. (2015a). Involvement of Mitochondrial Activity and OXPHOS in ATP Synthesis During the Motility Phase of Spermatozoa in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Biol. Reprod.* 93, 1–7. doi:10.1095/biolreprod.115.128538.
- Boulais, M., Suquet, M., Arsenault-Pernet, E. J., Malo, F., Queau, I., Pignet, P., et al. (2018). pH controls spermatozoa motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biol. Open* 7, bio031427. doi:10.1242/bio.031427.
- Bouwmeester, H., Hollman, P. C. H., and Peters, R. J. B. (2015). Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8932–8947. doi:10.1021/acs.est.5b01090.
- Brandon, J. A., Jones, W., and Ohman, M. D. (2019). Multidecadal increase in plastic particles in coastal ocean sediments. *Sci. Adv.* 5, eaax0587. doi:10.1126/sciadv.aax0587.
- Brennecke, D., Ferreira, E. C., Costa, T. M. M., Appel, D., da Gama, B. A. P., and Lenz, M. (2015). Ingested microplastics (>100 μ m) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 491–495. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.05.001.
- Brignac, K. C., Jung, M. R., King, C., Royer, S.-J., Blickley, L., Lamson, M. R., et al. (2019). Marine Debris Polymers on Main Hawaiian Island Beaches, Sea Surface, and Seafloor. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.9b03561. doi:10.1021/acs.est.9b03561.

- Brooks, A. L., Wang, S., and Jambeck, J. R. (2018). The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Sci. Adv.* 4, 1–8. doi:10.1126/sciadv.aat0131.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., et al. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9175–9179. doi:10.1021/es201811s.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., and Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031. doi:10.1021/es800249a.
- Brun, N. R., Beenakker, M. M. T., Hunting, E. R., Ebert, D., and Vijver, M. G. (2017). Brood pouch-mediated polystyrene nanoparticle uptake during *Daphnia magna* embryogenesis. *Nanotoxicology* 11, 1059–1069. doi:10.1080/17435390.2017.1391344.
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., and Gouletquer, P. (2009). History, Status, and Future of Oyster Culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820. doi:10.2983/035.028.0410.
- Burton, G. A. (2017). Stressor Exposures Determine Risk: So, Why Do Fellow Scientists Continue to Focus on Superficial Microplastics Risk? *Environ. Sci. Technol.* 51, 13515–13516. doi:10.1021/acs.est.7b05463.
- Burton, T., and Metcalfe, N. B. (2014). Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. doi:10.1098/rspb.2014.0311.

- C -

- Cai, L., Hu, L., Shi, H., Ye, J., Zhang, Y., and Kim, H. (2018). Effects of inorganic ions and natural organic matter on the aggregation of nanoplastics. *Chemosphere* 197, 142–151. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.052.
- Cai, L., Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Zhan, Z., Tan, X., et al. (2017). Characteristic of microplastics in the atmospheric fallout from Dongguan city, China: preliminary research and first evidence. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24928–24935. doi:10.1007/s11356-017-0116-x.
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., et al. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* 111, 34–40. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.008.
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., et al. (2016). Interactions of cationic polystyrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: Role of soluble hemolymph proteins. *Environ. Res.* 150, 73–81. doi:10.1016/j.envres.2016.05.045.
- Canesi, L., and Corsi, I. (2016). Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 565, 933–940. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.085.
- Capolupo, M., Franzellitti, S., Valbonesi, P., Lanzas, C. S., and Fabbri, E. (2018). Uptake and transcriptional effects of polystyrene microplastics in larval stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Pollut.* 241, 1038–1047. doi:10.1016/j.envpol.2018.06.035.
- Carlton, J. T., Chapman, J. W., Geller, J. B., Miller, J. A., Carlton, D. A., McCuller, M. I., et al. (2017). Tsunami-driven rafting: Transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. *Science (80-.)*. 357, 1402–1406. doi:10.1126/science.aao1498.
- Carpenter, E. J., and Smith, K. L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science (80-.)*. 175, 1240–

1241. doi:10.1126/science.175.4027.1240.
- Carr, S. A., Liu, J., and Tesoro, A. G. (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res.* 91, 174–182. doi:10.1016/j.watres.2016.01.002.
- Carson, H. S., Colbert, S. L., Kaylor, M. J., and McDermid, K. J. (2011). Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1708–1713. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.032.
- Castillo, A. B., Al-Maslamani, I., and Obbard, J. P. (2016). Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. *Mar. Pollut. Bull.* 111, 260–267. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.06.108.
- Catarino, A. I., Frutos, A., and Henry, T. B. (2019). Use of fluorescent-labelled nanoplastics (NPs) to demonstrate NP absorption is inconclusive without adequate controls. *Sci. Total Environ.* 670, 915–920. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.194.
- Cauwenberghe, L. Van, Claessens, M., Vandegheuchte, M. B., and Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10–17. doi:10.1016/j.envpol.2015.01.008.
- Cedervall, T., Hansson, L.-A., Lard, M., Frohm, B., and Linse, S. (2012). Food Chain Transport of Nanoparticles Affects Behaviour and Fat Metabolism in Fish. *PLoS One* 7, e32254. doi:10.1371/journal.pone.0032254.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamizeza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J., et al. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115–130. doi:10.1016/S0044-8486(01)00898-5.
- Chekli, L., Phuntsho, S., Roy, M., Lombi, E., Donner, E., and Shon, H. K. (2013). Assessing the aggregation behaviour of iron oxide nanoparticles under relevant environmental conditions using a multi-method approach. *Water Res.* 47, 4585–4599. doi:10.1016/j.watres.2013.04.029.
- Chen, C. S., Le, C., Chiu, M. H., and Chin, W. C. (2018a). The impact of nanoplastics on marine dissolved organic matter assembly. *Sci. Total Environ.* 634, 316–320. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.269.
- Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., et al. (2017). Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.156.
- Chen, Q., Reisser, J., Cunsolo, S., Kwadijk, C., Kotterman, M., Proietti, M., et al. (2018). Pollutants in Plastics within the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* 52, 446–456. doi:10.1021/acs.est.7b04682.
- Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., and Xia, Y. (2009). Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I₂/KI etchant. *Nano Lett.* 9, 1080–1084. doi:10.1021/nl803487r.
- Christian, P., Von Der Kammer, F., Baalousha, M., and Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* 17, 326–343. doi:10.1007/s10646-008-0213-1.
- Claessens, M., Meester, S. De, Landuyt, L. Van, Clerck, K. De, and Janssen, C. R. (2011). Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2199–2204. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.030.
- Cole, M. (2016). A novel method for preparing microplastic fibers. *Sci. Rep.* 6, 34519. doi:10.1038/srep34519.

- Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P. K., Altin, D., Reed, S., Pond, D. W., et al. (2019). Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environ. Sci. Technol.* 53, 7075–7082. doi:10.1021/acs.est.9b01853.
- Cole, M., and Galloway, T. S. (2015). Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14625–14632. doi:10.1021/acs.est.5b04099.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2015a). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1130–1137. doi:10.1021/es504525u.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., et al. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6646–6655. doi:10.1021/es400663f.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., et al. (2016). Microplastics Alter the Properties and Sinking Rates of Zooplankton Faecal Pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3239–3246. doi:10.1021/acs.est.5b05905.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2015b). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci. Rep.* 4, 4528. doi:10.1038/srep04528.
- Collignon, A., Hecq, J., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., and Goffart, A. (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 861–864. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.011.
- Conover, R. J. (1966). Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 11, 338–345. doi:10.4319/lo.1966.11.3.0338.
- Coon, S. L., Walch, M., Fitt, W. K., Weiner, R. M., and Bonar, D. B. (1990). Ammonia Induces Settlement Behavior in Oyster Larvae. *Biol. Bull.* 179, 297–303. doi:10.2307/1542321.
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queiros, A. M., and Lindeque, P. K. (2019). Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Sci. Total Environ.* 687, 780–789. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.009.
- Cormier, B., Le Bihannic, F., Joassard, L., Keiter, S. H., Cachot, J., Bégout, M-L., and Cousin, X. (2019). Conséquences physiologiques d'une exposition chronique de poissons à des microplastiques vierges ou contaminés. *Premières rencontres nationales du GDR Polymères et Océans, 24 - 26 juin 2019*.
- Costa, M. F., Ivar do Sul, J. A., Silva-Cavalcanti, J. S., Araújo, M. C. B., Spengler, Â., and Tourinho, P. S. (2010). On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environ. Monit. Assess.* 168, 299–304. doi:10.1007/s10661-009-1113-4.
- Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S. F., and Narayanaswamy, B. E. (2017). Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Anal. Methods* 9, 1437–1445. doi:10.1039/C6AY02343F.
- Cózar, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernandez-Leon, S., et al. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10239–10244. doi:10.1073/pnas.1314705111.
- Cózar, A., Martí, E., Duarte, C. M., García-de-Lomas, J., van Sebille, E., Ballatore, T. J., et al. (2017). The

Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation. *Sci. Adv.* 3, e1600582. doi:10.1126/sciadv.1600582.

Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J. I., Ubeda, B., Á.gálvez, J., et al. (2015). Plastic accumulation in the mediterranean sea. *PLoS One* 10, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0121762.

Cui, R., Kim, S. W., and An, Y.-J. (2017). Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. *Sci. Rep.* 7, 12095. doi:10.1038/s41598-017-12299-2.

Cunningham, E. M., and Sigwart, J. D. (2019). Environmentally Accurate Microplastic Levels and Their Absence from Exposure Studies. *Integr. Comp. Biol.*, 1–12. doi:10.1093/icb/icz068.

- D -

Da Costa, F., Petton, B., Mingant, C., Bougaran, G., Rouxel, C., Quéré, C., et al. (2016). Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquac. Nutr.* 22, 813–836. doi:10.1111/anu.12301.

da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., and Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Sci. Total Environ.* 566–567, 15–26. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.041.

Davarpanah, E., and Guilhermino, L. (2015). Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023.

Davidson, K., and Dudas, S. E. (2016). Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 147–156. doi:10.1007/s00244-016-0286-4.

Dawson, A. L., Kawaguchi, S., King, C. K., Townsend, K. A., King, R., Huston, W. M., et al. (2018). Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nat. Commun.* 9, 1001. doi:10.1038/s41467-018-03465-9.

de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., and Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Glob. Chang. Biol.* 24, 1405–1416. doi:10.1111/gcb.14020.

De Souza Machado, A. A. S., Lau, C. W., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R., et al. (2018). Impacts of microplastics on the soil biophysical environment. *Environ. Sci. Technol.* 52, 9656–9665. doi:10.1021/acs.est.8b02212.

De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015). Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9629–9638. doi:10.1021/acs.est.5b01093.

De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Cattrijsse, A., et al. (2017). Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7350–7360. doi:10.1021/acs.est.7b00697.

Dehaut, A., Cassone, A. L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., et al. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 215, 223–233. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.018.

- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., et al. (2014). Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12302–12311. doi:10.1021/es502569w.
- Demoy-Schneider, M., Schmitt, N., Suquet, M., Le Pennec, M., and Cosson, J. (2013). *Biological characteristics of sperm in two oyster species: the Pacific oyster, Crassostrea gigas, and the black-lip pearl oyster, Pinctada margaritifera*. In *“Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal abnormalities.”*, ed. B. Erickson Nova Science Publishers Inc.
- Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842–852. doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5.
- Desforges, J. P. W., Galbraith, M., and Ross, P. S. (2015). Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 320–330. doi:10.1007/s00244-015-0172-5.
- Desforges, J. W., Galbraith, M., Dangerfield, N., and Ross, P. S. (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 94–99. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.12.035.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M. P., Lebel, J. M., and Costil, K. (2014). Toxicity of five antidepressant drugs on embryo–larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y.
- Dong, Q., Huang, C., and Tiersch, T. R. (2005). Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters. *Aquaculture* 249, 487–496. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.009.
- Doyle, M. J., Watson, W., Bowlin, N. M., and Sheavly, S. B. (2011). Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. *Mar. Environ. Res.* 71, 41–52. doi:10.1016/j.marenvres.2010.10.001.
- Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., and Tassin, B. (2015). Microplastic contamination in an urban area: A case study in Greater Paris. *Environ. Chem.* 12, 592–599. doi:10.1071/EN14167.
- Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., and Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Mar. Pollut. Bull.* 104, 290–293. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.006.
- Dubaish, F., and Liebezeit, G. (2013). Suspended Microplastics and Black Carbon Particles in the Jade System, Southern North Sea. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1352. doi:10.1007/s11270-012-1352-9.
- Dubey, M. K., Bijwe, J., and Ramakumar, S. S. V. (2016). Effect of dispersant on nano-PTFE based lubricants on tribo-performance in fretting wear mode. *RSC Adv.* 6, 22604–22614. doi:10.1039/C5RA16795G.
- Dubey, M. K., Bijwe, J., and Ramakumar, S. S. V. (2015). Nano-PTFE: New entrant as a very promising EP additive. *Tribol. Int.* 87, 121–131. doi:10.1016/j.triboint.2015.01.026.
- Duis, K., and Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* 28, 2. doi:10.1186/s12302-015-0069-y.
- Duncan, E., Broderick, A., Fuller, W., Galloway, T., Godfrey, M., Hamann, M., et al. (2018). Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles. *Glob. Chang. Biol.*, 1–9. doi:10.1111/gcb.14519.
- Dutertre, M., Beninger, P. G., Barillé, L., Papin, M., Rosa, P., Barillé, A., et al. (2009). Temperature and

seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquat. Living Resour.* 22, 319–329. doi:10.1051/alr/2009042.

- E -

- Edgington, A. J., Roberts, A. P., Taylor, L. M., Alloy, M. M., Reppert, J., Rao, A. M., et al. (2010). The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2511–2518. doi:10.1002/etc.309.
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., and Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res.* 75, 63–82. doi:10.1016/j.watres.2015.02.012.
- Ekvall, M. T., Lundqvist, M., Kelpsiene, E., Šileikis, E., Gunnarsson, S. B., and Cedervall, T. (2019). Nanoplastics formed during the mechanical breakdown of daily-use polystyrene products. *Nanoscale Adv.* doi:10.1039/C8NA00210J.
- Ellis, L. A., Baalousha, M., Valsami-Jones, E., and Lead, J. R. (2018). Seasonal variability of natural water chemistry affects the fate and behaviour of silver nanoparticles. *Chemosphere* 191, 616–625. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.006.
- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., and Nielsen, T. G. (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 100, 70–81. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.09.027.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., and Le Pennec, M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17, 491–506. doi:10.1007/s10499-008-9219-1.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., et al. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One* 9, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0111913.
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., et al. (2013). Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 68, 71–76. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.12.021.
- Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., and Christie-Oleza, J. A. (2017). Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μm) in Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13641–13648. doi:10.1021/acs.est.7b04512.
- Esiukova, E. (2017). Plastic pollution on the Baltic beaches of Kaliningrad region, Russia. *Mar. Pollut. Bull.* 114, 1072–1080. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.001.
- Evans, J. P., Garcia-Gonzalez, F., Almbro, M., Robinson, O., and Fitzpatrick, J. L. (2012). Assessing the potential for egg chemoattractants to mediate sexual selection in a broadcast spawning marine invertebrate. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 2855–2861. doi:10.1098/rspb.2012.0181.
- Evans, J. P., and Sherman, C. D. H. (2013). Sexual Selection and the Evolution of Egg-Sperm Interactions in Broadcast-Spawning Invertebrates. *Biol. Bull.* 224, 166–183. doi:10.1086/BBLv224n3p166.

- F -

- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F., and Canesi, L. (2014). Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 99, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2014.05.007.
- Fabioux, C. (2004). Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., and Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.038.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., et al. (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592–598. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.009.
- Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, J. C., and Lead, J. R. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: Effect of pH, concentration, and organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7285–7290. doi:10.1021/es803259g.
- Fadare, O. O., Wan, B., Guo, L.-H., Xin, Y., Qin, W., and Yang, Y. (2019). Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Nano.* doi:10.1039/C8EN01457D.
- Farrell, P., and Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ. Pollut.* 177, 1–3. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.046.
- Feil, R., and Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 97–109. doi:10.1038/nrg3142.
- Fendall, L. S., and Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1225–1228. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.025.
- Feng, L., Li, J.-W., Xu, E. G., Sun, X.-D., Zhu, F.-P., Ding, Z.-J., et al. (2019). Short-term exposure to positively charged polystyrene nanoparticles causes oxidative stress and membrane destruction in cyanobacteria. *Environ. Sci. Nano.* doi:10.1039/C9EN00807A.
- Fitzpatrick, J. L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., and Wood, C. M. (2008). The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–449. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012.
- Flores, K. B., Wolschin, F., and Amdam, G. V. (2013). The role of methylation of DNA in environmental adaptation. *Integr. Comp. Biol.* 53, 359–372. doi:10.1093/icb/ict019.
- Foekema, E. M., De Gruijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., and Koelmans, A. A. (2013). Plastic in North Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8818–8824. doi:10.1021/es400931b.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fossi, M. C., Coppola, D., Bainsi, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., et al. (2014). Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar. Environ. Res.* 100, 17–24. doi:10.1016/j.marenvres.2014.02.002.
- Fossi, M. C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., et al. (2012). Are baleen

- whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2374–2379. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.013.
- Fotopoulou, K. N., and Karapanagioti, H. K. (2012). Surface properties of beached plastic pellets. *Mar. Environ. Res.* 81, 70–77. doi:10.1016/j.marenvres.2012.08.010.
- Foulon, V., Artigaud, S., Buscaglia, M., Bernay, B., Fabioux, C., Petton, B., et al. (2018). Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae. *Sci. Rep.* 8, 15298. doi:10.1038/s41598-018-33720-4.
- Foulon, V., Le Roux, F., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., and Paul-Pont, I. (2016). Colonization of Polystyrene Microparticles by *Vibrio crassostreae* : Light and Electron Microscopic Investigation. *Environ. Sci. Technol.* 50, 10988–10996. doi:10.1021/acs.est.6b02720.
- French, R. A., Jacobson, A. R., Kim, B., Isley, S. L., Penn, R. L., and Baveye, P. C. (2009). Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1354–1359. doi:10.1021/es802628n.
- Frère, L., Maignien, L., Chalopin, M., Huvet, A., Rinnert, E., Morrison, H., et al. (2018). Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. *Environ. Pollut.* 242, 614–625. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.023.
- Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, J., Bihannic, I., et al. (2017). Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: A case study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environ. Pollut.* 225, 211–222. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.023.
- Fröhlich, E. (2013). Cellular Targets and Mechanisms in the Cytotoxic Action of Non-biodegradable Engineered Nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* 14, 976–988. doi:10.2174/1389200211314090004.
- Frydkjær, C. K., Iversen, N., and Roslev, P. (2017). Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 655–661. doi:10.1007/s00128-017-2186-3.
- Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P. C., and Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J. food drug Anal.* 22, 64–75. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.005.

- G -

- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., and De Vrees, L. (2013). Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. *ICES J. Mar. Sci.* 70, 1055–1064. doi:10.1093/icesjms/fst122.
- Gall, S. C., and Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 170–179. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.041.
- Gallo, A., Boni, R., Buttino, I., and Tosti, E. (2016). Spermiotoxicity of nickel nanoparticles in the marine invertebrate *Ciona intestinalis* (ascidians). *Nanotoxicology* 5390, 1–9. doi:10.1080/17435390.2016.1177743.
- Gallo, A., Manfra, L., Boni, R., Rotini, A., Migliore, L., and Tosti, E. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress. *Environ. Int.* 118, 325–333. doi:10.1016/j.envint.2018.05.034.
- Galloway, T. S., Cole, M., and Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 0116. doi:10.1038/s41559-017-0116.

- Galloway, T. S., and Lewis, C. N. (2016). Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2331–2333. doi:10.1073/pnas.1600715113.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P. Y., et al. (2016). Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002.
- Gambardella, C., Ferrando, S., Morgana, S., Gallus, L., Ramoino, P., Ravera, S., et al. (2015). Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal biomineralization processes and larval plasticity. *Aquat. Toxicol.* 158, 181–191. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.014.
- Gardon, T., Reisser, C., Soyey, C., Quillien, V., and Le Moullac, G. (2018). Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.8b00168. doi:10.1021/acs.est.8b00168.
- Garner, D. L., and Johnson, L. A. (1995). Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276–284. doi:10.1095/biolreprod53.2.276.
- Gasperi, J., Wright, S. L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., et al. (2018). Microplastics in air: Are we breathing it in? *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 1, 1–5. doi:10.1016/j.coesh.2017.10.002.
- Geffard, O., Budzinski, H., Augagneur, S., Seaman, M. N. L., and His, E. (2001). Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1605–1611. doi:10.1002/etc.5620200727.
- GESAMP (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment". *Reports Stud. GESAMP* 90, 96. doi:10.13140/RG.2.1.3803.7925.
- Gewert, B., Plassmann, M. M., and MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 1513–1521. doi:10.1039/C5EM00207A.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., and Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782.
- Gigault, J., El Hadri, H., Reynaud, S., Deniau, E., and Grassl, B. (2017). Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 6761–6769. doi:10.1007/s00216-017-0629-7.
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., and Ter Halle, A. (2016). Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci. Nano* 3, 346–350. doi:10.1039/C6EN00008H.
- Gigault, J., Ter Halle, A., Baudrimont, M., Pascal, P., Gauffre, F., Phi, T.-L., et al. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.024.
- Gili, J. M. M., and Coma, R. (1998). Benthic suspension feeders in marine food webs. *Tree* 13, 316–321.
- Gillibert, R., Balakrishnan, G., Deshoules, Q., Tardivel, M., Magazzù, A., Donato, M. G., et al. (2019). Raman Tweezers for Small Microplastics and Nanoplastics Identification in Seawater. *Environ. Sci. Technol.* 53, 9003–9013. doi:10.1021/acs.est.9b03105.
- Goldstein, M. C., Rosenberg, M., and Cheng, L. (2012). Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. *Biol. Lett.* 8, 817–820. doi:10.1098/rsbl.2012.0298.

- González-Fernández, C., Tallec, K., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., et al. (2018). Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles. *Chemosphere* 208, 764–772. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.039.
- González-Fernández, C., Toullec, J., Lambert, C., Le Goïc, N., Seoane, M., Moriceau, B., et al. (2019). Do transparent exopolymeric particles (TEP) affect the toxicity of nanoplastics on *Chaetoceros neogracile*? *Environ. Pollut.* 250, 873–882. doi:10.1016/j.envpol.2019.04.093.
- Grabowski, J. H., Brumbaugh, R. D., Conrad, R. F., Keeler, A. G., Opaluch, J. J., Peterson, C. H., et al. (2012). Economic Valuation of Ecosystem Services Provided by Oyster Reefs. *Bioscience* 62, 900–909. doi:10.1525/bio.2012.62.10.10.
- Grabowski, J. H., and Peterson, C. H. (2007). “Restoring oyster reefs to recover ecosystem services,” in, 281–298. doi:10.1016/S1875-306X(07)80017-7.
- Graham, E. R., and Thompson, J. T. (2009). Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 368, 22–29. doi:10.1016/j.jembe.2008.09.007.
- Gratton, S. E. a, Ropp, P. a, Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., et al. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11613–11618. doi:10.1073/pnas.0801763105.
- Gray, A. D., and Weinstein, J. E. (2017). Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3074–3080. doi:10.1002/etc.3881.
- Green, D. S. (2016). Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environ. Pollut.* 216, 95–103. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.043.
- Green, D. S., Boots, B., O’Connor, N. E., and Thompson, R. (2017). Microplastics Affect the Ecological Functioning of an Important Biogenic Habitat. *Environ. Sci. Technol.* 51, 68–77. doi:10.1021/acs.est.6b04496.
- Green, D. S., Boots, B., Sigwart, J., Jiang, S., and Rocha, C. (2016). Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environ. Pollut.* 208, 426–434. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.010.
- Green, D. S., Colgan, T. J., Thompson, R. C., and Carolan, J. C. (2019). Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environ. Pollut.* 246, 423–434. doi:10.1016/j.envpol.2018.12.017.
- Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings--entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2013–2025. doi:10.1098/rstb.2008.0265.
- Guillen, J., Natale, F., Carvalho, N., Casey, J., Hofherr, J., Druon, J.-N., et al. (2019). Global seafood consumption footprint. *Ambio* 48, 111–122. doi:10.1007/s13280-018-1060-9.
- Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., and Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 10, 487–510. doi:10.1016/j.nantod.2015.06.006.

- H -

- Hamdoun, A., and Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1745–1750. doi:10.1073/pnas.0610108104.
- Hardesty, B. D., Lawson, T., van der Velde, T., Lansdell, M., and Wilcox, C. (2017). Estimating quantities and sources of marine debris at a continental scale. *Front. Ecol. Environ.* 15, 18–25. doi:10.1002/fee.1447.
- Hartmann, N. B., Hüffer, T., Thompson, R. C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A. E., et al. (2019). Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* 53, 1039–1047. doi:10.1021/acs.est.8b05297.
- Haynes, V. N., Ward, J. E., Russell, B. J., and Agrios, A. G. (2017). Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. *Aquat. Toxicol.* 185, 138–148. doi:10.1016/j.aquatox.2017.02.012.
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., et al. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. *Chemosphere* 182. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.096.
- Hernandez, L. M., Yousefi, N., and Tufenkji, N. (2017). Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products? *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 280–285. doi:10.1021/acs.estlett.7b00187.
- Hicken, C. E., Linbo, T. L., Baldwin, D. H., Willis, M. L., Myers, M. S., Holland, L., et al. (2011). Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7086–7090. doi:10.1073/pnas.1019031108.
- Hickman, C. S. (1999). Adaptive Function of Gastropod Larval Shell Features. *Invertebr. Biol.* 118, 346–356. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3227006>.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., and Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075. doi:10.1021/es2031505.
- Holden, P. A., Klaessig, F., Turco, R. F., Priester, J. H., Rico, C. M., Avila-Arias, H., et al. (2014). Evaluation of Exposure Concentrations Used in Assessing Manufactured Nanomaterial Environmental Hazards: Are They Relevant? *Environ. Sci. Technol.* 48, 10541–10551. doi:10.1021/es502440s.
- Hopewell, J., Dvorak, R., and Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2115–2126. doi:10.1098/rstb.2008.0311.
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., and Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total Environ.* 586, 127–141. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.190.
- Houtkooper, R. H., and Vaz, F. M. (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2493–2506. doi:10.1007/s00018-008-8030-5.
- Hristov, D. R., Rocks, L., Kelly, P. M., Thomas, S. S., Pitek, A. S., Verderio, P., et al. (2015). Tuning of nanoparticle biological functionality through controlled surface chemistry and characterisation at the bioconjugated nanoparticle surface. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep17040.
- Hüffer, T., Praetorius, A., Wagner, S., von der Kammer, F., and Hofmann, T. (2017). Microplastic Exposure Assessment in Aquatic Environments: Learning from Similarities and Differences to Engineered Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2499–2507. doi:10.1021/acs.est.6b04054.
- Humanes, A., Ricardo, G. F., Willis, B. L., Fabricius, K. E., and Negri, A. P. (2017). Cumulative effects of suspended sediments, organic nutrients and temperature stress on early life history stages of the

coral *Acropora tenuis*. *Sci. Rep.* 7, 1–11. doi:10.1038/srep44101.

Hurley, R. R., and Nizzetto, L. (2018). Fate and occurrence of micro(nano)plastics in soils: Knowledge gaps and possible risks. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 1, 6–11. doi:10.1016/j.coesh.2017.10.006.

Hurley, R., Woodward, J., and Rothwell, J. J. (2018). Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding. *Nat. Geosci.*, 1–7. doi:10.1038/s41561-018-0080-1.

Hutchinson, T. H., Solbé, J., and Kloepper-Sams, P. J. (1998). Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) database. III - Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere* 36, 129–142. doi:10.1016/S0045-6535(97)10025-X.

Huvet, A., Paul-Pont, I., Fabioux, C., Lambert, C., Suquet, M., Thomas, Y., et al. (2016). Reply to Lenz et al.: Quantifying the smallest microplastics is the challenge for a comprehensive view of their environmental impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4123–E4124. doi:10.1073/pnas.1607221113.

Huvet, A., and Pouvreau, S. (2014). L'huître: Essentielle aux écosystèmes côtiers. *Subaqua* 269, 76–78.

- I -

Iñiguez, M. E., Conesa, J. A., and Fullana, A. (2017). Microplastics in Spanish Table Salt. *Sci. Rep.* 7, 1–7. doi:10.1038/s41598-017-09128-x.

Ioakeimidis, C., Fotopoulou, K. N., Karapanagioti, H. K., Geraga, M., Zeri, C., Papathanassiou, E., et al. (2016). The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. *Sci. Rep.* 6, 23501. doi:10.1038/srep23501.

Isobe, A., Iwasaki, S., Uchida, K., and Tokai, T. (2019). Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066. *Nat. Commun.* 10, 1–3. doi:10.1038/s41467-019-08316-9.

- J -

Jaeckle, W. B., and Manahan, D. T. (1989). Growth and Energy Imbalance During the Development of a Lecithotrophic Molluscan Larva (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 177, 237–246. doi:10.2307/1541939.

Jager, T. (2011). Some Good Reasons to Ban EC x and Related Concepts in Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8180–8181. doi:10.1021/es2030559.

Jahnke, A., Arp, H. P. H., Escher, B. I., Gewert, B., Gorokhova, E., Kühnel, D., et al. (2017). Reducing Uncertainty and Confronting Ignorance about the Possible Impacts of Weathering Plastic in the Marine Environment. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 85–90. doi:10.1021/acs.estlett.7b00008.

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., et al. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (80-)*. 347, 768–771. doi:10.1126/science.1260352.

Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, Y. H., Kim, M.-S., Lee, J.-S., Seo, J. S., et al. (2018). Nanoplastic Ingestion Enhances Toxicity of Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Monogonont Rotifer *Brachionus koreanus* via Multixenobiotic Resistance (MXR) Disruption. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11411–11418. doi:10.1021/acs.est.8b03211.

Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., et al. (2017). Adverse effects of

microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Sci. Rep.* 7, 1–11. doi:10.1038/srep41323.

Jeong, C. B., Won, E. J., Kang, H. M., Lee, M. C., Hwang, D. S., Hwang, U. K., et al. (2016). Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 8849–8857. doi:10.1021/acs.est.6b01441.

Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., and Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environ. Pollut.* 235, 322–329. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.088.

- K -

Kadar, E., Dyson, O., Handy, R. D., and Al-Subiai, S. N. (2013). Are reproduction impairments of free spawning marine invertebrates exposed to zero-valent nano-iron associated with dissolution of nanoparticles? *Nanotoxicology* 7, 135–143. doi:10.3109/17435390.2011.647927.

Kadar, E., Tarran, G. A., Jha, A. N., and Al-Subiai, S. N. (2011). Stabilization of engineered zero-valent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3245–3251. doi:10.1021/es1029848.

Kang, J.-H., Kwon, O. Y., Lee, K.-W., Song, Y. K., and Shim, W. J. (2015). Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 304–312. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.054.

Kaposi, K. L., Mos, B., Kelaher, B. P., and Dworjanyn, S. A. (2014). Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1638–1645. doi:10.1021/es404295e.

Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaeei, S., and Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Sci. Total Environ.* 612, 1380–1386. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.005.

Karami, A., Golieskardi, A., Keong Choo, C., Larat, V., Galloway, T. S., and Salamatinia, B. (2017). The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Sci. Rep.* 7, 46173. doi:10.1038/srep46173.

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

Kennedy, V. ., Newell, R. I. ., and Eble, A. . (1996). *The Eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College.

Kiessling, T., Gutow, L., and Thiel, M. (2015). “Marine Litter as Habitat and Dispersal Vector,” in *Marine Anthropogenic Litter* (Cham: Springer International Publishing), 141–181. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_6.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., et al. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825. doi:10.1897/08-090.1.

Klaine, S. J., Koelmans, A. A., Horne, N., Carley, S., Handy, R. D., Kapustka, L., et al. (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 3–14. doi:10.1002/etc.733.

- Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., and Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3315–3326. doi:10.1021/acs.est.5b06069.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Foekema, E., Kooi, M., Mintenig, S., Ossendorp, B. C., et al. (2017). Risks of Plastic Debris: Unravelling Fact, Opinion, Perception, and Belief. *Environ. Sci. Technol.* 51, 11513–11519. doi:10.1021/acs.est.7b02219.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., and Shim, W. J. (2015). “Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review,” in *Marine Anthropogenic Litter* (Cham: Springer International Publishing), 325–340. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_12.
- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., and Shi, H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Sci. Total Environ.* 610–611, 635–640. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.053.
- Kole, P. J., Löhr, A. J., Van Belleghem, F., and Ragas, A. (2017). Wear and Tear of Tyres: A Stealthy Source of Microplastics in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1265. doi:10.3390/ijerph14101265.
- Kooi, M., Nes, E. H. Van, Scheffer, M., and Koelmans, A. A. (2017). Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7963–7971. doi:10.1021/acs.est.6b04702.
- Kosuth, M., Mason, S. A., and Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS One* 13, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0194970.

- L -

- Laganà, P., Caruso, G., Corsi, I., Bergami, E., Venuti, V., Majolino, D., et al. (2019). Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 89–100. doi:10.1016/j.ijheh.2018.08.009.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., and Patzner, R. A. (1995). Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 465–474. doi:10.1016/0926-5287(96)80214-0.
- Laist, D. W. (1997). “Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records,” in *Marine Debris* (Springer US), 99–139. doi:10.1007/978-1-4613-8486-1_10.
- Lamb, J. B., Willis, B. L., Fiorenza, E. A., Couch, C. S., Howard, R., Rader, D. N., et al. (2018). Plastic waste associated with disease on coral reefs. *Science* 359, 460–462. doi:10.1126/science.aar3320.
- Lambert, S., Scherer, C., and Wagner, M. (2017). Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 470–475. doi:10.1002/ieam.1901.
- Lambert, S., and Wagner, M. (2016). Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 145, 265–268. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.11.078.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., and Le Pennec, M. (2006). Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebr. Reprod. Dev.* 49, 41–50. doi:10.1080/07924259.2006.9652192.

- Lattin, G. L., Moore, C. J., Zellers, A. F., Moore, S. L., and Weisberg, S. B. (2004). A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 291–294. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.01.020.
- Lavers, J. L., and Bond, A. L. (2017). Exceptional and rapid accumulation of anthropogenic debris on one of the world's most remote and pristine islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 6052–6055. doi:10.1073/pnas.1619818114.
- Law, K. L. (2017). Plastics in the Marine Environment. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9, 205–229. doi:10.1146/annurev-marine-010816-060409.
- Le Goïc, N., Hégaret, H., Boulais, M., Béguel, J.-P., Lambert, C., Fabioux, C., et al. (2014). Flow cytometric assessment of morphology, viability, and production of reactive oxygen species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to Toxic dinoflagellate (*Alexandrium minutum*) exposure. *Cytom. Part A* 85, 1049–1056. doi:10.1002/cyto.a.22577.
- Le Goïc, N., Hégaret, H., Fabioux, C., Miner, P., Suquet, M., Lambert, C., et al. (2013). Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. *Aquat. Living Resour.* 26, 221–228. doi:10.1051/alr/2013047.
- Le Grand, F., Soudant, P., Siah, A., Tremblay, R., Marty, Y., and Kraffe, E. (2014). Disseminated neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*: Membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells. *Lipids* 49, 807–818. doi:10.1007/s11745-014-3917-4.
- Le Moigne, A., and Foucrier, J. (2004). *Biologie du développement*. Dunod, ed. Dunod.
- Lebreton, L., and Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun.* 5, 6. doi:10.1057/s41599-018-0212-7.
- Lebreton, L. C. M., Greer, S. D., and Borrero, J. C. (2012). Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 653–661. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.027.
- Lebreton, L. C. M., van der Zwet, J., Damsteeg, J.-W., Slat, B., Andrady, A., and Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans. *Nat. Commun.* 8, 15611. doi:10.1038/ncomms15611.
- Lebreton, L., Egger, M., and Slat, B. (2019). A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. *Sci. Rep.* 9, 12922. doi:10.1038/s41598-019-49413-5.
- Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., et al. (2014). The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ. Pollut.* 188, 177–181. doi:10.1016/j.envpol.2014.02.006.
- Leclère, L., Jager, M., Barreau, C., Chang, P., Le Guyader, H., Manuel, M., et al. (2012). Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia*. *Dev. Biol.* 364, 236–248. doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.018.
- Lee, K., Shim, W. J., Kwon, O. Y., and Kang, J. (2013). Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11278–11283. doi:10.1021/es401932b.
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., and Rothen-Rutishauser, B. (2019). Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ. Sci. Technol.* 53, 1748–1765. doi:10.1021/acs.est.8b05512.
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. a, and Åberg, C. (2013). Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1438–1444. doi:10.1021/ja309812z.

- Lewis, C., and Ford, A. T. (2012). Infertility in male aquatic invertebrates: A review. *Aquat. Toxicol.* 120–121, 79–89. doi:10.1016/j.aquatox.2012.05.002.
- Li, H. X., Getzinger, G. J., Ferguson, P. L., Orihuela, B., Zhu, M., and Rittschof, D. (2016). Effects of Toxic Leachate from Commercial Plastics on Larval Survival and Settlement of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Environ. Sci. Technol.* 50, 924–931. doi:10.1021/acs.est.5b02781.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., et al. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environ. Pollut.* 244, 522–533. doi:10.1016/j.envpol.2018.10.032.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., and Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.* 207, 190–195. doi:10.1016/j.envpol.2015.09.018.
- Li, Z., Agellon, L. B., Allen, T. M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., et al. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* 3, 321–331. doi:10.1016/j.cmet.2006.03.007.
- Liebig, J. R., and Vanderploeg, H. A. (1995). Vulnerability of *Dreissena polymorpha* Larvae to Predation by Great Lakes Calanoid Copepods: the Importance of the Bivalve Shell. *J. Great Lakes Res.* 21, 353–358. doi:10.1016/S0380-1330(95)71046-2.
- Lin, D., Tian, X., Wu, F., and Xing, B. (2010). Fate and Transport of Engineered Nanomaterials in the Environment. *J. Environ. Qual.* 39, 1896. doi:10.2134/jeq2009.0423.
- Liu, J., Ma, Y., Zhu, D., Xia, T., Qi, Y., Yao, Y., et al. (2018). Polystyrene Nanoplastics-Enhanced Contaminant Transport: Role of Irreversible Adsorption in Glassy Polymeric Domain. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2677–2685. doi:10.1021/acs.est.7b05211.
- Liu, K., Wu, T., Wang, X., Song, Z., Zong, C., Wei, N., et al. (2019). Consistent Transport of Terrestrial Microplastics to the Ocean through Atmosphere. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.9b03427. doi:10.1021/acs.est.9b03427.
- Ljubimova, J. Y., and Holler, E. (2012). Biocompatible nanopolymers: the next generation of breast cancer treatment? *Nanomedicine* 7, 1467–1470. doi:10.2217/nnm.12.115.
- Löder, M. G. J., Imhof, H. K., Ladehoff, M., Löschel, L. A., Lorenz, C., Mintenig, S., et al. (2017). Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.* 51, 14283–14292. doi:10.1021/acs.est.7b03055.
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., et al. (2015). Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Mar. Chem.* 175, 39–46. doi:10.1016/j.marchem.2015.04.003.
- Long, M., Paul-Pont, I., Hégaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., et al. (2017). Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environ. Pollut.* 228, 454–463. doi:10.1016/j.envpol.2017.05.047.
- Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Le Grand, F., Donval, A., Lambert, C., et al. (2018). Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. *Algal Res.* 35, 508–518. doi:10.1016/j.algal.2018.09.023.
- Loosli, F., Le Coustumer, P., and Stoll, S. (2013). TiO₂ nanoparticles aggregation and disaggregation in presence of alginate and Suwannee River humic acids. pH and concentration effects on nanoparticle stability. *Water Res.* 47, 6052–6063. doi:10.1016/j.watres.2013.07.021.
- Lorenz, C., Roscher, L., Meyer, M. S., Hildebrandt, L., Prume, J., Löder, M. G. J., et al. (2019). Spatial distribution of microplastics in sediments and surface waters of the southern North Sea. *Environ.*

Pollut. 252, 1719–1729. doi:10.1016/j.envpol.2019.06.093.

- Loucaide, Cappelle, P. Van, and Behrends, T. (2008). Dissolution of biogenic silica from land to ocean: Role of salinity and pH. *Limnol. Oceanogr.* 53, 1614–1621. doi:10.4319/lo.2008.53.4.1614.
- Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., and Lead, J. R. (2012). Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6893–6899. doi:10.1021/es300839e.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., et al. (2016). Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4054–4060. doi:10.1021/acs.est.6b00183.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., and Dawson, K. A (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14265–14270. doi:10.1073/pnas.0805135105.
- Lusher, A. L., McHugh, M., and Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 94–99. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.11.028.
- Lusher, A. L., Peter, H., and Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture*.
- Lusher, A. L., Tirelli, V., O'Connor, I., and Officer, R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Sci. Rep.* 5, 14947. doi:10.1038/srep14947.

- M -

- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., et al. (2016). Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environ. Pollut.* 219, 166–173. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.061.
- Magnusson, K., Jörundsdóttir, H., Norén, F., Lloyd, H., Talvitie, J., and Setälä, O. (2016). *Microplastic in sewage treatment systems*. Nordic Council of Ministers doi:10.6027/TN2016-510.
- Magnusson, K., and Norén, F. (2014). Screening of microplastic particles in and down-stream a wastewater treatment plant. *IVL Swedish Environ. Res. Inst.* C 55, 22. doi:naturvardsverket-2226.
- Magri, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., et al. (2018). Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano* 12, 7690–7700. doi:10.1021/acsnano.8b01331.
- Mai, H., Morin, B., and Cachot, J. (2013a). Toxic effects of copper and cadmium on fertilization potency of gametes of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Xenobiotics* 3, 9. doi:10.4081/xeno.2013.s1.e9.
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., and Cachot, J. (2013b). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003.
- Manfra, L., Rotini, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., and Corsi, I. (2017). Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 557–563. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.068.
- Manzo, S., Buono, S., and Cremisini, C. (2006). Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin

- Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 61–68. doi:10.1007/s00244-004-0167-0.
- Marques-Santos, L. F., Grassi, G., Bergami, E., Faleri, C., Balbi, T., Salis, A., et al. (2018). Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype. *Nanotoxicology* 0, 1–21. doi:10.1080/17435390.2018.1482378.
- Marteil, L. (1976). La conchyliculture française. Partie 2. Biologie de l'huître et de la moule.
- Martin, J., Lusher, A., Thompson, R. C., and Morley, A. (2017). The Deposition and Accumulation of Microplastics in Marine Sediments and Bottom Water from the Irish Continental Shelf. *Sci. Rep.*, 1–9. doi:10.1038/s41598-017-11079-2.
- Martínez-Gómez, C., León, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., and Vethaak, A. D. (2017). The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins. *Mar. Environ. Res.* 130, 69–76. doi:10.1016/j.marenvres.2017.06.016.
- Martins, A., and Guilhermino, L. (2018). Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Sci. Total Environ.* 631–632, 421–428. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.054.
- Masó, M., Garcés, E., Pagès, F., and Camp, J. (2003). Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Sci. Mar.* 67, 107–111. doi:10.3989/scimar.2003.67n1107.
- Mason, S. A., Welch, V. G., and Neratko, J. (2018). Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Front. Chem.* 6, 1–17. doi:10.3389/fchem.2018.00407.
- Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, L.-A., Linse, S., Malmendal, A., and Cedervall, T. (2015a). Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 49, 553–561. doi:10.1021/es5053655.
- Mattsson, K., Hansson, L.-A., and Cedervall, T. (2015b). Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 1712–1721. doi:10.1039/C5EM00227C.
- Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L.-A., and Cedervall, T. (2017). Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci. Rep.* 7, 11452. doi:10.1038/s41598-017-10813-0.
- Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., et al. (2015). Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Mar. Environ. Res.* 112, 78–85. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.009.
- McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schlupe, J., and Kelly, J. J. (2014). Microplastic is an Abundant and Distinct Microbial Habitat in an Urban River. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11863–11871. doi:10.1021/es503610r.
- Michels, J., Stippkugel, A., Lenz, M., Wirtz, K., and Engel, A. (2018). Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181203. doi:10.1098/rspb.2018.1203.
- Mintenig, S. M., Bäuerlein, P. S., Koelmans, A. A., Dekker, S. C., and Van Wezel, A. P. (2018). Closing the gap between small and smaller: towards a framework to analyse nano- and microplastics in aqueous environmental samples. *Environ. Sci. Nano* 5, 1640–1649. doi:10.1039/c8en00186c.
- Miossec, L., Le Deuff, R.-M., and Gouilletquer, P. (2009). Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop. Res. Rep.* 299, 42. Available at: papers3://publication/uuid/17B4CB22-2D42-

4215-A830-83769CFC3BA1.

- Miralles, L., Gomez-Agenjo, M., Rayon-Viña, F., Gyraitė, G., and Garcia-Vazquez, E. (2018). Alert calling in port areas: Marine litter as possible secondary dispersal vector for hitchhiking invasive species. *J. Nat. Conserv.* 42, 12–18. doi:10.1016/j.jnc.2018.01.005.
- Mitrano, D. M., Beltzung, A., Frehland, S., Schmiedgruber, M., Cingolani, A., and Schmidt, F. (2019). Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems. *Nat. Nanotechnol.* 14, 362–368. doi:10.1038/s41565-018-0360-3.
- Mohamed Nor, N. H., and Obbard, J. P. (2014). Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 278–283. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.11.025.
- Mohd Omar, F., Abdul Aziz, H., and Stoll, S. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Sci. Total Environ.* 468–469, 195–201. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.044.
- Molnar, J. L., Gamboa, R. L., Revenga, C., and Spalding, M. D. (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front. Ecol. Environ.* 6, 485–492. doi:10.1890/070064.
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., et al. (2011). Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2525–2534. doi:10.1021/ja107583h.
- Moore, C. ., Moore, S. ., Leecaster, M. ., and Weisberg, S. . (2001). A Comparison of Plastic and Plankton in the North Pacific Central Gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1297–1300. doi:10.1016/S0025-326X(01)00114-X.
- Moore, C. ., Moore, S. ., Weisberg, S. ., Lattin, G. ., and Zellers, A. (2002). A comparison of neustonic plastic and zooplankton abundance in southern California's coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1035–1038. doi:10.1016/S0025-326X(02)00150-9.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J. M., Jha, A. N., and Costil, K. (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002.
- Mouat, J., Lopez-Lozano, R., and Bateson, H. (2010). Economic Impacts of Marine Litter. *KIMO Int.*, 1–117.
- Moutel, B., Gonçalves, O., Le Grand, F., Long, M., Soudant, P., Legrand, J., et al. (2016). Development of a screening procedure for the characterization of *Botryococcus braunii* strains for biofuel application. *Process Biochem.* 51, 1855–1865. doi:10.1016/j.procbio.2016.05.002.
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., and Quinn, B. (2016). Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5800–5808. doi:10.1021/acs.est.5b05416.

- N -

- Nangia, S., and Sureshkumar, R. (2012). Effects of Nanoparticle Charge and Shape Anisotropy on Translocation through Cell Membranes. *Langmuir* 28, 17666–17671. doi:10.1021/la303449d.
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., and Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar. Pollut. Bull.* 99, 178–185.

doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.029.

- Nasser, F., and Lynch, I. (2016). Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *J. Proteomics* 137, 45–51. doi:10.1016/j.jprot.2015.09.005.
- Nel, A. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* (80-.). 311, 622–627. doi:10.1126/science.1114397.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V, Somasundaran, P., et al. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557. doi:10.1038/nmat2442.
- Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N., Deaville, R., Galloway, T., et al. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Sci. Rep.*, 1–8. doi:10.1038/s41598-018-37428-3.
- Newell, R. I. E. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *J. Shellfish Res.* Available at: <http://link.springer.com/10.1023/A:1009924624259>.
- Newell, R. I. E., Cornwell, J. C., and Owens, M. S. (2002). Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on sediment nitrogen dynamics: A laboratory study. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1367–1379. doi:10.4319/lo.2002.47.5.1367.
- Newell, R., Kemp, W., Hagy III, J., Cerco, C., Testa, J., and Boynton, W. (2007). Top-down control of phytoplankton by oysters in Chesapeake Bay, USA: Comment on Pomeroy et al. (2006). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 341, 293–298. doi:10.3354/meps341293.
- Newman, S., Watkins, E., Farmer, A., Brink, P. ten, and Schweitzer, J.-P. (2015). “The Economics of Marine Litter,” in *Marine Anthropogenic Litter* (Cham: Springer International Publishing), 367–394. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_14.
- Nobre, C. R., Santana, M. F. M., Maluf, A., Cortez, F. S., Cesar, A., Pereira, C. D. S., et al. (2015). Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Pollut. Bull.* 92, 99–104. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.050.
- Nolte, T. M., Hartmann, N. B., Kleijn, J. M., Garnæs, J., van de Meent, D., Jan Hendriks, A., et al. (2017). The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquat. Toxicol.* 183, 11–20. doi:10.1016/j.aquatox.2016.12.005.
- Norén, F. (2007). Small plastic particles in Coastal Swedish waters. *KIMO Int.*
- Noventa, S., Hacker, C., Correia, A., Drago, C., and Galloway, T. (2018). Gold nanoparticles ingested by oyster larvae are internalized by cells through an alimentary endocytic pathway. *Nanotoxicology* 0, 1–13. doi:10.1080/17435390.2018.1487601.

- ○ -

- Obbard, R. W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., and Thompson, R. C. (2014). Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Futur.* 2, 315–320. doi:10.1002/2014EF000240.

- Ogonowski, M., Schür, C., Jarsén, Å., and Gorokhova, E. (2016). The Effects of Natural and Anthropogenic Microparticles on Individual Fitness in *Daphnia magna*. *PLoS One* 11, e0155063. doi:10.1371/journal.pone.0155063.
- Ostle, C., Thompson, R. C., Broughton, D., Gregory, L., Wootton, M., and Johns, D. G. (2019). The rise in ocean plastics evidenced from a 60-year time series. *Nat. Commun.* 10, 1622. doi:10.1038/s41467-019-09506-1.
- Ostroumov, S. A. (2003). Studying effects of some surfactants and detergents on filter-feeding bivalves. *Hydrobiologia* 500, 341–344. doi:10.1023/A:1024604904065.

- P -

- Paget, V., Dekali, S., Kortulewski, T., Grall, R., Gamez, C., Blazy, K., et al. (2015). Specific Uptake and Genotoxicity Induced by Polystyrene Nanobeads with Distinct Surface Chemistry on Human Lung Epithelial Cells and Macrophages. *PLoS One* 10, e0123297. doi:10.1371/journal.pone.0123297.
- Paluselli, A., Fauvelle, V., Galgani, F., and Sempéré, R. (2018). Phthalate release from plastic fragments and degradation in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.8b05083. doi:10.1021/acs.est.8b05083.
- Panacek, A., Prucek, R., Safarova, D., Dittrich, M., Richtrova, J., Benickova, K., et al. (2011). Acute and Chronic Toxicity Effects of Silver Nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4974–4979. doi:10.1021/es104216b.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 408–417. doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.006.
- Parker, L. M., O'Connor, W. A., Raftos, D. A., Pörtner, H. O., and Ross, P. M. (2015). Persistence of positive carryover effects in the oyster, *Saccostrea glomerata*, following transgenerational exposure to ocean acidification. *PLoS One* 10, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0132276.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., et al. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2016.06.039.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., et al. (2018). Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–22. doi:10.3389/fmars.2018.00252.
- Pechenik, J. (1999). On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177, 269–297. doi:10.3354/meps177269.
- Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., et al. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environ. Pollut.* 212, 251–256. doi:10.1016/j.envpol.2016.01.083.
- Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpfen, T., et al. (2018). Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nat. Commun.* 9, 1505. doi:10.1038/s41467-018-03825-5.
- Peng, X., Chen, M., Chen, S., Dasgupta, S., Xu, H., Ta, K., et al. (2018). Microplastics contaminate the deepest part of the world's ocean. *Geochemical Perspect. Lett.*, 1–5. doi:10.7185/geochemlet.1829.

- Pessoni, L., Veclin, C., El Hadri, H., Cugnet, C., Davranche, M., Pierson-Wickmann, A.-C., et al. (2019). Soap- and metal-free polystyrene latex particles as a nanoplastic model. *Environ. Sci. Nano* 6, 2253–2258. doi:10.1039/C9EN00384C.
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., and Pernet, F. (2015). Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 6, 205–222. doi:10.3354/aei00125.
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., and Boudry, P. (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 3, 257–273. doi:10.3354/aei00070.
- Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., and Zalouk-Vergnoux, A. (2018). Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? *Mar. Pollut. Bull.* 129, 664–674. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.10.054.
- Pikuda, O., Xu, E. G., Berk, D., and Tufenkji, N. (2019). Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6, 21–25. doi:10.1021/acs.estlett.8b00614.
- Pinsino, A., Bergami, E., Della Torre, C., Vannuccini, M. L., Addis, P., Secci, M., et al. (2017). Amino-modified polystyrene nanoparticles affect signalling pathways of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos. *Nanotoxicology* 11, 201–209. doi:10.1080/17435390.2017.1279360.
- Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., et al. (2018a). Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 194, 185–194. doi:10.1016/j.aquatox.2017.11.017.
- Pitt, J. A., Trevisan, R., Massarsky, A., Kozal, J. S., Levin, E. D., and Di Giulio, R. T. (2018b). Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *Sci. Total Environ.* 643, 324–334. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.186.
- Pittura, L., Avio, C. G., Giuliani, M. E., d’Errico, G., Keiter, S. H., Cormier, B., et al. (2018). Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Front. Mar. Sci.* 5. doi:10.3389/fmars.2018.00103.
- PlasticsEurope (2018). *Plastics – the Facts 2018*.
- Porter, A., Lyons, B. P., Galloway, T. S., and Lewis, C. (2018). Role of Marine Snows in Microplastic Fate and Bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7111–7119. doi:10.1021/acs.est.8b01000.
- Pousse, E. (2017). Modélisation basée sur la théorie des budgets d’énergie dynamiques (DEB) de la cinétique de paralytiques (PST) par l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- Pousse, É., Flye-Sainte-Marie, J., Alunno-Bruscia, M., Hégaret, H., and Jean, F. (2018). Sources of paralytic shellfish toxin accumulation variability in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Toxicon* 144, 14–22. doi:10.1016/j.toxicon.2017.12.050.
- Pouvreau, S., Jonquières, G., and Buestel, D. (1999). Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture* 176, 295–314. doi:10.1016/S0044-8486(99)00102-7.
- Primpke, S., Lorenz, C., Rascher-Friesenhausen, R., and Gerdt, G. (2017). An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Anal. Methods* 9, 1499–1511. doi:10.1039/c6ay02476a.
- Procter, J., Hopkins, F. E., Fileman, E. S., and Lindeque, P. K. (2019). Smells good enough to eat:

Dimethyl sulfide (DMS) enhances copepod ingestion of microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* 138, 1–6. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.11.014.

Prunier, J., Maurice, L., Perez, E., Gigault, J., Pierson Wickmann, A.-C., Davranche, M., et al. (2019). Trace metals in polyethylene debris from the North Atlantic subtropical gyre. *Environ. Pollut.* 245, 371–379. doi:10.1016/j.envpol.2018.10.043.

- Q -

Qian, S., Ji, H., Wu, X., Li, N., Yang, Y., Bu, J., et al. (2018). Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products. *PLoS One* 13, e0208467. doi:10.1371/journal.pone.0208467.

- R -

Rafalski, V. A., Mancini, E., and Brunet, A. (2012). Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate. *J. Cell Sci.* 125, 5597–5608. doi:10.1242/jcs.114827.

Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863, 2977–2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.

Rehse, S., Kloas, W., and Zarfl, C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 153, 91–99. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.133.

Reinhardt, K., Dobler, R., and Abbott, J. (2015). An Ecology of Sperm: Sperm Diversification by Natural Selection. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 46, 435–459. doi:10.1146/annurev-ecolsys-120213-091611.

Reisser, J., Slat, B., Noble, K., du Plessis, K., Epp, M., Proietti, M., et al. (2015). The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. *Biogeosciences* 12, 1249–1256. doi:10.5194/bg-12-1249-2015.

Revel, M., Châtel, A., and Mouneyrac, C. (2017). Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? *Aquat. Toxicol.* 193, 72–85. doi:10.1016/j.aquatox.2017.10.005.

Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., et al. (2019). Tissue-Specific Biomarker Responses in the Blue Mussel *Mytilus* spp. Exposed to a Mixture of Microplastics at Environmentally Relevant Concentrations. *Front. Environ. Sci.* 7, 1–14. doi:10.3389/fenvs.2019.00033.

Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., et al. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Mar. Pollut. Bull.* 122, 379–391. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.06.078.

Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Lepiver, D., Pouvreau, S., Hamon, M., et al. (2008). A flow-through rearing system for ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 282, 54–60. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.016.

Riffell, J. A., Krug, P. J., and Zimmer, R. K. (2004). The ecological and evolutionary consequences of sperm chemoattraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4501–4506. doi:10.1073/pnas.0304594101.

- Rillig, M. C., de Souza Machado, A. A., Lehmann, A., and Klümper, U. (2018). Evolutionary implications of microplastics for soil biota. *Environ. Chem.* doi:10.1071/EN18118.
- Rillig, M. C., Ziersch, L., and Hempel, S. (2017). Microplastic transport in soil by earthworms. *Sci. Rep.* 7, 1–6. doi:10.1038/s41598-017-01594-7.
- Ringwood, A. H., Levi-Polyachenko, N., and Carroll, D. L. (2009). Fullerene exposures with oysters: Embryonic, adult, and cellular responses. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7136–7141. doi:10.1021/es900621j.
- Ringwood, A. H., McCarthy, M., Bates, T. C., and Carroll, D. L. (2010). The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 69, S49–S51. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.011.
- Rist, S., Baun, A., Almeda, R., and Hartmann, N. B. (2019). Ingestion and effects of micro- and nanoplastics in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 140, 423–430. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.01.069.
- Rist, S., Baun, A., and Hartmann, N. B. (2017). Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ. Pollut.* 228, 398–407. doi:10.1016/j.envpol.2017.05.048.
- Rist, S. E., Assidqi, K., Zamani, N. P., Appel, D., Perschke, M., Huhn, M., et al. (2016). Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 111, 213–220. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.07.006.
- Riviere, G., He, Y., Tecchio, S., Crowell, E., Gras, M., Sourdain, P., et al. (2017). Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet.* 13, 1–16. doi:10.1371/journal.pgen.1006807.
- Riviere, G., Wu, G. C., Fellous, A., Goux, D., Sourdain, P., and Favrel, P. (2013). DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas*. *Mar. Biotechnol.* 15, 739–753. doi:10.1007/s10126-013-9523-2.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., and Bebianno, M. J. (2015). Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Mar. Environ. Res.* 111, 74–88. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.013.
- Rochman, C. M. (2018). Microplastics research—from sink to source. *Science (80-.)*. 360, 28–29. doi:10.1126/science.aar7734.
- Rochman, C. M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., et al. (2019). Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 703–711. doi:10.1002/etc.4371.
- Rochman, C. M., Browne, M. A., Underwood, A. J., van Franeker, J. A., Thompson, R. C., and Amaral-Zettler, L. A. (2015). The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. *Ecology* 87, 14–2070.1. doi:10.1890/14-2070.1.
- Rochman, C. M., Hentschel, B. T., and The, S. J. (2014). Long-term sorption of metals is similar among plastic types: Implications for plastic debris in aquatic environments. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0085433.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., and Kaye, S. (2013). Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 130109073312009. doi:10.1021/es303700s.
- Rolton, A., Soudant, P., Vignier, J., Pierce, R., Henry, M., Shumway, S. E., et al. (2015). Susceptibility of gametes and embryos of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to *Karenia brevis* and its toxins.

Toxicon 99, 6–15. doi:10.1016/j.toxicon.2015.03.002.

- Rosati, F. (1995). Sperm-egg interactions during fertilization in invertebrates. *Bolletino di Zool.* 62, 323–334. doi:10.1080/11250009509356084.
- Rossato, M. (2001). Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 119–128. doi:10.1093/molehr/7.2.119.
- Rossi, G., Barnoud, J., and Monticelli, L. (2014). Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 241–246. doi:10.1021/jz402234c.
- Rothstein, S. I. (1973). Plastic Particle Pollution of the Surface of the Atlantic Ocean: Evidence from a Seabird. *Condor* 75, 344–345. doi:10.2307/1366176.
- Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., and Schmitt-Jansen, M. (2017). Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 258–267. doi:10.1021/acs.estlett.7b00164.
- Ryan, P. G. (2015). “A Brief History of Marine Litter Research,” in *Marine Anthropogenic Litter* (Cham: Springer International Publishing), 1–25. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_1.

- S -

- Sagarin, R. D., Adams, J., Blanchette, C. A., Brusca, R. C., Chorover, J., Cole, J. E., et al. (2016). Between control and complexity: opportunities and challenges for marine mesocosms. *Front. Ecol. Environ.* 14, 389–396. doi:10.1002/fee.1313.
- Salvi, D., and Mariottini, P. (2016). Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters’ subfamily Saccostreinae and the genus Magallana (Bivalvia: Ostreidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 179, 263–276. doi:10.1111/zoj.12455.
- Savina, M., and Pouvreau, S. (2004). A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboïdes* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* 239, 289–306. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.029.
- Savoca, M. S., Wohlfeil, M. E., Ebeler, S. E., and Nevitt, G. A. (2016). Marine plastic debris emits a keystone infochemical for olfactory foraging seabirds. *Sci. Adv.* 2, e1600395–e1600395. doi:10.1126/sciadv.1600395.
- Scherer, C., Brennholt, N., Reifferscheid, G., and Wagner, M. (2017). Feeding type and development drive the ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Sci. Rep.* 7, 1–9. doi:10.1038/s41598-017-17191-7.
- Schiaparelli, S., Cattaneo-Vietti, R., and Mierzejewski, P. (2004). A “protective shell” around the larval cocoon of *Cephalodiscus densus* Andersson, 1907 (Graptolithoidea, Hemichordata). *Polar Biol.* 27, 813–817. doi:10.1007/s00300-004-0661-x.
- Schmidt, C., Krauth, T., and Wagner, S. (2017). Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12246–12253. doi:10.1021/acs.est.7b02368.
- Schöne, B. R., and Gillikin, D. P. (2013). Unraveling environmental histories from skeletal diaries — Advances in sclerochronology. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 373, 1–5. doi:10.1016/j.palaeo.2012.11.026.
- Schür, C., Rist, S., Baun, A., Mayer, P., Hartmann, N. B., and Wagner, M. (2019). When Fluorescence Is

- not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1495–1503. doi:10.1002/etc.4436.
- Schwaferts, C., Niessner, R., Elsner, M., and Ivleva, N. P. (2019). Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 112, 52–65. doi:10.1016/j.trac.2018.12.014.
- Setälä, O., Fleming-lehtinen, V., and Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.013.
- Shaikh, S. R., Sullivan, E. M., Alleman, R. J., Brown, D. A., and Zeczycki, T. N. (2014). Increasing mitochondrial membrane phospholipid content lowers the enzymatic activity of electron transport complexes. *Biochemistry* 53, 5589–5591. doi:10.1021/bi500868g.
- Sheavly, S. B., and Register, K. M. (2007). Marine debris & plastics: Environmental concerns, sources, impacts and solutions. *J. Polym. Environ.* 15, 301–305. doi:10.1007/s10924-007-0074-3.
- Singh, N., Tiwari, E., Khandelwal, N., and Darbha, G. K. (2019). Understanding the stability of nanoplastics in aqueous environments: effect of ionic strength, temperature, dissolved organic matter, clay, and heavy metals. *Environ. Sci. Nano* 6, 2968–2976. doi:10.1039/C9EN00557A.
- Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H. S., and Vethaak, A. D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquat. Toxicol.* 170, 259–261. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.002.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., and Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Kang, J. H., Kwon, O. Y., Han, G. M., et al. (2014). Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9014–9021. doi:10.1021/es501757s.
- Song, Y. P., Suquet, M., Quéau, I., and Lebrun, L. (2009). Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018.
- Steele, S., and Mulcahy, M. F. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 79, S0025315498000836. doi:10.1017/S0025315498000836.
- Steer, M., Cole, M., Thompson, R. C., and Lindeque, P. K. (2017). Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. *Environ. Pollut.*, 1–10. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.062.
- Stephens, B., Azimi, P., El Orch, Z., and Ramos, T. (2013). Ultrafine particle emissions from desktop 3D printers. *Atmos. Environ.* 79, 334–339. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.06.050.
- Strojan, K., Leonardi, A., Bregar, V. B., Križaj, I., Svete, J., and Pavlin, M. (2017). Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLoS One* 12, e0169552. doi:10.1371/journal.pone.0169552.
- Suaría, G., Avio, C. G., Mineo, A., Lattin, G. L., Magaldi, M. G., Belmonte, G., et al. (2016). The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Sci. Rep.* 6, 37551. doi:10.1038/srep37551.
- Summers, S., Henry, T., and Gutierrez, T. (2018). Agglomeration of nano- and microplastic particles in seawater by autochthonous and de novo-produced sources of exopolymeric substances. *Mar. Pollut. Bull.* 130, 258–267. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.03.039.

- Sun, X., Liang, J., Zhu, M., Zhao, Y., and Zhang, B. (2018). Microplastics in seawater and zooplankton from the Yellow Sea. *Environ. Pollut.* 242, 585–595. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.014.
- Suquet, M., Labbe, C., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J. R., Quere, C., et al. (2010). Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. *Theriogenology* 74, 111–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.021.
- Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., and Rivière, G. (2018). Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 196, 70–78. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.001.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., et al. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 201519019. doi:10.1073/pnas.1519019113.

- T -

- Taltec, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., et al. (2019). Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere* 225, 639–646. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.077.
- Taltec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., et al. (2018). Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235. doi:10.1016/j.envpol.2018.08.020.
- Talmage, S. C., and Gobler, C. J. (2010). Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 17246–17251. doi:10.1073/pnas.0913804107.
- Taylor, U., Barchanski, A., Petersen, S., Kues, W. A., Baulain, U., Gamrad, L., et al. (2014). Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology* 8, 118–127. doi:10.3109/17435390.2013.859321.
- Taylor, U., Tiedemann, D., Rehbock, C., Kues, W. A., Barcikowski, S., and Rath, D. (2015). Influence of gold, silver and gold–silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 651–664. doi:10.3762/bjnano.6.66.
- Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., et al. (2017). Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13689–13697. doi:10.1021/acs.est.7b03667.
- Ter Halle, A., Ladirat, L., Gendre, X., Goudouneche, D., Pusineri, C., Routaboul, C., et al. (2016). Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5668–5675. doi:10.1021/acs.est.6b00594.
- Ter Halle, A., Ladirat, L., Martignac, M., Mingotaud, A. F., Boyron, O., and Perez, E. (2017). To what extent are microplastics from the open ocean weathered? *Environ. Pollut.* 227, 167–174. doi:10.1016/j.envpol.2017.04.051.
- Tetu, S. G., Sarker, I., Schrameyer, V., Pickford, R., Elbourne, L. D. H., Moore, L. R., et al. (2019). Plastic leachates impair growth and oxygen production in *Prochlorococcus*, the ocean's most abundant photosynthetic bacteria. *Commun. Biol.* 2, 1–9. doi:10.1038/s42003-019-0410-x.
- Thébault, J., and Chauvaud, L. (2013). Li/Ca enrichments in great scallop shells (*Pecten maximus*) and

their relationship with phytoplankton blooms. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 373, 108–122. doi:10.1016/j.palaeo.2011.12.014.

Thomas, Y., Cassou, C., Gernez, P., and Pouvreau, S. (2018). Oysters as sentinels of climate variability and climate change in coastal ecosystems. *Environ. Res. Lett.* 13. doi:10.1088/1748-9326/aae254.

Thomas, Y., Pouvreau, S., Alunno-Bruscia, M., Barillé, L., Gohin, F., Bryère, P., et al. (2016). Global change and climate-driven invasion of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) along European coasts: a bioenergetics modelling approach. *J. Biogeogr.* 43, 568–579. doi:10.1111/jbi.12665.

Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., and Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. London.* 364, 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053.

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., et al. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304, 838. doi:10.1126/science.1094559.

Togo, T., and Morisawa, M. (1999). Mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Zool.* 283, 307–314. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19990215)283:3<307::AID-JEZ8>3.0.CO;2-N.

Tosetto, L., Brown, C., and Williamson, J. E. (2016). Microplastics on beaches: ingestion and behavioural consequences for beachhoppers. *Mar. Biol.* 163, 199. doi:10.1007/s00227-016-2973-0.

Trevisan, R., Voy, C., Chen, S., and Di Giulio, R. T. (2019). Nanoplastics Decrease the Toxicity of a Complex PAH Mixture but Impair Mitochondrial Energy Production in Developing Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.9b02003. doi:10.1021/acs.est.9b02003.

- U -

UNEP (2006). Marine and coastal ecosystems and human well-being: A synthesis report based on the findings of the Millennium Ecosystem Assessment. Available at: papers3://publication/uuid/724D6E83-31C3-4335-87A1-1C9AF7B455C0.

UNEP (2015). *Plastic in Cosmetics*.

UNEP, and GRID-Arendal (2016). Marine Litter Vital Graphics. *United Nations Environ. Program. GRID-Arendal*, 60.

- V -

Vacquier, V. D., and Swanson, W. J. (2011). Selection in the Rapid Evolution of Gamete Recognition Proteins in Marine Invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a002931–a002931. doi:10.1101/cshperspect.a002931.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbins, J., and Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Mar. Environ. Res.* 111, 5–17. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.007.

Van Cauwenberghe, L., and Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.010.

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., and Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in

- deep-sea sediments. *Environ. Pollut.* 182, 495–499. doi:10.1016/j.envpol.2013.08.013.
- van Pomeroy, M., Brun, N. R., Peijnenburg, W. J. G. M., and Vijver, M. G. (2017). Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquat. Toxicol.* 190, 40–45. doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.017.
- van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B. D., van Franeker, J. A., et al. (2015). A global inventory of small floating plastic debris. *Environ. Res. Lett.* 10, 124006. doi:10.1088/1748-9326/10/12/124006.
- Vandegheuchte, M. B., and Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 764–765, 36–45. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.08.008.
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F., and Koelmans, A. A. (2014). Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4869–4876. doi:10.1021/es405721v.
- Veneman, W. J., Spaik, H. P., Brun, N. R., Bosker, T., and Vijver, M. G. (2017). Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 190, 112–120. doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.014.
- Verma, A., and Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12–21. doi:10.1002/smll.200901158.
- Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., et al. (2013). Estuarine , Coastal and Shelf Science Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice , Italy : First observations on occurrence , spatial patterns and identification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 130, 54–61. doi:10.1016/j.ecss.2013.03.022.
- Vianello, A., Jensen, R. L., Liu, L., and Vollertsen, J. (2019). Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin. *Sci. Rep.* 9, 8670. doi:10.1038/s41598-019-45054-w.
- Viarengo, A., and Canesi, L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94, 225–243. doi:10.1016/0044-8486(91)90120-V.
- Vignet, C., Devier, M. H., Le Menach, K., Lyphout, L., Potier, J., Cachot, J., et al. (2014). Long-term disruption of growth, reproduction, and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAH-spiked sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13877–13887. doi:10.1007/s11356-014-2585-5.
- Vignier, J., Volety, A. K., Rolton, A., Le Goïc, N., Chu, F. L. E., Robert, R., et al. (2017). Sensitivity of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) spermatozoa and oocytes to dispersed oil: Cellular responses and impacts on fertilization and embryogenesis. *Environ. Pollut.* 225, 270–282. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.052.
- Vijendravarma, R. K., Narasimha, S., and Kawecki, T. J. (2010). Effects of parental larval diet on egg size and offspring traits in *Drosophila*. *Biol. Lett.* 6, 238–241. doi:10.1098/rsbl.2009.0754.
- Vogeler, S., Bean, T. P., Lyons, B. P., and Galloway, T. S. (2016). Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC Dev. Biol.* 16, 1–13. doi:10.1186/s12861-016-0129-6.
- Volety, A., Boulais, M., Donaghy, L., Vignier, J., Loh, A. N., and Soudant, P. (2016). Application of Flow Cytometry to Assess Deepwater Horizon Oil Toxicity on the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* Spermatozoa. *J. Shellfish Res.* 35, 91–99. doi:10.2983/035.035.0111.
- Völker, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M., and Oehlmann, J. (2013). Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three *Daphnia* Species in Acute, Chronic and Multi-Generation

Experiments. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0075026.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., and Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335. doi:10.1021/es302332w.

Vroom, R. J. E., Koelmans, A. A., Besseling, E., and Halsband, C. (2017). Aging of microplastics promotes their ingestion by marine. *Environ. Pollut.* 231, 987–996. doi:10.1016/j.envpol.2017.08.088.

- W -

Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., et al. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26, 1–9. doi:10.1186/s12302-014-0012-7.

Wagner, S., and Reemtsma, T. (2019). Things we know and don't know about nanoplastic in the environment. *Nat. Nanotechnol.* 14, 300–301. doi:10.1038/s41565-019-0424-z.

Walczak, A. P., Kramer, E., Hendriksen, P. J. M., Tromp, P., Helsper, J. P. F. G., van der Zande, M., et al. (2015). Translocation of differently sized and charged polystyrene nanoparticles in in vitro intestinal cell models of increasing complexity. *Nanotoxicology* 9, 453–461. doi:10.3109/17435390.2014.944599.

Wang, F., Bexiga, M. G., Anguissola, S., Boya, P., Simpson, J. C., Salvati, A., et al. (2013). Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale* 5, 10868–76. doi:10.1039/c3nr03249c.

Ward, J. E., and Kach, D. J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002.

Ward, J. E., and Shumway, S. E. (2004). Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 300, 83–130. doi:10.1016/j.jembe.2004.03.002.

Watts, A. J. R., Lewis, C., Goodhead, R. M., Beckett, S. J., Moger, J., Tyler, C. R., et al. (2014). Uptake and Retention of Microplastics by the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8823–8830. doi:10.1021/es501090e.

Watts, A. J. R., Urbina, M. A., Corr, S., Lewis, C., and Galloway, T. S. (2015). Ingestion of Plastic Microfibers by the Crab *Carcinus maenas* and Its Effect on Food Consumption and Energy Balance. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14597–14604. doi:10.1021/acs.est.5b04026.

Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., and Koelmans, A. A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2490–2497. doi:10.1002/etc.1984.

Weltje, L., and Sumpter, J. P. (2017). What Makes a Concentration Environmentally Relevant? Critique and a Proposal. *Environ. Sci. Technol.* 51, 11520–11521. doi:10.1021/acs.est.7b04673.

Wheeler, K., and Whittam, R. (1970). ATPase activity of the sodium pump needs phosphatidylserine. *Nature* 225, 449–450.

White, J. R. (2006). Polymer ageing: physics, chemistry or engineering? Time to reflect. *Comptes Rendus Chim.* 9, 1396–1408. doi:10.1016/j.crci.2006.07.008.

- Wieczorek, A. M., Croot, P. L., Lombard, F., Sheahan, J. N., and Doyle, T. K. (2019). Microplastic Ingestion by Gelatinous Zooplankton May Lower Efficiency of the Biological Pump. *Environ. Sci. Technol.*, acs.est.8b07174. doi:10.1021/acs.est.8b07174.
- Wilson-Leedy, J. G., and Ingermann, R. L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003.
- Woodall, L. C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G. L. J., Coppock, R., Sleight, V., et al. (2014). The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. Open Sci.* 1, 140317–140317. doi:10.1098/rsos.140317.
- Wright, S. L., and Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ. Sci. Technol.* 51, 6634–6647. doi:10.1021/acs.est.7b00423.
- Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013a). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23, R1031–R1033. doi:10.1016/j.cub.2013.10.068.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013b). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 178, 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- WWF (2019). Stoppons le torrent de plastiques !
- Wylie, C. (1999). Germ Cells. *Cell* 96, 165–174. doi:10.1016/S0092-8674(00)80557-7.

- X -

- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I., and Nel, A. E. (2008). Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* 2, 85–96. doi:10.1021/nn700256c.
- Xie, J., Yang, D., Sun, X., Cao, R., Chen, L., Wang, Q., et al. (2017). Individual and Combined Toxicities of Benzo[a]pyrene and 2,2",4,4"-Tetrabromodiphenyl Ether on Early Life Stages of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 582–588. doi:10.1007/s00128-017-2164-9.

- Y -

- Yang, S. P., Bar-Ilan, O., Peterson, R. E., Heideman, W., Hamers, R. J., and Pedersen, J. A. (2013). Influence of Humic Acid on Titanium Dioxide Nanoparticle Toxicity to Developing Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4718–4725. doi:10.1021/es3047334.
- Yoisungnarn, T., Choi, Y.-J., Woong Han, J., Kang, M.-H., Das, J., Gurunathan, S., et al. (2015). Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci. Rep.* 5, 11170. doi:10.1038/srep11170.
- Yue, C., Li, Q., and Yu, H. (2018). Gonad Transcriptome Analysis of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Identifies Potential Genes Regulating the Sex Determination and Differentiation Process. *Mar. Biotechnol.* doi:10.1007/s10126-018-9798-4.
- Yurchenko, O. V., Skiteva, O. I., Voronezhskaya, E. E., and Dyachuk, V. A. (2018). Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Front. Zool.* 15, 10. doi:10.1186/s12983-018-0259-8.

Yusof, A. M., Yanta, N. F., and Wood, A. K. H. (2004). The use of bivalves as bio-indicators in the assessment of marine pollution along a coastal area. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 259, 119–127. doi:10.1023/B:JRNC.0000015816.16869.6f.

- Z -

Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., et al. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 13, 4–17. doi:10.1016/j.ancene.2016.01.002.

Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 130619162220002. doi:10.1021/es401288x.

Zhang, C., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., Wang, D., and Wang, M. (2019). Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53, 8426–8436. doi:10.1021/acs.est.9b02525.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., et al. (2012a). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413.

Zhang, H., Kuo, Y. Y., Gerecke, A. C., and Wang, J. (2012b). Co-release of hexabromocyclododecane (HBCD) and nano- and microparticles from thermal cutting of polystyrene foams. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10990–10996. doi:10.1021/es302559v.

Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., et al. (2017). Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environ. Pollut.* 231, 541–548. doi:10.1016/j.envpol.2017.08.058.

Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., and Crittenden, J. (2009). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Res.* 43, 4249–4257. doi:10.1016/j.watres.2009.06.005.

Zhao, L., Qu, M., Wong, G., and Wang, D. (2017). Transgenerational toxicity of nanopolystyrene particles in the range of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Nano* 4, 2356–2366. doi:10.1039/C7EN00707H.

Zhao, S., Ward, J. E., Danley, M., and Mincer, T. J. (2018). Field-Based Evidence for Microplastic in Marine Aggregates and Mussels: Implications for Trophic Transfer. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11038–11048. doi:10.1021/acs.est.8b03467.

Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., and Li, D. (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: First observations on occurrence, distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 86, 562–568. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.032.

Titre : Impacts des nanoplastiques et microplastiques sur les jeunes stades de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Mots clés : Huître, jeunes stades de vie, microplastiques, nanoplastiques, toxicité

Résumé : Depuis 70 ans, les débris plastiques dont la fin de vie a été négligée par les sociétés humaines s'accumulent dans les océans. L'évaluation des effets engendrés par cette contamination ubiquitaire est une préoccupation majeure, notamment au regard des micro- et potentiels nanoplastiques (MNP ; < 5 mm) du fait de leur biodisponibilité pour la plupart des organismes marins. L'objectif de cette thèse était de déterminer les effets des MNP sur les jeunes stades de vie d'une espèce ingénieuse des habitats côtiers, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les impacts des MNP sur ces jeunes stades sont apparus dépendants de la taille des particules. Le rapport surface/volume important des nanosphères de polystyrène (nano-PS ; 50 nm) a favorisé les interactions avec les gamètes et embryons, induisant une inhibition de la fécondation et de l'embryogénèse tandis que les microsphères (0,5 et 2 µm) n'ont causé aucun effet phénotypique visible. La toxicité des nano-PS est apparue dépendante de leurs propriétés de surface (e.g. groupements chimiques, charge) qui dirigent leur

agrégation dans l'eau de mer et les interactions avec les membranes biologiques. Les nano-PS cationiques, qui restent à l'échelle nanométrique dans l'eau de mer, sont à l'origine des effets toxiques les plus marqués. L'exposition embryonnaire à une dose non létale a notamment diminué les performances larvaires et modulé la réponse de la génération suivante à une réexposition embryonnaire. Toutefois, ces effets néfastes sont observés à des concentrations numériques supposément non-représentatives de l'environnement actuel (la quantité de NP n'étant pas caractérisée en mer à ce jour), suggérant un risque limité des micro- et nanosphères de polystyrène sur les jeunes stades de *C. gigas*. Les prochaines études devront tenir compte de la complexité et de la réalité des MNP environnementaux (e.g. polymères, formes, contaminants adsorbés, concentrations) sur plusieurs générations de bivalves dans le but d'appréhender plus précisément le risque pour les écosystèmes côtiers.

Title: Impacts of micro- and nanoplastics on early life stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Keywords: Oyster, early life stages, nanoplastics, microplastics, impacts

Abstract: For 70 years, mismanaged plastic waste accumulates in the oceans. Risk assessment of this contamination is a major concern, especially regarding micro- and presumably nanoplastics (MNP; <5 mm) which are bioavailable for most marine species. The objective of this thesis was to assess adverse effects of MNP to early life stages of the oyster *Crassostrea gigas*, a key engineer species in coastal ecosystems. MNP toxicity on oyster young stages depended on the particle size. The high surface area-to-volume ratio of polystyrene nanobeads (nano-PS; 50 nm) promoted their reactivity and interactions with biological membranes of gametes and embryos, leading to an inhibition of the fertilization and embryogenesis success while 0.5 and 2 µm polystyrene beads had any detectable effects. The nano-PS toxicity depended on the particle surface properties (e.g. surface functionalization and charge) which govern their aggregation in seawater and affinity with biological membranes. Furthermore, cationic nano-PS, which

remained at nanometric scale in seawater, had the highest toxic potential to oyster gametes and embryos. Embryonic exposure to these particles at a non-lethal dose reduced first generation larval performances and modulated larval growth at the second generation in response to the same embryonic exposure. All adverse effects were observed at supposedly unrealistic environmental concentrations (no *in situ* data exists on NP), suggesting low risk of polystyrene beads to oyster early life stages. Future studies will have to take into account the complexity and reality of MNP in oceans (e.g. polymer and shape diversity, concentrations, contaminants adsorption) to assess effects on bivalve species across generations in order to establish more accurately the risks for coastal environments.