UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux (LIEC)
UMR 7360 CNRS
Metz

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie
Ressources Procédés Produits
Environnement (RP2E ED) 410
Nancy

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'université de Lorraine
Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, écosystèmes

Jennifer ANDREI

Effets (sub)individuels et fonctionnels des nanoparticules manufacturées sur des Crustacés Gammaridae

Soutenue le 18 Décembre 2015 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse :	François Guérold	Université de Lorraine - UMR 7360 CNRS – LIEC
Co-directeur de thèse :	Sandrine Pain-Devin	Université de Lorraine - UMR 7360 CNRS – LIEC
Rapporteurs :	Catherine Mouneyrac	Université Catholique de l'Ouest - Université de Nantes - MMS
Rapporteurs :	Eric Pinelli	Université de Toulouse - ENSAT – ECOLAB
Examinateurs :	Laure Giambérini	Université de Lorraine - UMR 7360 CNRS – LIEC
Examinateurs :	Agnès Richaume Jolion	Université Claude Bernard Lyon 1 - ig2e

A mes parents, tout naturellement…

Remerciements,

Dans la folie des derniers instants que représentent la rédaction de ce manuscrit de thèse, je prends le temps de m'installer tranquillement pour repenser à ces trois dernières années … Une thèse c'est un peu comme un saut en parachute. On est content d'y aller et plus on se rapproche du moment où il va falloir sauter plus on est envahi par un sentiment de crainte, la peur de l'inconnu. Les instructeurs nous rassurent, nous disent qu'ils seront là et que tout va bien se passer, alors on saute la peur au ventre. Et puis on atterrit avec cette agréable sensation d'avoir vécu quelque chose d'extrêmement fort et enrichissant, mais qui est passé beaucoup trop vite.

Mes premières pensées vont immédiatement pour mes deux directeurs de thèse **François Guérold** et **Sandrine Pain-Devin**. Quel beau duo j'ai eu la chance de côtoyer durant ces années. Un bel équilibre s'est installé entre nous propice au travail, aux échanges scientifiques et aux débats. Merci de m'avoir guidé et de m'avoir permis d'être autonome tout en me sentant épaulée. Un seul et même sentiment ne m'a pas lâché durant ces 3 années : je n'aurais pu tomber mieux. **François**, merci pour ton calme qui apaise, d'avoir été de bons conseils et de bonnes idées. Un énorme merci à **Sandrine**, pour ta joie de vivre incarnée, toujours de bonne humeur, souriante et disponible. Nos longues discussions mélangeant l'aspect scientifique à l'humain m'ont été d'une aide précieuse.

Je souhaiterais adresser de sincères remerciements aux membres du jury : **Catherine Mouneyrac**, **Eric Pinelli**, **Agnès Richaume Jolion** et **Laure Giambérini** pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Et également à la direction du LIEC, **Fabien Thomas** et **Pascale Bauda** pour m'avoir accueilli dans un climat détendu au sein de leur laboratoire.

Un grand merci à **Simon Devin** pour son implication statistiquement significative dans mon travail, pour tous les bons gâteaux multicolores et cette disponibilité et bonne humeur sans faille qui te qualifie bien. Sais-tu qu'entre doctorants on t'appelle « papa » ? Je pense bien évidemment aussi à **Vincent Felten,** le roi du gammare ; merci pour le travail effectué en collaboration. Mais surtout pour toutes les heures interminables de tri des organismes, où ta patience a été mise à rude épreuve, et où tu m'as montré tout l'amour que tu éprouves pour les gammares. Merci aussi à **Laure Giambérini** pour m'avoir intégrée à cet impressionnant projet, pour sa bienveillance maternelle, et son dynamisme exaltant. Et un grand merci aussi à **Jonathan Bouquerel** pour ses aides ponctuelles sur le terrain et pour les longues heures passées en chambre froide à triturer du gammare. Et puis merci à **Marine**, coéquipière de choc et couturière hors pair. Je pense aussi à ces personnes qui participent à la bonne entente du laboratoire et qui ont grandement participé à mon épanouissement au sein de ce laboratoire : **Philippe Wagner** et son impressionnante culture, **Christophe Pagnout** et ses blagues si particulières, **Philippe Rousselle** et cette merveilleuse sortie astronomie passée la tête dans les étoiles. Sans oublier **Michaël** et **Florence Danger** toujours de bons conseils. Merci aussi à **Etienne Morhain**, **Jean-François Poinsaint**, **Romain Couleau**, **Elise Billoir**, **Floriane Laras**, **Céline Vellinger**, **Davide Vignati**, **Elisabeth Gross**, **Delphine Aran**, **Pascal Poupin**, **Marie-Christine Peltre**, **Carole Cossus-Leguille**, **François Rodius**, **Sylvie Cotelle** et **Jean-François Masfaraud**.

Une pensée également à **Elisabeth Meyer**, **Isabelle Abildtrup**, **Catherine Drui**, **Valérie Grybowski** et la gentille **Nathalie**. Je souhaiterais aussi exprimer ma reconnaissance au Labex RESSOURCES 21, à la région Lorraine pour leur soutien financier, merci également à la Zone Atelier Moselle. Mes remerciements vont

également à **Jean-Yves Bottero** coordinateur du projet ANR P2N MESONNET dans lequel ma thèse s'est intégrée et pour m'avoir permis de participer à la réunion annuelle du CEINT à Duke. Merci aussi aux autres membres de l'équipe CEREGE d'Aix-en-Provence, **Mélanie Auffan**, **Jérôme Labille**, **Marie Tella** et **Perrine Chaurand** pour m'avoir accueilli quelques jours dans votre laboratoire. Merci également aux membres du LIST (Luxembourg), **Cédric Guignard**, **Kahina Mehennaoui**, **Sébastien Cambier** et **Arno Gutleb** pour les dosages ICP-MS et les mesures au Nanosight et à **David Billet**, **Hervé Marmier** et **Ana Tejedor.** La liste est longue, j'espère n'avoir oublié personne.

Enfin il y a les doctorants… Je me rappelle alors de mon arrivée dans cette petite ville de Metz, seule, à plus de 1000 km de toute famille et amis en espérant que les autres doctorants soient accueillants avec moi. Et puis, il y a eu ce grand type un peu bizarre prénommé **Pierre** qui m'a fait une blague pas drôle du genre « t'as rien contre les métaux lourds ». J'aurais pu fuir à ce moment-là, si je n'avais pas rencontré **Véronica** *(alias Véro)*, **Julio** *(alias Papo)***, Andréïna** *(alias Didier)*, **Evelyne** *(alias Eve)* **et Maël** *(alias Malouf)*. On a tous rapidement bien sympathisé et bien rigolé autour d'un café, d'une bière, d'un sirop, ou lors des nombreux repas chez Maël et **Faustine** *(alias Faufau)*. Le berthom est rapidement devenu un lieu stratégique pour nous et au fil du temps des chaises ont peu à peu été rajoutées pour accueillir **Crecre** *(alias Clément)*, **Carole** *(alias Gunter)***, Adeline, Emilie, Imad, Chaton** *(alias Marine)*, **Kevin, Anne, Alice** *(alias alicette),* **Nicolas, Fanny** sans oublier **Bénédicte** (*alias Béné*). C'est une grande et belle famille que nous avons réussi à former tous ensemble, où seuls l'humour et la bonne ambiance sont au rendez-vous. C'est en grande partie grâce à vous tous que je garderais à jamais un très bon souvenir de mon passage dans la région messine, somme toute empli d'émotion. C'est donc un grand merci que je vous adresse à tous. Et puis dans un groupe, il y en a toujours qui se détachent et qui jouent un rôle un peu plus important. Toujours là dans les bons moments, ces personnes sont aussi à nos côtés pour nous soutenir, nous remotiver, nous écouter, nous conseiller, nous épauler. C'est avec une émotion particulière que je vous en suis extrêmement reconnaissante. L'histoire prend un virage un peu serré, mais elle ne s'arrête pas là.

Une grande pensée aussi pour mes amies fidèles et qui ont su rester très présentes malgré la distance. Mes amies d'enfance **Alexia** et **Laetitia**, 16 ans déjà ; **Sophie** et **Anne-Cha**, quelle chance d'avoir toutes les trois eu la même erreur de parcours et **Melyssa**, c'est toi qui pars quand je reviens, la vie est parfois mal faite. Enfin, un immense merci à **Charlotte** pour son écoute, son calme et sa patience sans faille et sans limite.

Mes derniers remerciements vont bien évidemment à ma famille, les mots me manquent pour décrire à quel point votre soutien m'a été précieux. A ma mère **Monique** et à mon père **Denis,** merci de m'avoir guidé, soutenue et de n'avoir jamais douté de moi. Cette thèse vous l'avez subi vous-aussi jusqu'au tout dernier moment, et aujourd'hui elle est aussi un peu la vôtre. Merci à la fabuleuse recette de cannelés de ma mère qui m'a permis de faire sensation dès mon arrivée au laboratoire. Merci à ma grand-mère prénommée **Mamie Papillon** qu'il me tarde de retrouver ainsi qu'à mon grand frère **Damien** et à sa teigneuse de femme **Delphine** qui représentent pour moi le modèle à suivre. J'ai également une pensée pour ma belle-famille et leur bonne humeur quotidienne.

Enfin après un calcul rapide qui, je n'en crois pas mes yeux, m'informe qu'à nous deux on a passé environ 50 jours dans le train, merci à toi, **Simon** pour ce grain de folie qui t'anime et pour tout le reste…

SOMMAIRE

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des publications et communications

Introduction

CHAPITRE 1 5

Contexte scientifique 5

I. Les nanoparticules, contexte actuel 7

I.1. Les nanotechnologies : entre innovation, engouement économique et craintes sociétales..... 7

I.1.1. L'explosion des nanotechnologies 7

I.1.2. Définitions 9

I.1.3. Origine naturelle..... 11

I.1.4. Origine anthropique 12

I.1.4.1. Forme 12

I.1.4.2. Synthèse 13

I.1.4.3. Composition chimique du noyau 14

I.1.4.4. Surface spécifique 14

I.1.4.5. Enrobage 15

I.1.4.6. Fonctionnalisation 15

I.1.5. Intérêt et innovation 16

I.1.5.1. Nanoparticule et médecine (l'exemple de l'or) 16

I.1.5.2. Nanoparticule et confort de vie 17

I.1.6. Prise de conscience collective, crainte, éthique 18

I.1.7. Contexte législatif..... 19

I.2. Les nanoparticules d'argent (nAg)..... 19

I.2.1. Marché 19

I.2.2. Propriétés et utilisations des nAg..... 20

I.2.3. Synthèse, forme 22

I.2.4. Cycle de vie des nAg : de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau..... 23

I.2.4.1. Exemples de rejets des nAg via l'utilisation de nanoproduits 25
I.2.4.2. Comportement des nAg dans les stations d'épuration 26
I.2.4.3. Concentration dans les cours d'eau : limites techniques et modélisations 27
I.2.4.4. Transformation et dégradation des nanoparticules 28
I.2.4.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique 33
I.2.4.6. Entre représentation hygiéniste et crainte : le cas particulier de l'argent colloidal 40
I.3. Les nanoparticules de dioxyde de titane ($nTiO_2$) 41
I.3.1. Marché 41
I.3.2. Propriétés et utilisations 41
I.3.3. Synthèse, forme 42
I.3.4. Cycle de vie des $nTiO_2$: de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau 43
I.3.4.1. Exemple des rejets des $nTiO_2$ via l'utilisation de nanoproduits 43
I.3.4.2. Comportement des $nTiO_2$ dans les stations d'épuration 44
I.3.4.3. Concentration dans les cours d'eau : limites techniques et modélisation 44
I.3.4.4. Transformation et dégradation des $nTiO_2$ 45
I.3.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique 46
I.4. Les nanotubes de carbone (NTC) 47
I.4.1. Marché 47
I.4.2. Propriétés et utilisations 47
I.4.3. Synthèse, forme 47
I.4.4. Cycle de vie des NTC : de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau 48
I.4.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique 49
II. Organisme modèle : le gammare 51
II.1. Généralités 51
II.1.1. Systématique 51
II.1.2. Morphologie 51
II.1.3. Ecologie- Habitat 53
II.1.4. Plasticité alimentaire 53
II.1.5. Reproduction 53
II.1.6. Croissance, cycle de vie 55
II.1.7. Physiologie, respiration 55
II.2. Espèces 56

II.2.1. Identification 57
II.2 .2. Exigences environnementales 58
II.2.3. Les espèces invasives 58
II.3. Place, rôle dans les écosystèmes d'eau douce 60
II.3.1. Place dans le réseau trophique 60
II.3.2. Rôle fonctionnel 60
II.3.3. Importance des FPOM dans le cycle de la matière organique 61
II.4. Le gammare en écotoxicologie 62
III. Outils pour l'évaluation des risques : vers une approche plus environnementalement réaliste 63
III.1. Complexification des systèmes expérimentaux 63
III.1.1. Définition des microcosmes et des mésocosmes 63
III.1.2. Avantages et limites d'une démarche de complexification 64
III.2. Prise en compte des différentes échelles biologiques : des indicateurs cellulaires aux indicateurs fonctionnels 66
III.2.1. Les biomarqueurs cellulaires (défense antitoxique, défense antioxydante, dommage et réserve énergétique) 67
III.2.2. Les biomarqueurs individuels (physiologie et comportement) 70
III.2.3. Les indicateurs fonctionnels 71
CHAPITRE 2 73
Optimisation de la contamination – Matériel et Méthodes 73
I. Techniques de prélèvement, stockage et préparation de l'eau, des gammares et des feuilles avant leur utilisation expérimentale 75
I.1. Choix des sites d'étude : prélèvements d'eau, d'organismes et incubation des litières 75
I.1.1. L'eau des milieux d'exposition 75
I.1.2. Les Gammaridae comme organismes modèles 75
I.1.3. Les feuilles 79
I.2. Méthodologie de prélèvement *in situ*, de stockage en laboratoire et de préparation avant expérimentation 79
I.2.1. Filtration de l'eau 79
I.2.2. Acclimatation des gammares 80
I.2.3. Conditionnement *in situ* des feuilles 81
I.3. Le cas particulier des expériences en conditions plus complexes (Chapitre 4) 83

I.3.1. Expérience en condition plurispécifique (*G. roeseli* et *D. Polymorpha*) 83
I.3.2. Expériences en mésocosmes 83
II. Caractérisation des nanoparticules (Nanosight, Zetasizer, MET) 85
III. Comportement des nanoparticules, optimisation de la contamination 87
III.1. Tests d'adsorption et désorption sur les dispositifs 88
III.1.1. Choix des dispositifs de contamination 88
III.1.2. Mise en place du protocole de saturation 89
III.1.3. Luminosité 92
III.1.4. Test à l'eau déminéralisée 93
III.1.5. Dissolution des nanoparticules 94
III.2. Bilan d'optimisation de la contamination en microcosme 95
IV. Expositions des organismes 97
V. Concentrations en argent dans les feuilles et les gammares 103
VI. Mesures des biomarqueurs chez les gammares 103
VI.1. Mortalité 103
VI.2. Biomarqueurs (sub)cellulaires 103
VI.2.1. Préparation des homogénats 104
VI.2.2. Biomarqueurs de défenses antioxydantes et antitoxiques 105
VI.2.3. Biomarqueurs de dommage cellulaire 106
VI.2.4. Biomarqueurs de réserves énergétiques 107
VI.3. Biomarqueurs physiologiques 107
VI.3.1. Mesure de l'osmolalité 107
VI.3.2. Mesures de la consommation d'oxygène 107
VI.4. Biomarqueurs comportementaux 108
VI.4.1. Ventilation 108
VI.4.2. Locomotion 109
VI.5. Mesures des marqueurs fonctionnels chez le gammare 110
VI.5.1. Mesure de la consommation des gammares 110
VI.5.2. Production de FPOM par les gammares 110
VI.5.3. Différence entre consommation des gammares et production de FPOM 111
VII. Statistiques 113

CHAPITRE 3 117

Effets des nAg sur le genre *Gammarus* (Amphipoda) du niveau cellulaire au niveau fonctionnel 117

I. Effets des nanoparticules d'argent sur 3 espèces de gammares : *G. fossarum*, *G. pulex*, *G. roeseli* des niveaux cellulaire à fonctionnel – *Expérience 1(A)* 121

II. Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) – ***Expérience 1(B)*** – *Publication acceptée, Environmental Pollution* 139

III. Effets des nanoparticules d'argent sur 3 populations de gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* – *Expérience 2* 167

IV. Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology of *Gammarus roeseli* – *Expérience 3* *(Publication en preparation)* 177

CHAPITRE 4 209

Approche multibiomarqueur des effets biologiques à long terme des nAg, $nTiO_2$ et NTC sur *G. roeseli* 209

I. Etude des effets des $nTiO_2$ sur les gammares (*G. roeseli*) en fonction de leur hétéroagrégation dans deux types d'eau du Rhône naturellement chargées en matières organiques – *Expérience 4* 213

II. Expositions de *G. roeseli* dans des conditions en mésocosmes 221

II.1. Matériels et méthodes 221

II.2. Effets de deux types de nAg (plate et sphérique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli – Expérience 5* 223

II.3. Effets de deux types de $nTiO_2$ (anatase bâtonnet et anatase cubique) sur l'espèce *G. roeseli* – Expérience 6 243

II.4. Effets de deux types de NTC (avec ou sans matière organique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* – Expérience 7 257

Discussion générale et perspectives 269

I. Vers une approche environnementalement réaliste 269

I.1. La mise en place de conditions réalistes en microcosme 269

I.2. La prise en compte de la variabilité inter et intraspécifique participe au réalisme environnemental 271

I.3. Vers une complexification des dispositifs d'exposition : des microcosmes aux mésocosmes 272

I.4. Une étude des effets des nanoparticules à plusieurs niveaux d'organisation 277

I.5. Intérêt d'une double approche écotoxicologique et écologique 282

II. Des effets dépendants de la composition mais aussi de la taille et de la forme des nanoparticules : la représentation dose/effet est-elle systématiquement la plus cohérente ? 283

II.1. Des effets fonction de la taille, de la forme et de la composition des nanoparticules 284

II.2. Effet en fonction de la masse, du nombre ou de la surface 286

III. Les limites, points à développer et poursuites envisageables 287

III.1. Les limites techniques 287

III.2. Manques et poursuites envisageables 287

Liste des abréviations

ACP : Phosphatase acide
Ag^0 : Atome d'argent
$AgNO_3$: Nitrate d'argent
Ag_2O : Argent oxydé
Ag_2S : Sulfure d'argent
$CaCl_2$ $2H_2O$: Chlorure de Calcium dihydraté
CAS: Caspase
CAT : Catalase
CEDEF : Centre de documentation économie-finance
CL50 : Concentration létale pour 50% des organismes
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMSO : Dimethyl Sulfoxide
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EDX : Spectre à rayons X à dispersion d'énergie
EHS : Environmental, health and safety
ENM : Nanomatériaux manufacturés
ENP : nanoparticules métalliques manufactures
ETS : Système de transport d'électron
FPOM : Particule fine de matière organique
GIA : Global industry analyst
GPxtot : Glutathion péroxydase totale
GST : glutathion-S-transférase
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HNO_3 : Acide nitrique
ICP-MS : Spectométrie de masse (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy)
ISO : International Organization for Standardization
LOOH : Hydroperoxydes lipidiques
LPO : Peroxydation lipidique ou lipoperoxydation
MDA : Malondialdéhyde
MET : Microscopie électronique à transmission
MT : Métallotionéines
MWNT : Nanotube multi-parois (multi-walled nanotube)
MXR : Résistance multixénobiotique
nAg : Nanoparticule d'argent
NanoSIMS : Spectrométrie de masse à ions secondaires
NNI : National nanotechnology initiative
NTA : Nanoparticle Tracking Analysis
NTC : Nanotube de carbone
$nTiO_2$: Nanoparticules de dioxyde de titane

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
PEC : Concentration environnementale prédictible
PEG : Polyethylene glycol
PEN : Project on emerging nanotechnologies
PNEC : Predicted No Effect Concentration
PO_2 : Pression partielle en oxygène
PVP : Polyvinylpyrrolidone
ROS : Espèce réactive de l'oxygène
SAA : Spectrométrie d'absorption atomique
SEM : Microscopie élecronique à balayage
S.I.E.R.M : Système d'information sur l'Eau Rhin-Meuse
SOD : Superoxyde dismutase
STEP : Station d'épuration
SWNT : Nanotube monoparoi (single walled nanotube)
TAC : Capacité totale antioxydante
ZnO : Nanoparticule d'oxyde de zinc

Liste des tableaux

Tableau 1: Etudes rapportant des données d'écotoxicité des nAg sur les orgnanismes aquatiques. 36

Tableau 2 : Paramètres physicochimiques (pH, Conductivité, Oxygène dissous, Matières en suspension) mesurés entre 2005 et 2013 et qualité générale en 2013 établie par l'Agence de l'eau Rhin-Meuse et consultables sur le site du S.I.E.R.M (Annexe 1). 78

Tableau 3 : Paramètres étudiés (MXR : n=9 ; Osmolalité : n=10 ; Ventilation : n=10 et Locomotion : n=10) et résultats mesurés chez G. fossarum mâles, 1 et 7 jour après la fin de leur acclimatation dans la même eau que celle de la rivière dans laquelle ils ont été prélevés : La Maix, ou dans une autre eau : La Méholle. L'astérisque correspond à une différence significative entre les deux types d'acclimatation 81

Tableau 4 : Paramètres physicochimiques (Température, pH, Conductivité, Oxygène dissous, Matières en suspension et Carbone organique) mesurés entre 2012 et 2013. D'après des mesures établies par l'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée et consultables sur le site du S.I.E.R.M (http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/donnees-documents/). 83

Tableau 5 : Caractéristiques des solutions stocks des nanoparticules d'argent étudiées lors des expositions en microcosmes. La dernière ligne représente les « modes » du diamètre hydrodynamique mesuré dans de l'eau milliQ à l'aide du Nanosight. NR : Non renseigné. 86

Tableau 6 : *Moyennes des concentrations (± écart-types) mesurées en argent total et dissous (n=3) dans l'eau (sans organisme ni feuille) après 24h et 72h d'une exposition aux nAg (10 nm et 60 nm de diamètre). LD : limite de détection de l'instrument (0.1 µg.L^{-1}).* 95

Tableau 7: Bilan des paramètres fixés et testés dans les diverses études d'optimisation de la contamination en contamination. 95

Tableau 8 : Bilan des expériences effectuées et des marqueurs mesurés en contamination simples en microcosmes, V signifie que le paramètre a été mesuré alors que X signifie que le marqueur n'a pas été étudié. 98

Tableau 9 : Bilan des expériences effectuées et des marqueurs mesurés en contamination simples en microcosmes, V signifie que le paramètre a été mesuré alors que X signifie que le marqueur n'a pas été étudié. 100

Tableau 10 : Moyennes (± écart-types) des concentrations en argent total mesurées dans les solutions mères avant le lancement des tests et après 24h et 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. (<LD : sous la limite de détection de l'instrument : 0.1µg.L^{-1}). . 123

Tableau 11 : Résultats des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl signifie degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives (p<0,05). 124

Tableau 12 : Moyennes (± écart-types) des différents valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur les 3 populations de G. roeseli exposées pendant 72h à 0, 0,5 et 5 µg.L^{-1} d'argent sous forme de $AgNO_3$ et aux nAg de 10 et 60 nm de diamètre. 170

Tableau 13 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl signifie degré de liberté, la valeur en gras est significative. 171

Tableau 14 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli exposé dans deux types d'eau (Arles et Jons) pendant 24 h (J1) et 96 h (J4)72h à 0, 0,1 et 1 mg.L^{-1} de $nTiO_2$. Aucune différence significative due aux $nTiO_2$. 217

Tableau 15 : Résultats des Analyses de variance (Anova) à 3 facteurs effectuées pour les différentes mesures de biomarqueurs. Ddl signifie degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives. 218

Tableau 16 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur les G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux nAg plate et sphérique qui correspondent respectivement à des concentration en argent appliquée de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. 229

Tableau 17 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives. 230

Tableau 18 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conservés pour la LDA. 230

Tableau 19 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux nTiO2 AB et AC qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 0,5, 0,8 et 1 mg.L^{-1}. 248

Tableau 20 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives. 249

Tableau 21 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conserver pour construire la LDA. 249

Tableau 22 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux NTC qui correspondent respectivement à des concentration en argent appliquée 0,4, 0,7 et 1 mg.L^{-1}. 261

Tableau 23 : *Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives.* 262

Tableau 24 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conservés pour construire la LDA. 262

Tableau 25 : Bilan des réponses des biomarqueurs étudiés dans différentes conditions d'exposition (des microcosmes aux mésocosmes) chez les gammares (3 espèces et 3 populations) aux différents niveaux d'organisation (cellulaire, physiologique, individuel et fonctionnel), pour 3 compositions de nanoparticules testée (nAg, $nTiO_2$ et NTC) de taille et de formes différentes. Les flèches vertes indiquent une augmentation ou diminution des réponses suite à l'exposition aux nanoparticules à au moins une des concentrations d'exposition appliquées. Des croix rouges indiquent une absence de réponse aux conditions testées. 278

Liste des figures

Figure 1: A : Evolution du nombre de produits contenant des nanoparticules sur le marché mondial de consommation ; B : en fonction la localisation géographique entre 2005 et 2013 selon l'inventaire du PEN mis à jour en Octobre 2013 (D'après The Project on Emerging Nanotechnologies). 8

Figure 2 : Carte de superposition des domaines scientifiques impliqués dans la recherche sur les Nano EHS. Les disciplines possédant des caractéristiques similaires sont positionnées à proximité. Les dimensions des sphères sont proportionnelles au pourcentage de publications scientifiques dans le domaine (Klaine et al., 2012 d'après la méthode de Rafols et al., 2010). 9

Figure 3 : Nomenclature et hiérarchie des termes employé dans le domaine des nanotechnologies (Adapté de Gaffet, 2008 et ISO, 2015). 11

Figure 4 : Aire de surface en fonction du nombre et de la taille des nanoparticules pour une masse d'or équivalente (adapté de Klaine et al., 2012). 15

Figure 5 : Exemple de structure de nanoparticules sphériques évitant leur agrégation dans un milieu. L'enrobage et/ou la fonctionnalisation peuvent permettre une répulsion électrostatique s'ils présentent des charges et/ou un encombrement stérique si la molécule est de taille relativement importante. 16

Figure 6 : Nombres de produits incorporant des nanoparticules composées de différents matériaux selon l'inventaire du PEN mis à jour en Octobre 2013 (D'après The Project on Emerging Nanotechnologies). ... 20

Figure 7 : *A : Distribution des catégories de produits incluant des nAg ; B : Distribution spécifique de la catégorie santé et remise en forme (D'après Fauss, 2008).* 21

Figure 8 : *Photos en microscopie électronique à transmission (TEM) de nanoparticules d'argent de différentes formes synthétisées par différents protocoles. A : nAg de différentes forme ; B : nAg sphériques ; C : nAg principalement en bâtonnets; D : nAg en nanoplaques triangulaires tronquées. Photos tirées de* Pal et al. (2007). 23

Figure 9 : Structure générale du modèle de rejet des nanoparticules (ENM : engineered nanomaterial, nanomatériaux manufacturés) à différentes étapes de production, d'incorporation dans des produits et d'utilisation/application. Rejets directs dans la technosphère (stations d'épuration, usines d'incinération des déchets, décharges et processus de recyclage) et dans l'écosphère (air, sol, eau, sédiment). Rejet indirects de la technosphère vers l'écosphère. Schéma tiré de Sun et al. (2014). 24

Figure 10 : A : Flux de transport et distribution des nAg en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 32,4 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des nAg dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en

noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014). 28

Figure 11 : *Représentation des transformations chimiques potentielles sur les nAg affectant leur comportement dans le milieu. L'épaisseur des flèches correspond à la probabilité de la réalisation du processus. La couleur grise correspond à l'Ag^0, le violet à l'Ag_2O et le noir à l'Ag_2S.* 31

Figure 12 : *Représentation d'une transformation physique potentielle des nAg : l'agrégation pouvant affecter leur comportement dans le milieu. L'épaisseur des flèches correspond à la probabilité de la réalisation du processus. D'après (Lowry et al., 2012b).* 32

Figure 13 : *Concentrations en titane mesurées dans divers produits fréquemment consommés. Les barres d'erreur représentent les écart-types pour les échantillons traités en triplicats. Figure tirée de Weir et al. (2012).* 42

Figure 14 : *A : Flux de transport et distribution des $nTiO_2$ en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 10 200 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des n TiO_2 dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014).* 45

Figure 15 : *A : Illustration des structures en fauteuil (armchair) et en zig-zag des NTC monoparoi (d'après Thostenson et al., 2001) ; B : Photo de microscopie électronique à haute résolution de NTC multiparois comportant 5, 2 et 7 feuillets pour les photo a, b et c respectivement (d'après Iijima, 1991).* 48

Figure 16 : *A : Flux de transport et distribution des NTC en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 377 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des NTC dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014).* 49

Figure 17 *: Vue latérale d'un Gammarus. Les numérotations de 1 à 7 ; I à III et a à b correspondent respectivement aux métamères du mésosome, métasome et urosome. pc, plaque coxale ; gn, gnathopode ; pe, péréiopode. Dessin modifié de C. Goergel et E. Walter (association CINCLE).* 52

Figure 18 : *A : Vue latérale d'un gammare mâle et d'un gammare femelle appartenant à l'espèce G. roeseli en précopulat. Source : J. Andreï ; B : Dessin du Propode et du Dactyle hypertrophié d'un gammare mâle d'après Chevreux and Fage, (1925).* 54

Figure 19 : *Vues latérales de gammares femelles appartenant à l'espèce G. pulex portant des œufs à différents stades de maturation (A, B) puis au stade ultime où les juvéniles nagent hors du marsupium (C). Source : J. Andreï.* 55

Figure 20 : Diagrammes montrant l'importance de l'épaisseur de la couche d'eau (R1) au contact de la branchie (R2) ainsi que l'importance du gradient de pression partielle en oxygène (PO_2 gradient) sur le taux de diffusion d'oxygène de l'eau vers le gammare. Adapté de Sutcliffe, (1984). 56

Figure 21 : Diagramme regroupant les distances entre 13 espèces de gammares en se basant sur 8 paramètres : 1) taille moyenne des femelles reproductrices ; 2) nombre d'œufs dans le marsupium ; 3) indice de fécondité (nombre d'œufs/taille de la femelle) ; 4) durée de la période de reproduction ; 5) âge de maturité ; 6) nombre de générations par an ; 7) tolérance à la salinité ; 8) tolérance à l'impact de l'homme. D'après (Grabowski et al., 2007). 57

Figure 22 : Détermination de G. fossarum, G. pulex et G. roeseli adaptée d'après (Felten, 2003; Mayer et al., 2012). 59

Figure 23 : *Dispositifs expérimentaux de A) 400 ml à B) 50 litres. Photos : J. Andreï* 64

Figure 24 : Schémas général illustrant les principales voies de défenses antioxydantes et antitoxiques ainsi que les voies de dommages cellulaires suite à l'entrée de nanoparticules métalliques ou d'ions métalliques dans une cellule. CAS = casapse, CAT = catalase, Cb = carbonylation, ENP = nanoparticules métalliques manufacturées, GPx = glutathion péroxydase, LMS = stabilité de la membrane lysosomale, LPO = lipoperoxydation, MDA = malondialdéhyde, MT = metallothionéine, Ox = oxydation, ROS = espèces réactives de l'oxygène, SOD = superoxyde dismutase, Ub = ubiquitination. Schémas initialement effectué pour les mollusques bivalves, adapté de Rocha et al. (2015). 69

Figure 25 : Localisation géographique et photographies des 3 sites de prélèvements des espèces de gammares et de l'eau utilisée lors des expositions en laboratoire. Sources : Google map (La Nied) ; A. Gossiaux (La Maix) et J. Andreï (La Méholle). 77

Figure 26 : Localisation géographique et photographies des 3 sites de prélèvements des populations de gammares appartenant à l'espèce G. roeseli. Sources :Google map. 78

Figure 27 : Protocole et étapes (de A à F) du conditionnement des feuilles sur le terrain. Sources : Jussieu.fr (feuille) ; J. Andreï 82

Figure 28 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h de contamination à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre contenus dans des dispositifs composés de Polystyrène Standard (PS) ou de Polypropylène (PP). 88

Figure 29 : Schémas des différents tests de protocole de saturation : Test A : jours 2 - 3 - 4 - 6- 7 : 24h de saturation + renouvellements et dosages quotidien. Test B : S2 - S4 - S6 : 48h de saturation + renouvellements et dosages toutes les 48h. Test C : J3- J6 : 72h de saturation + renouvellements et dosages toutes les 72h. Test D : 168h de saturation + renouvellement et dosage. 90

Figure 30 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h de contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre après différents tests de protocoles de saturation détaillés en Figure 29. 91

Figure 31 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24, 48 et 72h de contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre soumis à une lumière indirecte ou directe. 92

Figure 32 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h et 72h de contamination d'une eau déminéralisée à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre. 93

Figure 33 : Dissection des branchies de gammares (A : loupe binoculaire ; B : branchies). Sources : J. Andreï. 106

Figure 34 : Photos des mesures de consommation d'oxygène montrant le graphique en direct de perte d'oxygène du milieu (A) ; le système général du respiromètre (B) enceinte dans laquelle la mesure d'oxygène s'effectue (C). Sources : J. Andreï 108

Figure 35 : Photos des dispositifs de mesure de locomotion (A) et de ventilation des gammares (B). Sources : J. Andreï 109

Figure 36 : Principe de partitionnement de la variance par une analyse des redondances. 115

Figure 37 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 2 (Cf. Chapitre 2, tableau 8) 122

Figure 38 : *Moyennes (+ écart-types) des concentrations en argent total mesurées dans les feuilles d'aulne après 72h d'une exposition à l'$AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}, en présence ou en absence de gammares. Les groupes avec les mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents (test post-hoc TukeyHSD, n=3).* 124

Figure 39 : Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Au sein de chaque espèce, les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 125

Figure 40 : Moyennes (+ écart-types) des activités de transport MXR (n=9, émissivité en unité arbitraire) mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents 126

Figure 41 : Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents 127

Figure 42 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 128

Figure 43 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Au sein de chaque espèce, les groupes de mêmes lettrines en minuscule ne sont pas statistiquement différents. .. 129

Figure 44 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de A : Consommation des feuilles d'aulne, B : Production de FPOM et C : Différence entre consommation de feuilles et production de FPOM par les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 130

Figure 45 : Plan expérimental simplifié de l'expérience3, Cf.Chapitre 2, tableau 8) 168

Figure 46 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de consommation des feuilles d'aulne par les 3 populations de G. roeseli après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 populations, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une population. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 172

Figure 47 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de production de FPOM par les 3 populations de G. roeseli après 72 h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. 172

Figure 48 : Moyennes (+ écart-types) des calculs de différences entre la consommation de feuille et la production de FPOM pour les 3 populations de G. roeseli après 72 h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. 173

Figure 49 : Consommation d'oxygène de G. roeseli exposés à plusieurs tailles et concentration de nAg (n=4). Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents (anova à 1 facteur, TukeyHSD). 177

Figure 50 : Mesures des concentrations en argent total dosées dans les feuilles d'aulne après 72 h d'une exposition aux 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations : 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=1). 201

Figure 51: Moyennes (± écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 72 h d'exposition à 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=60). Les mesures relatives aux nAg 60 nm sont manquantes et les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 202

Figure 52 : Moyennes (± écart-types) des mesures de production de FPOM par les G. roeseli après 72 h d'exposition à 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=60). Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 203

Figure 53 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de consommation d'oxygène des gammares exposés aux 3 concentrations (0,5, 2,5 et 5 µg.L^{-1}) des 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60, et 100 nm), par rapport A) aux quantités de nAg ou B) à la surface totale de nAg introduites dans les milieux d'exposition. 205

Figure 54 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 4 (Cf. Chapitre 2, tableau 9) 214

Figure 55 : *A) Schéma d'un dispositif expérimental et B) Echelle de temps (1 intervalle = 1 semaine) et principales étapes de l'expérimentation.* 222

Figure 56 : Caractérisation des nAg sphériques (Sp-Ag) et plates (Pl-Ag) dans leurs solutions stocks. 224

Figure 57 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 5 (Cf.Chapitre 2, tableau 9) 225

Figure 58 : Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans l'eau des dispositifs d'exposition au jour J0 de l'introduction des gammares et après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent nominales appliquées de 12,5, 25, 38 et et 50 µg.L$^{-1.}$ Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 226

Figure 59 : Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L$^{-1.}$ Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 227

Figure 60 : Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent

appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L$^{-1.}$ Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 228

Figure 61 : A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition, n=3) sur les valeurs des 11 biomarqueurs et discriminée par 6 d'entre eux. B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, nAg plate et nAg sphérique à J7, J14 et J21. 231

Figure 62 : Moyennes (+ écart-types) des activités de transport MXR (n=9, émissivité en unité arbitraire) mesurées chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 232

Figure 63 : Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 233

Figure 64 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 234

Figure 65 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L-1. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 235

Figure 66 : Observation au MET des solutions stock des A : $nTiO_2$ anatase cubique (AB) d'une taille de 20-25 nm et B : des $nTiO_2$ anatase bâtonnet de 10 nm de large et 200 nm de long. Sources : C. Pagnout. .. 244
Figure 67 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 6 (Cf.Chapitre 2, tableau 9) 244

Figure 68 : Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et AC qui correspondent respectivement à des concentrations appliquées de 0,5, 0,8 et 1 mg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 246

Figure 69 : A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition) sur les valeurs des 11 biomarqueurs et discriminée par 7 d'entre eux (n=3). B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, nTiO2 AB et nTiO2 AC à J7, J14 et J21. 250

Figure 70 : Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les gammares après 7 et 14 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et $nTiO_2$ AC qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquée de 0,5, 0,8 et 1 mg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 251

Figure 71 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et aux $nTiO_2$ AC qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquées de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 252

Figure 72 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion des gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nTiO2 anatase bâtonnet (AB) et anatase cubique (AC) qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquées de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 253

Figure 73 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 7 (A, Cf.Chapitre 2, tableau 9)..... 258

Figure 74 : Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations appliquées de 0,4, 0,7 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 259

Figure 75 : A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition) sur les valeurs de 7 des 13 biomarqeurs (n=3). B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, NTC et NTC+MO à J7, J14 et J21. 263

Figure 76 : Moyennes (+écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC et NTC+MO appliquées de 0,4, 0,7 et 1 $mg.L^{-1}$. 263

Figure 77 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC appliquées de 0,4, 0,7 et 1 $mg.L^{-1}$. 264

Figure 78 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC appliquées de 0,4 et 0,7 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents. 264

Figure 79 : Schéma réprésentant la relation inversement proportionnelle entre une gamme de complexité écologique des études et leur maîtrise associée. Les expérimentations effectuées dans ce travail de thèse y ont été représentées en indiquant les différents paramètres participant à la complexité écologique ainsi que les niveaux d'orgnanisation étudiés et les limites observées. La représentativité des études menées sur les nanoparticules associée à la complexité écologique est figurés avec la flèche noire. Sources : J. Andreï. 273

Figure 80 : Moyennes (+écarts-types) des concentrations en protéines du broyat (A), en triglycérides (B) en protéines de la fraction cytosolique (C) et de l'activité enzymatique de la GST (D) mesurées sur un pool de 5 gammares avant (J0) et après 7, 14 et 21 jours d'exposition dans les dispositifs témoins de l'étude en

mésocosme portant sur les $nTiO_2$. Tests statistiques : Anova à un facteur suivi de TukeyHSD. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents 275

Figure 81 : Analyse discriminante couplant les réponses de 6 biomarqueurs mesurés sur G. roeseli, pour des gammares exposés à 4 concentrations (0, 0,5, 2,5 et 5 µg.L^{-1}) de 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) après 72h (n=4 ; Wilks p-value=1,7 10^{-5} ; taux d'erreur=0,56). 285

Liste des publications et communications

- **Publication internationale**

Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda).
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Vincent Felten, Simon Devin, Laure Giambérini, Kahina Mehennaoui, Sebastien Cambier, Arno C. Gutleb and François Guérold. *Acceptée dans Environmental Pollution*

Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology and ecology of *Gammarus roeseli.*
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Jonathan Bouquerel, Simon Devin, Kahina Mehennaoui, Sebastien Cambier, Arno C. Gutleb, Laure Giambérini and François Guérold. *En préparation*

- **Publications internationales en collaboration**

Gammarus fossarum (*Crustacea, Amphipoda*) as a model organism to study silver nanoparticles effects: link between physiological and behavioural responses.
Kahina Mehennaoui, Anastasia Georgantzopoulou, Vincent Felten, **Jennifer Andreï**, Maël Garaud, Sébastien Cambier, Tommaso Serchi, Sandrine Pain-Devin, Jean-Nicolas Audinot, Laure Giambérini, Arno C. Gutleb. *En préparation*

- **Communications orales internationales**

Individual and functional impacts of environmentally realistic silver nanoparticle exposures on *Gammarus sp* (Amphipoda).
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Vincent Felten, Maël Garaud, Laure Giambérini, Jean-François Poinsaint, Philippe Rousselle, Philippe Wagner et François Guérold**.** *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Setac Europe), 24th annual meeting, du 11 au 15 mai 2014, Bâle, Suisse*

Ecotoxicity of environmentally realistic silver nanoparticle concentrations : from individual to functional impacts on *Gammarus sp* (Amphipoda).
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Vincent Felten, Maël Garaud, Laure Giambérini, Jean-François Poinsaint, Philippe Rousselle, Philippe Wagner et François Guérold. *CEINT Annual Meeting, Duke University, du 22 au 23 mai 2014, Durham, Etats-Unis (invitation)*

Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology and ecology of *Gammarus roeseli*.
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Jonathan Bouquerel, Vincent Felten, Laure Giambérini, Simon devin et François Guérold. *9th Symposium for European Fresh Water Sciences (SEFS), Juillet 2015, Genève, Suisse*

- **Communications orales nationales**

Effet des nanoparticules sur Gammarus sp (Amphipoda) et sur ses performances fonctionnelles.

Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Vincent Felten, Maël Garaud, Philippe Rousselle, Laure Giambérini et François Guérold. *Séminaire annuel Ressources 21, Janvier 2013, Nancy*

Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology and ecology of *Gammarus roeseli*.
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Jonathan Bouquerel, Vincent Felten, Laure Giambérini, Simon devin et François Guérold. *Séminaire des doctorants, Juin 2015, Nancy*

Effets de différentes tailles de nanoparticules d'Argent sur le comportement et la physiologie de Gammarus sp.
Mehennaoui K., Georgantzopoulou A.,Cambier S., Garaud M., **Andreï J**., Felten V., Serchi T., Contal S., Ziebel J., Guignard C., Balachandran YL., Pain-Devin S., Giambérini L., Gutleb A.C. *Association pour la Recherche en Toxicologie (ARET), Mai 2014, Paris*

- **Communications affichées internationales**

NANOPARTICLES AND GAMMARIDS: from acute exposures to environmentally more relevant ones, toward a better detection of putative effects in natural environments.
Jennifer Andreï, Sandrine Pain-Devin, Vincent Felten, Joachim Ferro, Maël Garaud, Benoît Marchal, Kahina Mehennaoui, Judith Trapp & Laure Giambérini. *8th international conference of the environmental effects of nanoparticles and nanomaterials (ICEEN), Juillet 2013, Aix-en-Provence ET International conference: Health and Environment 2013 - Frontiers in Environmental Health Nanomaterials and Water - Friends or Foe (HENVI), Octobre 2013, Lucxembourg*

Impacts of environmentally realistic silver nanoparticle exposure on Gammarus roeseli (Crustacea Amphipoda) from individual to functional levels.
Andreï Jennifer, Bouquerel Jonathan, Guérold François, Devin Simon, Giambérini Laure and Pain-Devin Sandrine. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Setac Europe), 25th annual meeting, Mai 2015, Barcelone, Espagne*

Aquatic mesocosm study of cerium dioxide nanoparticle effects on micro-organisms and invertebrates.
Maël Garaud, **Jennifer Andreï**, Carole Bertrand, Nelly Brulé, Marie-André Dollard, Vincent Felten, Christophe Pagnout, Sandrine Pain-Devin, Jean François Poinsaint, François Rodius, Philippe Rousselle, Philippe Wagner et Laure Giambérini. *8th international conference of the environmental effects of nanoparticles and nanomaterials (ICEEN), Juillet 2013, Aix-en-Provence*

Nanotechnologies, risk perception, social and human sciences: an opened field to transdisciplinarity.
Atarodi, S., Gilibert, D., Schneider, B., Thiébaut, E., Toniolo, A.M., Paris, C., Grison, D., Guignard, L., Dalmasso, S., Chaimbault, P. Gaffet, E., Hehn, M., Rouxel, D., Vergnat, M., **Andrei J**., Garaud, M., Jomini, S., Caillet, C., Bennasroune, A., Cotelle, S., Cossu-Leguille, C., Pagnout, C., Giamberini, L., Bauda, P., Gaumet, J.J., & Lighezzolo-Alnot, J. *8th international conference of the environmental effects of nanoparticles and nanomaterials (ICEEN), Juillet 2013, Aix-en-Provence*

Overview of silver Engineered Manufactured Nanomaterials: fate and effects on several estuarine and freshwater invertebrate species using a multimarker approach

M. Garaud, **J Andreï**, C. Bertrand, N. Brulé, S. Devin, V. Felten, F. Guérold, C Mouneyrac, S. Pain-Devin, L. Poirier, C. Pagnout, JF. Poinsaint, P. Rousselle, B. Sohm, P. Wagner, A. Zalouk-Vergnoux et L. Giambérini. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry, (SETAC North America), 35th Annual Meeting, Novembre 2014, Vancouver, Canada*

MultiXenobiotic Resistance vs. Nanoparticles: is MXR a good biomarker of exposure? *An overview with zebra mussels and gammarids exposed to Ag and TiO_2 nanoparticle.s*
Marine Potet, **Jennifer Andreï**, Benoît Marchal, Maël Garaud, Simon Devin, Vincent Felten, Laure Giambérini, François Guérold, Sandrine Pain-Devin. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 25th annual meeting, Mai 2015, Barcelone, Espagne*

Surface and size-dependent effects of silver nanoparticles on *Gammarus fossarum*: link between physiological and behavioural responses.
K. Mehennaoui, A. Georgantzopoulou, S. Cambier, M. Garaud, **J. Andreï**, V. Felten, S. Contal, J. Ziebel, C. Guignard, YL. Balachandran, T. Serchi, S. Pain-Devin, L. Giambérini, A.C. Gutleb. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Setac Europe), 25th annual meeting, Mai 2015, Barcelone, Espagne*

- **Communications affichées nationales**

Effets des nanoparticules d'argent sur Gammarus sp. (Crustacea Amphipoda) et sur ses fonctions au niveau écosystémique.
Andreï Jennifer, Pain-Devin Sandrine, Guérold François, Felten Vincent, Rousselle Philippe et Giambérini Laure. *Séminaire annuel de l'école doctorale, Janvier 2014, Nancy*

Nanoparticules : comment évaluer leurs effets potentiels sur les milieux aquatiques ? Synthèse des avancées du programme MESONNET.
Sandrine Pain-Devin, Maël Garaud, Nicolas Couleau, **Jennifer Andreï**, Amar Bennasroune, Carole Cossu-Leguille, Vincent Felten, Christophe Pagnout, Laure Giambérini. *Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA), Juillet 2013, Thionville*

Introduction

Grâce aux avancées technologiques de ces dernières décennies, l'industrie des nanotechnologies fait désormais partie des plus florissantes et génère d'importants intérêts économiques. Une taille nanométrique associée à une augmentation de surface spécifique confère aux nanoparticules des propriétés inédites et étonnantes. Ces dernières sont très largement exploitées dans de nombreux secteurs tels que les industries électroniques, automobiles, cosmétiques, sanitaires ou encore en médecine. Il existe un panel impressionnant de nanoparticules de par leur composition chimique, leur taille, leur forme ou encore leur voie de synthèse et les produits incorporant des nanoparticules sont maintenant omniprésents dans notre quotidien.

Face à la production et à l'utilisation croissantes des nanoparticules, les questions relatives d'une part à l'évaluation des rejets de nanoparticules dans l'environnement et d'autre part à leurs effets potentiels sur les organismes et les écosystèmes sont désormais devenues des questions majeures qui animent la communauté des écologues et écotoxicologues.

Cependant le caractère « émergent » de ces contaminants particuliers implique pour l'instant un manque de moyens techniques pour quantifier en routine les émissions et les concentrations en nanoparticules. Quelques études ont toutefois révélées l'existence de rejets de nanoparticules dans l'environnement et plusieurs modélisations mathématiques ont établi des concentrations environnementales prédictibles (PEC) notamment dans les écosystèmes d'eau douce, soulevant de fait la possibilité d'une contamination des organismes aquatiques. Les premières expériences d'écotoxicité des nanoparticules sur ces organismes ont été élaborées à de très fortes concentrations bien au-dessus de ces PEC et ont montré l'existence d'effets pouvant être dus au matériel composant les nanoparticules. Cependant ces effets peuvent être modulés par des paramètres caractérisant les nanoparticules : leur taille, leur forme, leur enrobage ou encore leur charge électrique. De plus, les caractéristiques physicochimiques d'un milieu peuvent grandement transformer et dégrader les nanoparticules influant ainsi sur leur bioaccessibilité et biodisponibilité. De façon plutôt surprenante, les études d'écotoxicité représentent une part minime de l'ensemble des publications traitant des nanoparticules, et les expérimentations en conditions environnementalement réalistes demeurent très rares.

C'est dans ce contexte scientifique que le programme ANR P2N – MESONNET (2011-2015) s'est attaché à décrire et comprendre le devenir des nanoparticules en termes de transfert et de

transformation dans les milieux et dans les organismes vivants ainsi qu'à étudier leur écotoxicité. Au lieu d'étudier au cas par cas les effets d'un type de nanoparticule sur une espèce donnée, l'objectif de ce programme était de dégager et de mettre en évidence des scénarios généraux d'effets de ces composés afin de permettre une évaluation du risque mieux adaptée à leur comportement et leur dispersion dans l'environnement.

Ce programme s'est basé sur un travail de collaboration interdisciplinaire en associant des compétences en physicochimie, biogéochimie, écologie, écotoxicologie, microbiologie et biologie permettant de développer 5 grands domaines d'expertise (1/ Synthèse et caractérisation des nanoparticules, 2/ Exposition: transformation et réactivité des nanoparticules dans la colonne d'eau, 3/ Exposition: transfert dans les milieux poreux (sols, sédiments et biofilms), 4/ Devenir et impacts des nanoparticules dans des micro- et mésocosmes terrestres et aquatiques et 5/ Évaluation du risque par la modélisation et le cycle de vie). Pour cela le programme s'est construit au travers d'un réseau de 14 laboratoires partenaires français regroupant par exemple le CEREGE porteur du projet (Centre de Recherche et d'Enseignement des Géoscience de l'Environnement, Aix-en-Provence) ainsi que ECOLAB (laboratoire écologie fonctionnelle et environnement, Toulouse) et le LIEC (Laboratoire Interdisciplinanire des Environnements Continentaux, Metz). Il a aussi été développé en association avec un consortium américain CEINT (Center for Environmental Implication of Nanotechnology) qui regroupe 8 universités américaines conduites par l'université de recherche privée de Duke.

Certaines nanoparticules métalliques étant construites à partir de métaux stratégiques, la problématique développée dans ce doctorat s'est également inscrite dans le programme Ressources 21 qui est un Laboratoire d'Excellence porté par l'Université de Lorraine. Ce Labex a pour principaux objectifs de comprendre les processus de formation des gisements de métaux, et le cycle naturel et anthropique des métaux stratégiques, de développer des outils et des procédés innovants pour mieux maîtriser et exploiter les gisements et d'appréhender l'impact environnemental de ces métaux une fois disséminés dans l'écosystème.

Le travail présenté dans ce manuscrit porté sur l'étude des effets des nanoparticules les plus largement produites, les nanoparticules d'argent (nAg), de titane ($nTiO_2$) et de carbone (nanotubes, NTC) sur des Crustacés Amphipodes appartenant au genre *Gammarus*. Les gammares constituent un maillon important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques puisqu'ils y jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la matière organique détritique et donc, dans son incorporation dans les réseaux trophiques.

Les effets des nanoparticules sur les gammares ont été étudiés à différents niveaux d'organisation biologiques : niveau (sub)individuel et niveau fonctionnel. Pour cela, deux grands questionnements ont été découpés en plusieurs sous-parties :

- **La mise en place en condition simple (microcosmes) de scénario de contamination environnementalement réaliste à de faibles concentrations en nanoparticules permet-elle d'observer des effets des nanoparticules d'argent sur le genre *Gammarus sp* ?** Si oui, quel niveau d'organisation semble le plus impacté dans les conditions expérimentales fixées et quel(s) marqueur(s) semble(nt) être le(s) mieux adapté(s) pour évaluer, chez les gammares, les effets des nAg? Ces effets sont-ils dépendants de la taille des nAg ? Existe-t-il des patterns de réponses différents entre plusieurs espèces et populations ?

- **Une approche à plus long terme utilisant des systèmes plus complexes (mésocosmes) incluant des sédiments, un courant d'eau et d'autres espèces permet-elle d'évaluer de façon plus fiable les effets des nAg, $nTiO_2$ et NTC ?** Une approche multibiomarqueurs est-elle pertinente pour mettre en évidence et caractériser des effets biologiques ? Ces effets sont-ils dépendants de la composition, de la forme des nanoparticules et de la présence de matière organique ?

Pour répondre à ces questions, plusieurs bioindicateurs ont été étudiés : des biomarqueurs cellulaires de réponse antioxydante, antitoxique et de dommage ; des biomarqueurs individuels de physiologie et de comportement ainsi que des indicateurs fonctionnels de consommation et de production de FPOM (Fine particule de matière organique). Ensemble, ils ont permis d'observer, et d'essayer de comprendre les effets des nanoparticules sur les gammares afin d'évaluer leurs conséquences sur les écosystèmes d'eau douce.

Dans un premier temps, une synthèse bibliographique s'est intéressée au contexte scientifique dans lequel s'est déroulé cette thèse. Les méthodologies mises en place ainsi que les optimisations des protocoles de contamination développés pour mener l'ensemble des expérimentations sont ensuite détaillées. Puis, les résultats relatifs aux deux grands questionnements énoncés précédemment sont présentés, décrits puis interprétés. Enfin, ces résultats sont confrontés dans une discussion générale et plusieurs perspectives sont proposées.

CHAPITRE 1

Contexte scientifique

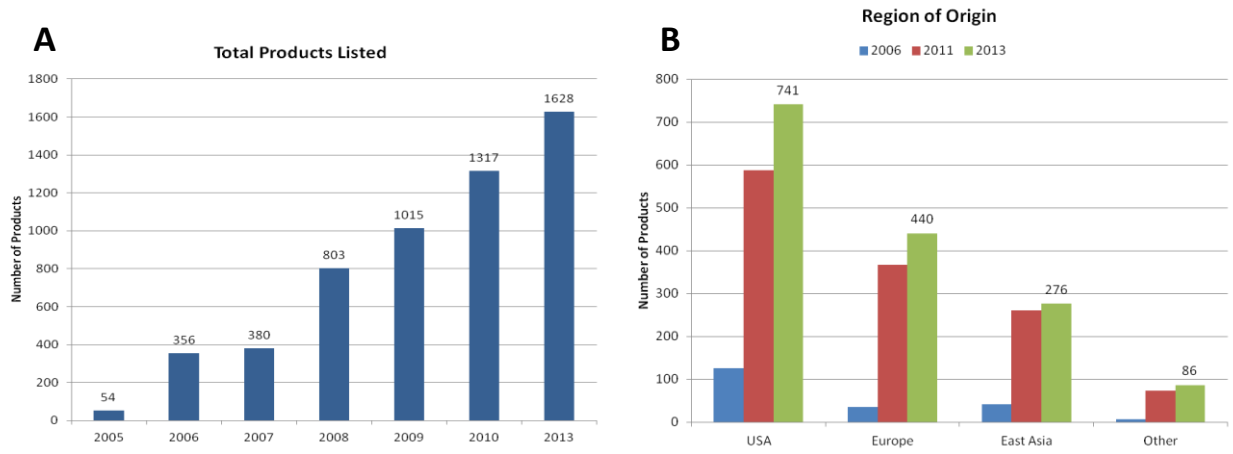
I. Les nanoparticules, contexte actuel

I.1. Les nanotechnologies : entre innovation, engouement économique et craintes sociétales

I.1.1. L'explosion des nanotechnologies

L'industrie des nanotechnologies a connu un essor tellement impressionnant qu'elle fait désormais partie des industries les plus florissantes de notre siècle et très certainement du siècle à venir. On peut alors se poser une simple question : sommes-nous à l'ère d'une nouvelle révolution nano-industrielle ? En effet, les produits issus des nanotechnologies sont omniprésents dans notre société de consommation. Selon le dernier inventaire effectué en Octobre 2013 par le centre international Woodrow Wilson, 1628 produits ont été introduits sur le marché entre les années 2005 et 2013 ce qui représente une augmentation de 24% par rapport à la dernière mise à jour effectuée entre 2005 et 2010 (Figure 1A ; Lovell, 2013). Cet inventaire s'intègre dans un projet collaboratif lancé en 2005 et dénommé « The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN)». Il a pour but de valoriser et d'évaluer objectivement le développement des nanotechnologies en identifiant les lacunes présentes par exemple dans les processus de réglementation afin de s'assurer que les risques pour la santé humaine et environnementale restent compris, anticipés voire limités (Rejeski, 2009). Ce projet est par ailleurs rapidement devenu une référence en termes d'informations sur le marché des nanotechnologies dans le monde puisqu'il se réfère à plus de 30 pays différents. Il nous apprend par exemple, que ce sont les Etats-Unis qui produisent et commercialisent le plus de produits incorporant des nanoparticules avec 741 produits en 2013 contre 440 en Europe et 274 en Asie de l'Est (Figure 1B; The Project on Emerging Nanotechnologies).

Cette surabondance de produits présents sur le marché a bien évidemment des retombées économiques très importantes. D'après le programme américain de recherche et de développement « National Nanotechnology Initiative » (NNI), les revenus mondiaux générés par les nanoproduits ont été estimés à 339 milliards de dollars en 2010 et à plus de 1 trillion de dollars en 2013 (National Science Foundation, 2014). Les cabinets d'étude de marché et de conseils stratégiques Global Industry Analysts, Inc (GIA) et Lux Research ont estimé que ces revenus allaient atteindre 2 à 3 trillions de dollars en 2015 et 4.4 trillions de dollars en 2018 (Bernhardt et al., 2010; Sargent, 2014).



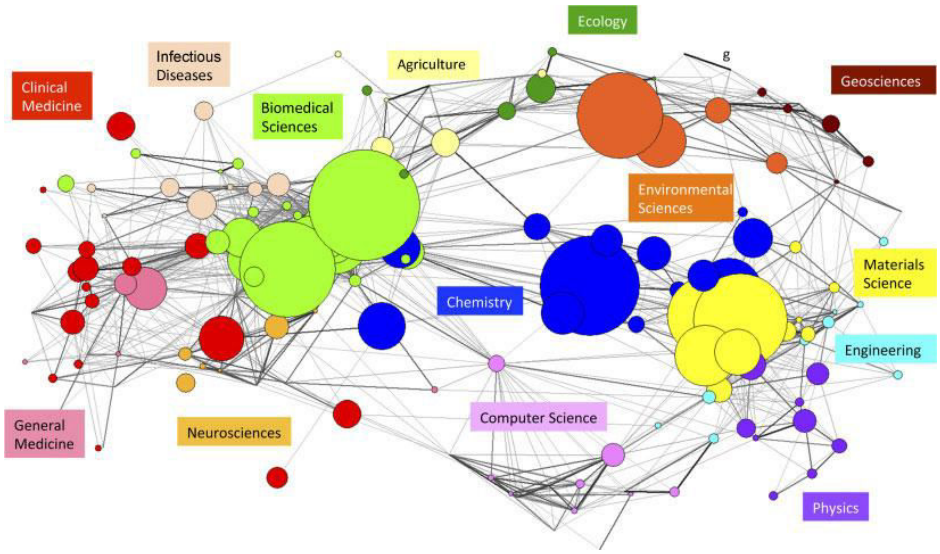
<u>Figure 1:</u> A : Evolution du nombre de produits contenant des nanoparticules sur le marché mondial de consommation ; B : en fonction la localisation géographique entre 2005 et 2013 selon l'inventaire du PEN mis à jour en Octobre 2013 (D'après The Project on Emerging Nanotechnologies).

Les retombées économiques de ce nouvel eldorado que représentent les nanotechnologies sont tellement importantes qu'une réelle compétition mondiale pour être le leader dans ce domaine s'est instaurée dans les pays développés. En effet, entre 2001 et 2004 plus de 60 pays ont monté des programmes nationaux de recherche et développement (Roco, 2011). Le programme américain NNI est le premier à avoir été fondé en 2000 et il reste le leader incontestable. Entre 2001 et 2014, le gouvernement fédéral américain y a investi plus de 19.4 milliards de dollars. Plus récemment, le président Obama a demandé un financement de 1.5 milliards de dollars pour la seule année 2015, et les compagnies américaines privées y ont investi des milliards de plus (Sargent, 2014). Dans son dossier documentaire intitulé « Les nanotechnologies » paru en 2013 sur le site du ministère des finances et des comptes publics, le CEDEF (centre de documentation économie-finance) nous apprend que la France n'est pas à la traine puisqu'elle se place au deuxième rang européen derrière l'Allemagne en termes d'effort financier dans le domaine des nanotechnologies. En effet, plus d'un milliard d'euros de fonds publics ont été investis en France entre 2001 et 2005 pour développer la recherche en nanoscience (Cedef, 2013). Malgré tout, il est difficile pour l'Europe de concurrencer les puissances américaines et japonaises où les investissements publics se doublent de soutiens privés très importants.

Ces levées de fonds d'investissement ont permis une augmentation exponentielle de dépôts de brevets d'invention ainsi que de publications scientifiques (Chen et al., 2013; Hullmann and Meyer, 2003). Bernhardt et al. (2010) ont évalué cette explosion du nombre de publications traitant des nanotechnologies en tapant des mots clés sur le moteur de recherche Web of Science (Thomson

Reuters). Les mots « nanomaterial or nanoparticle », ont généré environ 17 000 publications le 28 septembre 2009. En utilisant ce même moteur de recherche, le 10 juin 2015 nous atteignons le nombre spectaculaire de 182 664 pour ces mêmes mots clés soit une augmentation par un facteur 10. Ces publications regroupent évidemment de nombreux domaines scientifiques et une partie minime seulement traite de celui de l'écotoxicologie (Bernhardt et al., 2010).

Ce constat est illustré par la figure 2 qui permet de visualiser les différents domaines scientifiques plus ou moins éloignés impliqués dans le domaine de l'étude des nanomatériaux dis EHS (Environmental, Health and Safety), c'est-à-dire ceux issus de la santé, la sécurité et l'environnement (Klaine et al., 2012). L'explosion des nanotechnologies a aussi permis de développer et renforcer l'effort de collaboration interdisciplinaire (Bhushan, 2015).



<u>Figure 2 :</u> Carte de superposition des domaines scientifiques impliqués dans la recherche sur les Nano EHS. Les disciplines possédant des caractéristiques similaires sont positionnées à proximité. Les dimensions des sphères sont proportionnelles au pourcentage de publications scientifiques dans le domaine (Klaine et al., 2012 d'après la méthode de Rafols et al., 2010).

Ces dernières années, les nanotechnologies ont donc littéralement inondé le marché tel un véritable raz de marée économique et auraient permis de créer de 2 à 3 millions d'emplois à travers le monde (Gaffet, 2008).

I.1.2. Définitions

Dans ce nouveau domaine des nanotechnologies, de nombreux termes ont vu le jour et il suffit bien souvent de rajouter le préfixe « nano » à des appellations déjà existantes. Cependant même si au

premier abord ces définitions semblent être intuitives, il est important de les définir clairement afin d'employer une nomenclature normalisée pour faciliter la communication entre les chercheurs, organismes et industries. C'est dans cet objectif qu'ont été établies des normes internationales ISO (Organisation Internationale de Normalisation) consultables sur la plateforme en ligne de l'ISO. Concernant les nano-objets, c'est actuellement la norme ISO/TS 80004-2 :2015 qui est en vigueur. Le terme « échelle nanométrique » désigne des dimensions allant de 1 à 100nm (ISO/TS 80004-1:2010, 2.1). En plus de ce paramètre dimensionnel, une autre propriété inhérente à cette notion du « nano » est notamment l'apport de propriétés émergentes de part cette/ces dimensions particulières. Ainsi le précurseur des nanotechnologies Richard Feynman a notamment défini les nano-objets comme des « Atoms on a small scale behave like nothing on a large scale » c'est à dire « des atomes à une échelle de petite taille qui ne se comportent comme rien de tel sur une échelle de grande taille » (Bernhardt et al., 2010; Feynman, 1959).

Plus concrètement, la nanotechnologie correspond à un domaine de développement et de recherche technologique comprenant principalement des manipulations de la matière à l'échelle atomique et moléculaire de l'ordre du nanomètre (10^{-9}m) (EPA, 2007). Ces manipulations de matière permettent de produire des objets de tailles nanométriques ou nano-objets, qui possèdent alors de nouvelles propriétés et fonctions qui sont uniquement dues à leurs petites tailles. Les nano-objets peuvent être de différentes formes (Figure 3). Les trois principales sont les nanoparticules, les nanofibres et les nanoplaques qui possèdent respectivement 3, 2 et 1 dimensions externes à l'échelle nanométrique (ISO, 2015). Ces nano-objets sont ensuite utilisés pour élaborer des matériaux qui deviennent alors des nanomatériaux et qui présentent eux-aussi des propriétés spécifiques. Les nanomatériaux peuvent ensuite être décrits comme des matériaux renforcés, des matériaux nanostructurés de surface ou des matériaux nanostructurés en volume (Gaffet, 2008).

Il est intéressant de souligner que malgré des définitions précises et normalisées, le terme de « nanoparticule » est celui qui reste le plus couramment employé. Par abus de langage et très certainement par habitude, il est assez rare d'entendre parler de nano-objets, nanofibres et nanoplaques, l'ensemble étant plutôt désigné comme des nanoparticules (Gaffet, 2011). Pourtant leurs définitions respectives font état de différences dimensionnelles non négligeables.

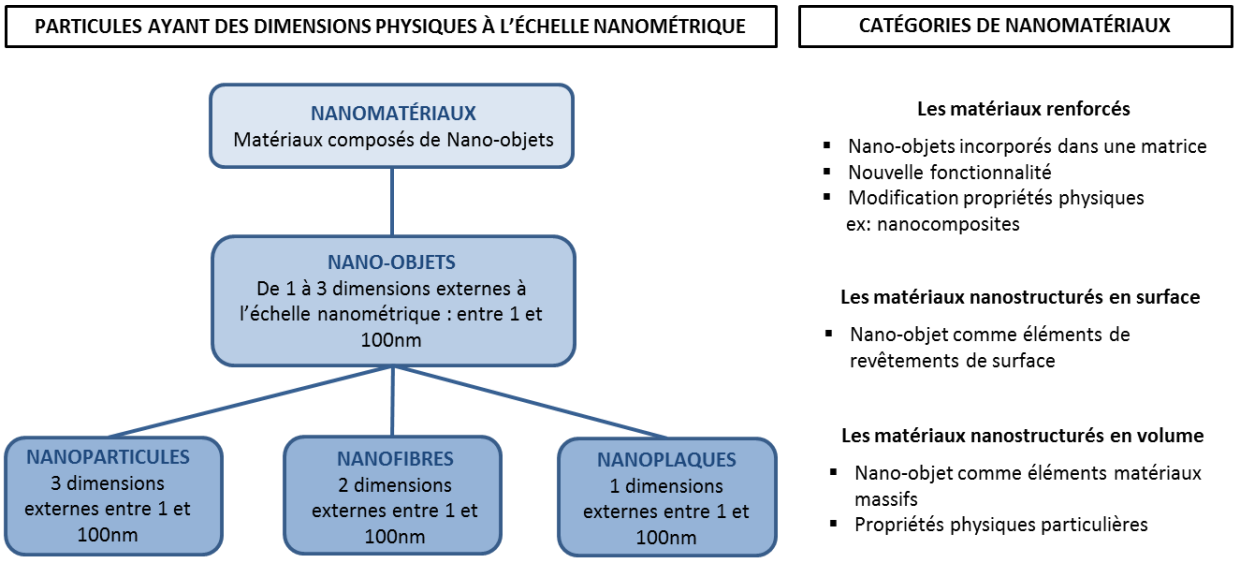


Figure 3 : Nomenclature et hiérarchie des termes employé dans le domaine des nanotechnologies (Adapté de Gaffet, 2008 et ISO, 2015).

I.1.3. Origine naturelle

Il est important de considérer que la vie a de tout temps évolué en présence de nanoparticules, ces dernières étant présentes sur Terre depuis des millions d'années. En effet depuis toujours, des nanoparticules se sont formées naturellement dans notre environnement de par l'activité volcanique, la combustion, l'érosion et même lors des réactions de photosynthèse (Bernhardt et al., 2010; Nowack and Bucheli, 2007). Elles sont retrouvées plus abondamment dans l'air et elles proviennent principalement des éruptions volcaniques (nanoparticules de verre de silicate, nanofribres de cristobalite), des feux de forêts (nanotubes de carbone, fullerènes) ou encore des embruns marins (sulfates) (Barnard and Guo, 2012; Bernhardt et al., 2010; Hochella et al., 2008; Nowack and Bucheli, 2007; O'Dowd et al., 1997). Même s'ils ne sont pas tous de l'ordre du nanomètre, il convient de souligner que les aérosols (petites particules suspendues dans l'air) produits par les activités humaines ne représenteraient que 10% de la totalité des poussières aériennes présentes dans l'atmosphère qui sont alors très majoritairement d'origine naturelle (Taylor, 2002). En termes de géologie, le sol terrestre et les fonds océaniques représentent eux-aussi des puits à nanoparticules inorganiques naturelles (Barnard and Guo, 2012). Ces nanoparticules minérales ou nanominéraux se comportent eux-aussi différemment que leur homologues macroscopiques et peuvent être présents en quantité plus limitée dans le manteau terrestre (Hochella et al., 2008). Une autre origine naturelle, somme toute plus originale est l'origine extraterrestre. Des impacts d'astéroïdes et de météorites sur la Terre auraient par exemple délivré et produit des

nanoparticules de carbone nommés fullerènes (C_{60} et C_{70}) (Becker et al., 2001, 1994). Enfin, certaines météorites pourraient même contenir des nanoparticules de diamant allant de 1 à 3 nm de diamètre (Hill et al., 1997; Hochella et al., 2008).

Depuis quelques années un débat s'est instauré au sein de la communauté scientifique. Ainsi, dans leur étude nommée : « Nanotechnologie : cadeau de la nature ou création des scientifiques ? », Hochella et al. (2015) nous expliquent qui si certains pensent que les nanoparticules manufacturées sont pour la plupart inventées et créées par l'homme, d'autres restent convaincus que nous reproduisons simplement des structures déjà existantes dans la nature.

I.1.4. Origine anthropique

Malgré une origine naturelle, la grande majorité des nanomatériaux qui nous entourent et auxquels nous sommes constamment confrontés sont de toute évidence d'origine anthropique, que leur structure soit inspirée de la nature ou non. Il existe désormais un impressionnant panel de nano-objets qui diffèrent de par leur composition chimique, leur taille, leur forme, leur enrobage, leur fonctionnalisation, leur charge ou encore leur méthode de synthèse. La plupart de ces termes restent spécifiquement dédiés aux domaines des nanotechnologies. En peu de temps, ce domaine a littéralement réussi à s'intégrer dans la communauté scientifique et à instaurer son propre champ lexical qu'il convient de définir.

I.1.4.1. Forme

Les nano-objets peuvent se présenter sous différentes formes. Comme le rappelle la norme ISO, il existe 3 formes prédominantes qui permettent de nommer les nano-objets (ISO, 2015). La forme la plus courante est la forme nanoparticulaire sphérique. Les nanoparticules inorganiques métalliques peuvent adopter ce type de configuration sphérique comme par exemple les nanoparticules d'argent, d'or ou de fer (Huber, 2005; Lapresta-Fernandez et al., 2012). Mais un nano-objet de même composition chimique peut être configuré différemment, comme les nano-objets d'oxyde de titane qui peuvent être sous forme de nanoparticules, nanotiges, nanofils ou encore nanotubes (Reyes-Coronado et al., 2008). Les structures cylindriques sont également très largement représentées sur le marché des nanotechnologies notamment grâce aux nanotubes de carbone (Baughman et al., 2002). Enfin, il est désormais possible de créer n'importe quel type de nanoparticules en fonction de la méthode de synthèse employée. Il peut alors exister un immense panel de formes et de structures atomiques comme des nanohélices, nanozigzags, nanopyramides, nanocubes etc (Sun and Xia, 2002; Wang, 2000).

I.1.4.2. Synthèse

Il existe principalement deux voies de synthèse des nano-objets : bottom-up et top-down.

La voie bottom-up propose une approche moléculaire où les structures organiques et inorganiques sont construites atome par atome ou molécule par molécule (Biswas et al., 2012; Sobolev and Gutiérrez, 2005; Zhang, 2003). Cette approche est la plus prometteuse dans le monde des nanotechnologies car elle permet de créer n'importe quel type de nanomatériel par différentes techniques (Biswas et al., 2012). En effet, tout peut être adapté aux demandes des industriels : la taille, la forme, l'enrobage ou encore la fonctionnalisation. Ces nano-objets sont composés d'atomes parfaitement organisés en structures cristallines et peuvent aussi être nommés nanocristaux (Sobolev and Gutiérrez, 2005).

La voie top-down propose comme son nom l'indique une approche opposée à celle du bottom-up. Ici, un matériel va être fragmenté, coupé ou réduit afin d'obtenir des particules de ce même matériel mais de tailles nanométriques. L'attaque chimique à l'aide de l'utilisation d'acide fait partie des méthodes de synthèse top-down (Biswas et al., 2012).

Le top-down peut être considéré comme la méthode la plus traditionnelle et elle se base parfois sur de simples procédures de broyage à billes (Christian et al., 2008). Cependant, la méthode la plus prometteuse en termes d'innovation est bien évidemment le bottom-up qui s'est largement inspirée de la nature qui a de tout temps construit des matériaux complexes comme les cristaux, coquillages, perles via cette technique de bottom-up. Ainsi Leonard de Vinci, grand visionnaire qu'il était, a dit : «When nature finishes to produce its own species, man begins using natural things in harmony with this very nature to create an infinity of species » (Zhang, 2003).

Depuis quelques années nous assistons à une révolution verte dans la synthèse de nano-objets. Il est désormais possible de synthétiser une grande variété de nanoparticules (or, argent, sélénium, platine, titane, silice etc.) via des extraits de plantes, des bactéries, des champignons, des levures ou encore des virus (Mittal et al., 2013; Narayanan and Sakthivel, 2010). Le principe et la méthode sont très simples. En partant d'une voie de synthèse top-down, les produits chimiques, parfois toxiques utilisés dans les trois étapes principales de préparation ont simplement été remplacés par des produits naturels non toxiques. Par exemple, l'eau peut être utilisée comme solvant, le glucose comme agent réducteur et l'amidon comme matériel d'enrobage (Raveendran et al., 2003). La méthode est alors très simple et peut s'apparenter à une banale recette de cuisine. Il est, par exemple, possible de synthétiser des nanoparticules d'argent à partir de bâtons de cannelle achetés en grande surface (Sathishkumar et al., 2009). Les paramètres tels que le pH de la solution ou encore la température de réaction, peuvent avoir

une importance sur la forme des nano-objets produits (Mohammadikish et al., 2015; Sharma et al., 2009).

L'intérêt d'un tel processus environnementalement responsable est bien évidemment d'éviter d'utiliser des produits toxiques susceptibles d'être rejetés dans l'environnement, mais également de limiter la production de déchets lors des synthèses chimiques. Il est quand même intéressant d'observer cet engouement pour un mode de production respectable de l'environnement pour synthétiser des nanoparticules métalliques qui pourraient à terme être ou devenir toxiques pour ce même environnement.

I.1.4.3. Composition chimique du noyau

On peut nommer «noyau» le centre de la nanoparticule. C'est généralement la composition de ce noyau qui lui donne sa dénomination et qui informe sur ses propriétés émergentes (Christian et al., 2008). De façon très simple, les nano-objets et nanoparticules peuvent être classés en deux catégories : les organiques et les inorganiques (Nowack and Bucheli, 2007). Les fullerènes et les nanotubes de carbone sont des nano-objets organiques qui contiennent des atomes de carbone et qui sont les plus répandus sur le marché. Pour ceux de nature inorganique, ce sont les nano-objets métalliques qui sont les plus couramment incorporés dans des nanomatériaux comme par exemple les nanoparticules d'argent, de cuivre, d'or ou encore de platine (Fauss, 2008; Giljohann et al., 2010; Véron et al., 2013; Welch and Compton, 2006). Certains métaux peuvent présenter plusieurs états d'oxydation c'est pourquoi les nanoparticules métalliques peuvent aussi se présenter sous des formes oxydées comme les nanoparticules d'oxyde de titane, d'oxyde de zinc ou encore d'oxyde de fer.

I.1.4.4. Surface spécifique

La définition des nano-objets évoque la présence de propriétés émergentes qui sont liées à leur taille nanométrique (ISO, 2015). Il faut noter que ce phénomène n'est pas observable lorsqu'un matériel est réduit à l'ordre du micromètre et c'est bien l'échelle nanométrique qui apporte ces propriétés (Klaine et al., 2012). En effet, à cette échelle le rapport surface/volume d'une structure augmente considérablement. Auffan et al. (2009) ont estimé que la taille critique des nanoparticules sphériques pour développer des propriétés innovantes était même inférieure à 30 nm de diamètre. Ils expliquent qu'à cette taille, des changements dans la structure cristalline permettent d'augmenter la réactivité de surface. Comme l'explique la figure 4, pour une même masse de matériel (ici 1µg d'or), un milliard de particules présenteront une aire surface spécifique 10^3 fois plus importante qu'une seule particule de 1

µg d'or. C'est cette augmentation de l'aire de surface spécifique qui permet d'augmenter de potentielles interactions et qui octroie aux nano-objets de nouvelles propriétés parfois étonnantes. En clair, la forme physique d'un matériel peut largement influencer ses propriétés. La surface des nano-objets apparait donc comme un élément important de classification, et la chimie de surface peut être différente de celle du noyau grâce à l'enrobage ou à la fonctionnalisation (Christian et al., 2008).

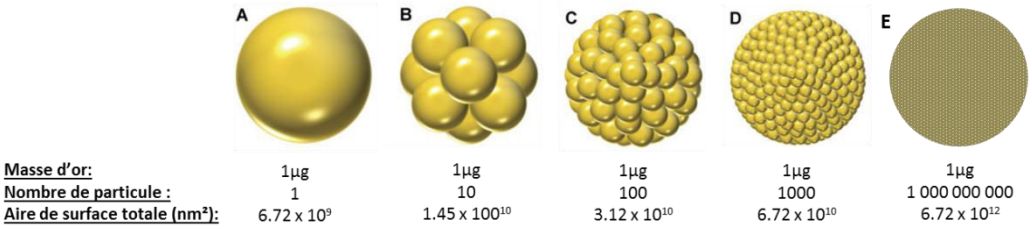


Figure 4 : Aire de surface en fonction du nombre et de la taille des nanoparticules pour une masse d'or équivalente (adapté de Klaine et al., 2012).

I.1.4.5. Enrobage

Dans de nombreux cas, les noyaux des nano-objets sont enrobés d'un composant différent (Figure 5). L'enrobage est parfois associé à la méthode de synthèse. D'après la méthode Turkevich, des nanoparticules d'or sphériques peuvent par exemple être produites suite à la réduction de sels d'or par une solution de citrate (Brisson and Mornet, 2007). Ces nanoparticules sont de ce fait, enrobées par un groupement négatif citrate. Ce sont par ailleurs souvent des ions ou molécules chargées mais également des oxydes de métaux (Griffitt et al., 2008), des polymères comme la polyvinylpyrrolidone PVP (Huang et al., 2010), des acides humiques (Croteau et al., 2011) ou encore de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Kennedy et al., 2010). Ces agents d'enrobage sont souvent utilisés pour modifier la surface des nanoparticules et notamment pour éviter leur agrégation dans un milieu liquide (Figure 5). C'est principalement le cas des enrobages citrate qui, possédant une charge négative, entrainent des répulsions électrostatiques (Loi de Coulomb) entre nanoparticules de même charge limitant ainsi leur agrégation. Le potentiel zeta est intimement relié à cette charge de surface et est facilement mesurable pour évaluer ce phénomène d'agrégation (Landsiedel et al., 2010).

I.1.4.6. Fonctionnalisation

En plus de l'enrobage, les nanoparticules et nano-objets peuvent être fonctionnalisés (Figure 5). Dans ce cas-là, ce sont des macromolécules ou molécules relativement longues qui saturent la surface du nano-objet (protéines par exemple). Un encombrement stérique permet ainsi une stabilisation car les

molécules fonctionnalisées présentent souvent une forte affinité pour le solvant dans lequel les nano-objets sont en solution (figure 5). Pour que les nanoparticules puissent s'agréger entre elles il faudrait alors que le solvant se désagrège entre les deux nano-objets, mais également entre les macromolécules fonctionnalisées (Christian et al., 2008). Ce processus est largement élaboré dans le domaine médical avec l'avènement de la nanobiotechnologie qui permet notamment la fonctionnalisation de molécules thérapeutiques ou d'anticorps (CF. section I.1.5.1).

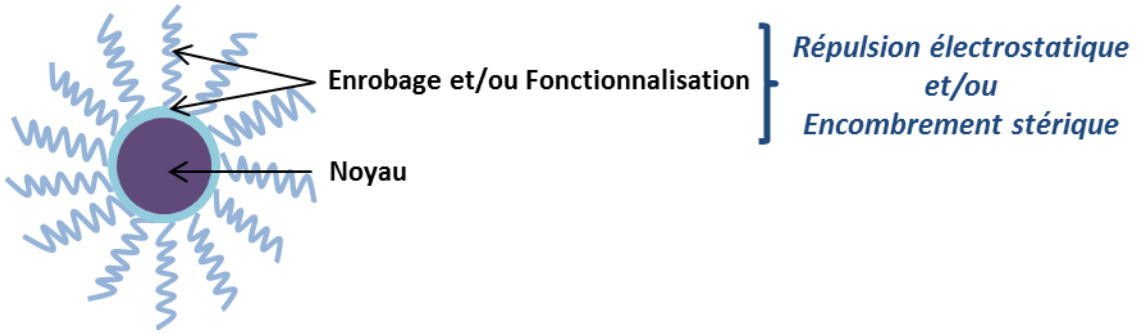


Figure 5 : Exemple de structure de nanoparticules sphériques évitant leur agrégation dans un milieu. L'enrobage et/ou la fonctionnalisation peuvent permettre une répulsion électrostatique s'ils présentent des charges et/ou un encombrement stérique si la molécule est de taille relativement importante.

I.1.5. Intérêt et innovation

Les nanotechnologies ont entraîné une sorte d'euphorie collective grâce à l'avènement de propriétés émergentes parfois même considérées comme révolutionnaires. Nous pouvons clairement distinguer deux types de nanotechnologies. D'une part, les nanoparticules développées en biotechnologies qui promettent de réels progrès thérapeutiques, des applications cliniques et un espoir de guérison pour de nombreuses maladies encore jugées incurables. Pour une question d'éthique, il apparait délicat de pointer du doigt l'utilisation de ces nanomatériaux potentiellement toxiques pour l'environnement alors qu'ils pourraient offrir la possibilité de guérir des personnes atteintes de maladies graves. Une autre catégorie de nanomatériaux ont quant à eux, des objectifs différents, moins vitaux et ils permettent entre autre d'améliorer considérablement notre confort de vie.

I.1.5.1. Nanoparticule et médecine (l'exemple de l'or)

La nanobiotechnologie a permis la synthèse des nanoparticules pouvant être utilisées dans de nombreuses applications comme par exemple l'imagerie médicale (Corot et al., 2006; Gao et al., 2009; Whitesides, 2003). Les nanoconjugués d'or sont largement étudiés car ils offrent des promesses de progrès thérapeutiques qui pourraient s'avérer révolutionnaires. Ce sont des nanoparticules d'or qui ont

leur surface fonctionnalisée par différentes structures et qui leur confère le potentiel d'agent thérapeutique (Giljohann et al., 2010). En effet, des anticorps fonctionnalisés peuvent par exemple détecter spécifiquement des cellules cancéreuses grâce à une haute affinité avec des récepteurs de surface exprimés par les cellules malignes (Giljohann et al., 2010). Une fois irradiés, ces nanoconjugués d'or développent des propriétés d'échauffement importantes qui permettent la destruction de la cellule cancéreuse (Giljohann et al., 2010; Loo et al., 2005). Ils pourraient donc constituer des traitements thérapeutiques non invasifs et plus supportables pour les patients, qui pourraient entrainer une réduction considérable du volume des tumeurs. Les nanoparticules d'or sont également en cours de recherches pour le traitement d'une autre maladie malheureusement très répandue, le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Bowman et al., 2008).

I.1.5.2. Nanoparticule et confort de vie

Les propriétés émergentes des nanomatériaux sont utilisées dans de nombreux secteurs. Pour la grande majorité ils permettent d'améliorer notre quotidien grâce à divers matériaux exploités dans de nombreux produits de consommation. Il serait difficile d'en faire un inventaire exhaustif, cependant quelques exemples sont présentés ci-dessous. Dans les cosmétiques, les nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc sont utilisées dans les crèmes solaires comme écran UV (Nohynek et al., 2008). Pour un aspect esthétique et grâce à un fort pouvoir blanchissant on retrouve également du titane dans le dentifrice ou les crèmes de beauté mais aussi dans les peintures. Avec leur couleur rouge vif à l'échelle nanométrique, les nanoparticules d'or et les nanoparticules de cuivre sont aussi exploitées en tant que colorant, notamment dans le verre des flacons de parfum ou des bouteilles de soda (Véron et al., 2013). Dans l'industrie sanitaire, les nanoparticules d'argent sont par exemple, grâce à leur pouvoir antimicrobien, exploitées dans les pansements (Marambio-Jones and Hoek, 2010; Pourzahedi and Eckelman, 2015). Les nanoparticules de silice en tant qu'agent anti agglomérant sont incorporées dans des produits comestibles tels que les soupes et sauces pour augmenter leur onctuosité (Grombe et al., 2014). L'industrie automobile exploite aussi ces matériaux sous forme de films minces pour des propriétés de résistance, de traitement de surface qui rendent par exemple les surfaces résistantes aux taches, autonettoyantes ou encore imperméables. Enfin avec des propriétés de magnétisme nommées super paramagnétisme, les nanoparticules de fer sont utilisées dans l'industrie électronique. Les applications militaires ont été largement étudiées et les nanotechnologies ont notamment permis la miniaturisation des ordinateurs et de l'électronique en allant jusqu'à la puce et aux systèmes

d'intelligence artificielle. Les revêtements de protection blindée peuvent être plus légers tout en conférant une protection plus efficace (Altmann, 2004).

Après l'euphorie associée à ces progrès technologiques, un constat a été établi et les questions d'ordre sanitaire et d'éthique entrent maintenant en jeu.

I.1.6. Prise de conscience collective, crainte, éthique

Depuis quelques années, une prise de conscience collective a vu le jour et même si encore une majorité de la population ne sait pas réellement ce qu'est une nanoparticule, les nanotechnologies commencent à apparaitre dans les sujets d'actualité et de discussion (Grunwald, 2005; Schummer, 2006). Récemment sur un plateau de télévision, un altermondialiste a pointé du doigt devant l'opinion publique l'existence de nanoparticules de titane dans des bonbons et chewing-gums en estimant qu'elles étaient mauvaises pour la santé. Une théorie plus radicale a également vu le jour, elle se nomme « Grey goo » ou « gelée grise » et émet l'hypothèse d'une fin du monde qui impliquerait les nanotechnologies avec des autoréplications de robots qui deviendraient incontrôlables et consommeraient les ressources terrestres (Giles, 2004; Nohynek et al., 2007; Schmoll, 2007). Un thriller écrit par Michael Crichton en 2002 nommé «La proie» fait état de cette théorie puisque l'intrigue se base sur des nano-objets qui se sont évadés d'une entreprise et s'associent en essaim pour attaquer et contrôler les hommes. Même si chacun a son propre jugement d'esprit, cette théorie pointe du doigt un sentiment de peur face à un développement technologique pouvant, pour certains, être perçu comme incontrôlable.

D'autres, au contraire plus utopistes, voient l'avènement des nanotechnologies comme un « nanodream » qui offrirait un pont vers le futurisme, la prospérité sans précédent, le développement d'industries sans pollution ou encore même l'espoir d'une vie éternelle (Mnyusiwalla et al., 2003; Stix, 2001).

En ce qui concerne l'écotoxicologie, nous pourrions nous demander quel poids aurait un petit groupe de chercheurs face à une entreprise qui génère des millions de dollars si leurs recherches venaient à démontrer que les nano-objets mis sur le marché peuvent avoir des dommages irrémédiables sur l'environnement. Même si cela a été un peu oublié ces dernières années et commence enfin à émerger dans les états d'esprits, il convient de garder à l'esprit une balance bénéfices/risques quant à la surexploitation des ces nanotechnologies.

I.1.7. Contexte législatif

Il aura fallu attendre le 1er janvier 2013, alors que les nanoparticules sont déjà en plein apogée, pour voir apparaitre en France l'entrée en vigueur d'une déclaration obligatoire d'utilisation. Dans l'article L523-1 du code de l'environnement il est dit que «*dans un objectif de traçabilité et d'information du public, l'identité, les quantités et les usages de ces substances doivent être périodiquement déclarés*». De plus l'article L523-2 souligne que *«Les personnes qui fabriquent, importent ou utilisent des substances mentionnées à l'article L. 523-1 transmettent, à la demande de l'autorité administrative, toutes les informations disponibles relatives aux dangers de ces substances et aux expositions auxquelles elles sont susceptibles de conduire, ou utiles à l'évaluation des risques sur la santé et l'environnement»* (Direction générale de la prévention des risques, 2014; Legifrance, 2010). Cette déclaration doit être effectuée en ligne via l'application de gestion R-Nano dès que la production, l'importation ou la distribution dépasse 100 grammes de substance à l'état nanoparticulaire. Ainsi on peut maintenant facilement savoir que 10 417 déclarations ont été soumises en 2014 contre 3 409 en 2013 par plus de 1400 entités françaises et pour 319 catégories de substances nanoparticulaires. En 2014, La France a vu sa production grimper à 274 000 tonnes et au contraire son importation diminuer, passant de 212 000 tonnes en 2013 à 122 000 tonnes en 2014 (Direction générale de la prévention des risques, 2014). Avec cette législation, la France montre l'exemple puisqu'elle est devenue le premier pays de l'union européenne à mettre en place une déclaration obligatoire. Avec son arrêté royal du 27 Mai 2014, la Belgique a aussi instauré la mise en place d'un tel registre qui sera actif en janvier 2016. Au Danemark il faudra désormais également déclarer les productions et importations. Il apparait évident que ces législations vont progressivement se mettre en place un peu partout dans le monde.

I.2. Les nanoparticules d'argent (nAg)

I.2.1. Marché

Selon la dernière mise à jour du PEN (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2013), trois types de nanoparticules dominent le marché en 2013 (Figure 6). Avec 383 nanoproduits (produits mis sur le marché incorporant des nanoparticules), les nanoparticules d'argent (nAg) se placent en première position en occupant 24% de la totalité des nanoproduits référencés (Fauss, 2008; Rejeski, 2009). Elles devancent largement les nanoparticules de titane et de carbone qui représentent respectivement 11 et 5% (Fauss, 2008). Avec un coût de production raisonnable et des propriétés permettant leur

incorporation dans de nombreux produits, les nanoproduits d'argent ont vu leur utilisation et production multipliée par 15 entre 2006 et 2013 (Capek, 2004; Fabrega et al., 2011; Fauss, 2008). Pourtant, même si elles sont incorporées dans une plus large gamme de produits, avec seulement 400 tonnes de production par an en 2010, les nAg étaient loin derrière les nanoparticules de dioxyde de titane ($nTiO_2$), d'oxyde de zinc (ZnO) ou encore les nanotubes de carbone (NTC) qui affichaient quant à eux, des estimations record de plus 80 000, 30 000 et 3 000 tonnes respectivement (Keller et al., 2013). En effet, les applications qui génèrent ces production élevées sont les peintures, les enrobages ou encore les pigments alors que les nAg sont principalement utilisées dans les domaines de la santé, de l'hygiène et du bien-être.

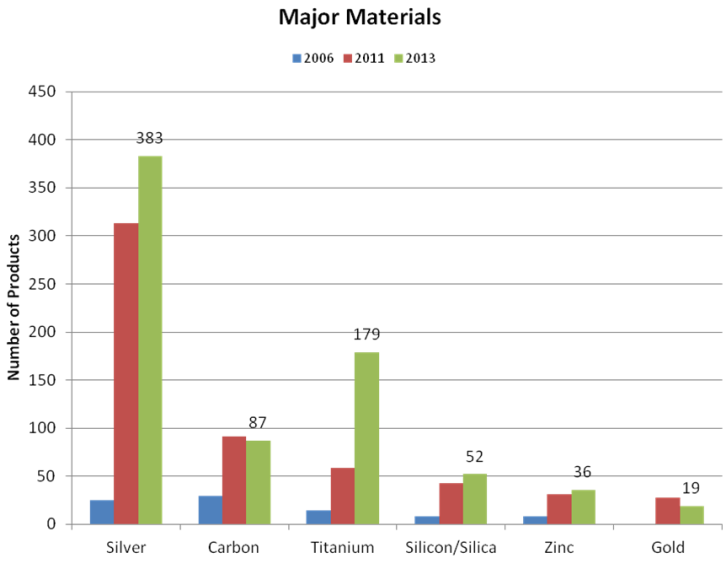


Figure 6 : Nombres de produits incorporant des nanoparticules composées de différents matériaux selon l'inventaire du PEN mis à jour en Octobre 2013 (D'après The Project on Emerging Nanotechnologies).

I.2.2. Propriétés et utilisations des nAg

C'est principalement pour leurs propriétés antimicrobiennes que les nAg sont le plus largement exploitées. Ces propriétés ne sont pas une découverte puisqu'il y a plus de 5000 ans, l'argent était déjà utilisé par les Romains et les Grecs pour soigner les plaies (El-Badawy et al., 2010). Avec leur taille nanométrique, les nAg ont permis de décupler ces propriétés déjà reconnues. Elles sont donc actuellement couramment utilisées comme biocide contre les bactéries, les champignons ou encore les virus (Marambio-Jones and Hoek, 2010). Dans l'industrie textile, elles ont d'abord été incorporées dans les vêtements hospitaliers afin de prévenir les infections bactériennes pathogènes telles que l'infection causée par *Staphylococcus aureus* (Durán et al., 2007). Elles sont maintenant incorporées dans les vêtements de tous les jours comme les chaussettes et permettent d'éliminer les microorganismes qui

sont notamment responsables des mauvaises odeurs (Benn and Westerhoff, 2008; Perera et al., 2013). Dans leur étude, Farkas et al. (2011b) rapportent même l'existence sur le marché d'une machine à laver le linge qui serait capable de produire des nAg par électrophorèse via un système nommé « Silver Nano Health system ». En 2003, la compagnie multinationale Samsung a déposé une appellation de marque « Silver Nano » pour désigner l'ensemble de leurs innovations en termes de machines à laver, réfrigérateurs et autres purificateurs d'air qui synthétisent ou incorporent des nAg. Que ce soit dans les produits ménagers, les vêtements, les cosmétiques ou encore les produits de soins personnels, les nAg ont envahi le quotidien (Figure 7).

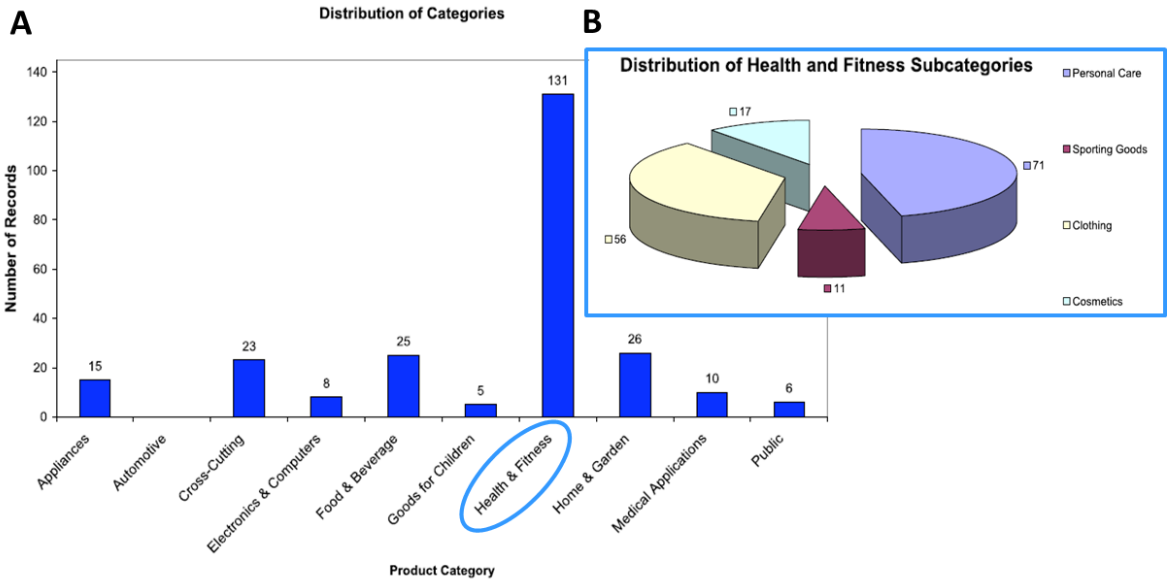


Figure 7 : *A : Distribution des catégories de produits incluant des nAg ; B : Distribution spécifique de la catégorie santé et remise en forme (D'après Fauss, 2008).*

Fait plus surprenant, les nAg sont également utilisées dans les emballages alimentaires afin de retarder au maximum la dégradation des aliments. Si certaines études ont montré que l'argent présent dans ces emballages ne migrait pas sous forme nanoparticulaire dans les produits (Addo Ntim et al., 2015) d'autres au contraire l'ont démontré (Echegoyen and Nerín, 2013; Grombe et al., 2015).

Elles sont parfois également utilisées pour des propriétés optiques et peuvent être intégrées dans des peintures, encres voire même dans des bouteilles en verre contenant du soda (Kaegi et al., 2010; Mueller and Nowack, 2008; Perelaer et al., 2009; Tay and Edirisinghe, 2002; Véron et al., 2013).

Dans le domaine médical, les propriétés des nAg pour prévenir les infections, réduire les inflammations ou encore favoriser la cicatrisation ne sont plus à démontrer, et les pansements qui en incorporent sont largement utilisés notamment pour le traitement de grands brûlés (Fong and Wood,

2006; Pourzahedi and Eckelman, 2015). A l'instar des nanoparticules d'or, elles présentent aussi un potentiel intéressant pour les applications d'imageries médicales ainsi que pour les traitements de maladies qui requièrent l'envoi de médicaments sur des cellules ou organes spécifiques (Ahamed et al., 2010; Jain et al., 2008; Schrand et al., 2008).

I.2.3. Synthèse, forme

Il existe de nombreux protocoles de synthèse et de production des nAg expliqués dans divers rapports et études (Behra et al., 2013; Fabrega et al., 2011; Panáček et al., 2006; Sharma et al., 2009; Sun and Xia, 2002). Dans leur synthèse bibliographique, Evanoff and Chumanov, (2005) rapportent que l'on peut arbitrairement différencier deux méthodes de synthèse : des méthodes traditionnelles qui comportent les synthèses via des réductions de sels d'argent, et des techniques non traditionnelles de synthèse par réduction dans des matrices poreuses ou encore par irradiation laser (Abid et al., 2002; Plyuto et al., 1999). Dans ce manuscrit de thèse, nous nous focaliserons seulement sur la méthodologie la plus couramment employée : une synthèse par bottom-up où les nanoparticules sont produites suite à la réduction de sels d'argent, le plus souvent des nitrates d'argent (Behra et al., 2013; Fabrega et al., 2011; Sharma et al., 2009). Ces sels peuvent être réduits en solution aqueuse par différents ions réducteurs comme le borohydrure (BH_4^-), le citrate ($C_6H_5O_7^{3-}$) ou l'ascorbate ($C_6H_7O_6^-$) (Behra et al., 2013; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Sharma et al., 2009; Tolaymat et al., 2010). Cette réduction forme des atomes d'argent (Ag^0) qui s'agglomèrent en groupes puis en nanoparticules. La solution de nAg ainsi formée présente une couleur jaune. La taille, la forme et la stabilité des nanoparticules ainsi synthétisées, dépendent principalement des conditions expérimentales. En effet de nombreuses études résumées dans la synthèse bibliographie de Sharma et al. (2009) ont prouvé que le borohydrure, considéré comme un fort agent réducteur, entraine la production de petites nAg, alors que le citrate, considéré comme un agent réducteur plus faible, produit des nAg plus larges. Lors de la synthèse, ces anions servent aussi d'agent stabilisateur ou agent d'enrobage favorisant la monodispersion des nanoparticules. La réduction et la stabilisation des nAg peut également s'effectuer via des polymères comme le polyvinylpyrrolidone (PVP) et le polyethylene glycol (PEG) qui servent alors d'agents réducteurs, de dispersants ou encore d'agents d'enrobage en fonction des méthodes (Jiang et al., 2004; Luo et al., 2005; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Wang et al., 2005).

Les différentes techniques de synthèse existantes permettent de produire des nAg de formes variables comme des sphères, des bâtonnets, des fils, des cubes ou encore des plaques (Figure 8, Behra et al., 2013; Cobley et al., 2009; Sun and Xia, 2002). Dans leur étude, Pal et al. (2007), ont étudié les

propriétés antibactériennes de différentes formes de nAg (Figure 8) sur la bactérie gram-négative *Escherichia coli*, et ont démontré une plus forte action biocide des nAg sous forme de nanoplaque triangulaire tronquée (Figure 8D). Ils émettent l'hypothèse que différentes formes de nAg possédant une aire de surface équivalente auront par contre des aires de surfaces effectives différentes en fonction des facettes actives dépendantes de leur forme.

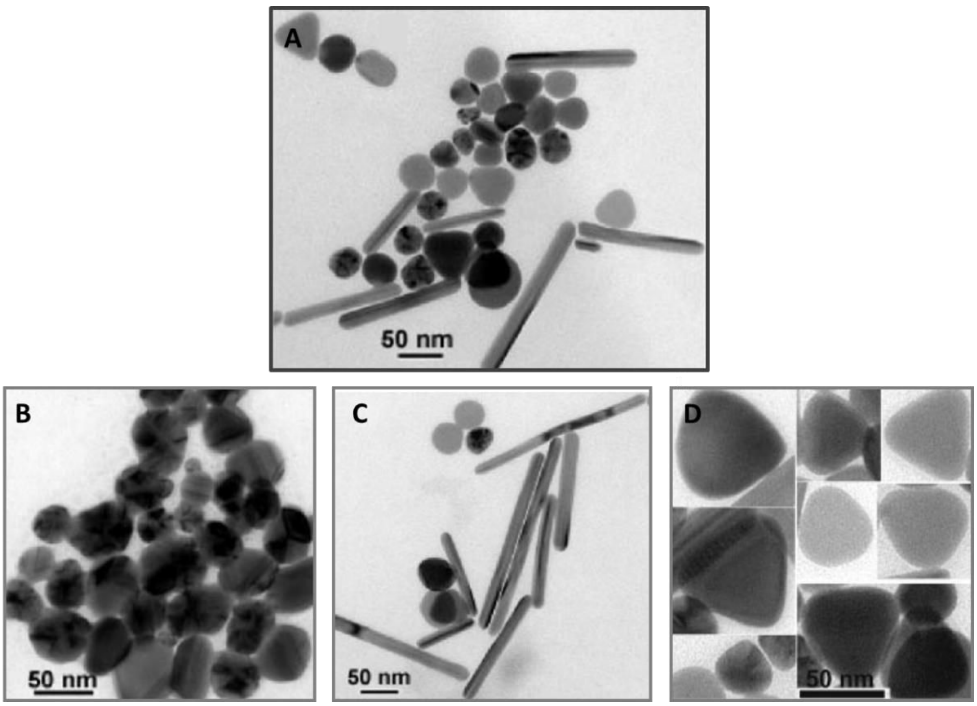


Figure 8 : *Photos en microscopie électronique à transmission (TEM) de nanoparticules d'argent de différentes formes synthétisées par différents protocoles. A : nAg de différentes forme ; B : nAg sphériques ; C : nAg principalement en bâtonnets; D : nAg en nanoplaques triangulaires tronquées. Photos tirées de* Pal et al. (2007).

I.2.4. Cycle de vie des nAg : de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau

L'utilisation accrue des nAg dans la vie quotidienne pose clairement la question de leur conséquence environnementale. Au préalable, il convient de s'intéresser en premier lieu à leur cycle de vie global. En effet, le cycle de vie et de production d'un nanoproduit détermine les possibilités de rejets de nanoparticules dans l'environnement comme l'illustre la figure 9 (d'après Sun et al., 2014).

Dans leur revue bibliographique, Gottschalk and Nowack (2011) ont compilé les différentes étapes impliquées dans un possible relargage dans l'environnement. Lors du processus de production, ils affirment que 0 à 2% des nanoparticules produites pourraient être rejetées dans l'air, les sols ou les eaux de surface sans aucun passage au préalable par une station d'épuration. Puis, l'incorporation de ces nanoparticules dans des produits intermédiaires ou finaux pourrait également être une étape générant

un relargage dans l'environnement. C'est bien évidemment lors de l'utilisation, le recyclage ou encore la destruction des nanoproduits que le risque est le plus grand et bien souvent incontrôlable. Ce risque est effectivement bien difficile à évaluer car les rejets de nanoparticules, et, dans le cas présent de nAg, sont fortement dépendants de la façon dont elles sont intégrées dans le produit final. Il apparait évident que les nAg incorporées dans des fluides, crèmes ou encore sprays sont plus susceptibles d'être rapidement rejetées dans l'environnement. Au contraire, celles intégrées dans une matrice solide seront plutôt graduellement rejetées en fonction de l'état d'usure du produit (Gottschalk and Nowack, 2011). Dans leur étude, Kaegi et al. (2010) ont par exemple rapporté un lessivage de 30% des nAg incorporées dans une peinture de façade après seulement une année d'exposition aux intempéries. Enfin, en ce qui concerne les nanoparticules rejetées dans le réseau d'eau public ou dans les déchets communs, c'est lors de leur passage via les stations d'épuration, les incinérateurs ou lors de leur mise en décharge/recyclage que le risque d'un potentiel rejet dans l'air, le sol, l'eau et les sédiments doit être pris en compte.

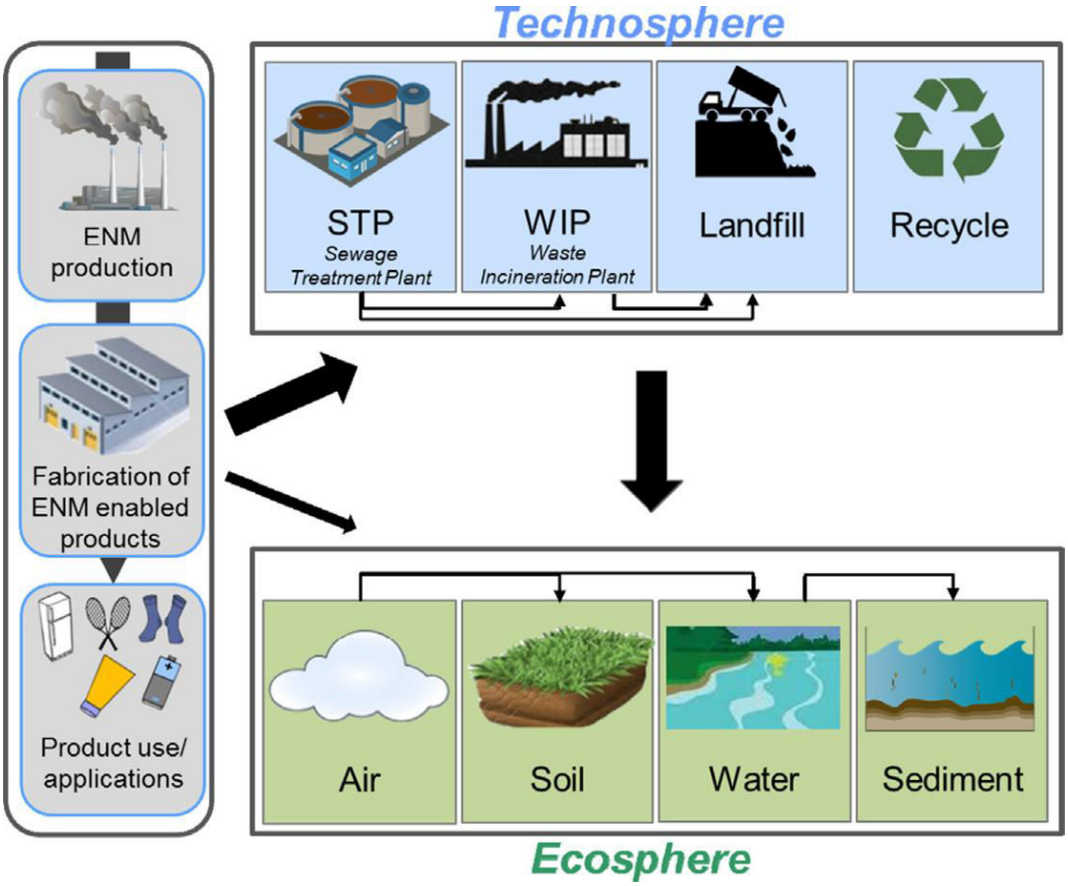


Figure 9 : Structure générale du modèle de rejet des nanoparticules (ENM : engineered nanomaterial, nanomatériaux manufacturés) à différentes étapes de production, d'incorporation dans des produits et d'utilisation/application. Rejets directs dans la technosphère (stations d'épuration, usines d'incinération des

déchets, décharges et processus de recyclage) et dans l'écosphère (air, sol, eau, sédiment). Rejet indirects de la technosphère vers l'écosphère. Schéma tiré de Sun et al. (2014).

Tout au long de leur cycle de vie, les nanoparticules, telles que les nAg, peuvent subir différentes transformations ou dégradations soulignant ainsi le challenge important que représente l'étude de leur exposition et concentration finales dans les cours d'eau (Gottschalk and Nowack, 2011; Nowack et al., 2012). A l'heure actuelle, il n'existe semble-t-il pas de méthode spécifique permettant leur quantification directe et en routine dans l'environnement. Seules les modélisations mathématiques permettent d'évaluer des concentrations environnementales prédictibles (PEC) (Gottschalk et al., 2009; Sun and Xia, 2002).

I.2.4.1. Exemples de rejets des nAg via l'utilisation de nanoproduits

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les nAg sont largement incorporées dans les vêtements et notamment les chaussettes pour éviter le développement des mauvaises odeurs. L'étude effectuée par Benn and Westerhoff (2008) sur le relargage de nAg incorporées dans 6 types de chaussettes achetées dans le commerce reste l'une des plus citées. Des photos par microscopie à balayage ont démontré l'existence de nAg de 100 à 500 nm de diamètre intégrées dans les chaussettes et des photos par microscopie électronique à transmission ont prouvé la présence de formes irrégulières de nAg de 1 nm à quelques centaines de nanomètres dans leurs eaux de lavage. En plus d'un relargage d'argent sous forme dissoute, les auteurs ont montré que les rejets étaient en relation avec les processus de fabrication et d'incorporation.

De nombreuses études se sont intéressées aux tissus composés de nAg encore appelés nanotextiles. Si certaines ont étudié les processus et techniques d'incorporation des nAg dans les fibres de coton (Perera et al., 2013), d'autres ont étudié les différentes techniques de surveillance possibles pour contrôler les risques directs ou indirects pour l'homme et l'environnement (Rezic, 2011). Les coûts énergétiques et les impacts environnementaux d'une telle technologie ont aussi été analysés (Walser et al., 2011) ainsi que le comportement de tissus provenant de différentes usines (Geranio et al., 2009). Une étude a même démontré le relargage d'argent dans de la sueur artificielle en contact avec le tissu, soulevant alors un risque potentiel pour l'homme (Kulthong et al., 2010). Toutes ces études ont par ailleurs montré un relargage d'argent sous forme ionique ou nanoparticulaire dans les eaux de lavage (Benn and Westerhoff, 2008; Geranio et al., 2009; Mitrano et al., 2014; Perera et al., 2013). Elles soulignent alors l'existence d'un risque de relargage qui doit être pris en compte lors du traitement des eaux usées.

Si l'on s'intéresse aux autres biens de consommation impliquant des nAg, des études ont mesuré des rejets d'argent sous formes dissoutes et/ou nanoparticulaires via les pansements (Holbrook et al., 2014; Pourzahedi and Eckelman, 2015), les sprays type déodorants (Losert et al., 2015), les revêtements transparents pour façade extérieures en bois (Künniger et al., 2014), les peintures extérieures (Kaegi et al., 2010) ou encore les emballages alimentaires (Addo Ntim et al., 2015; Echegoyen and Nerín, 2013; Grombe et al., 2015). Si pour certains produits, il existe un risque d'un relargage direct dans l'environnement (Holbrook et al., 2014, 2014; Kaegi et al., 2010; Künniger et al., 2014; Losert et al., 2015), pour d'autres et notamment les nanotextiles, ces rejets doivent être gérés et traités (Benn and Westerhoff, 2008).

Bien que certains assurent que les quantités de nAg et d'argent dissous rejetées dans les eaux usées sont trop faibles pour parler de risques environnementaux (Perera et al., 2013) la plupart des études déjà citées estiment la nécessité d'un processus de traitement des eaux usées fonctionnel et adapté pour prendre en charge ce type de rejet.

I.2.4.2. Comportement des nAg dans les stations d'épuration

Les nAg rejetées dans le réseau d'eau passent dans les systèmes d'assainissement comme les stations d'épurations (STEP). Les procédés de traitements des eaux usées et la prise en charge des nanoparticules, dont les nAg, sont devenus des objectifs de recherche indispensables pour l'étude de l'évaluation du risque environnemental (Brunetti et al., 2015). Kim et al. (2010) ont identifié dans les boues de STEP des nanocristaux de sulfure d'argent (Ag_2S) de forme ellipsoïdale, d'une taille de 5 à 20 nm associés en petits agrégats. D'autres études ont montré que les nAg sont partiellement voire totalement converties en sulfure d'argent Ag_2S pendant la phase de digestion anaérobique du traitement (Brunetti et al., 2015; Kaegi et al., 2011; Kent et al., 2014; Lombi et al., 2013). Si la plupart de l'argent retrouvé dans les boues ou les effluents de STEP semble être présent sous forme de sulfure et donc beaucoup moins soluble et toxique que d'autres formes d'argent, le devenir des nAg est étroitement lié à la nature de leurs enrobages qui parfois agissent contre la floculation ou encore contre les transformations chimiques. Sous certaines conditions, il semble que les nAg pourraient être rejetées dans les écosystèmes aquatiques sous leur forme originelle (Kaegi et al., 2011). Les enrobages pourraient avoir un rôle important sur le devenir et l'impact des nanoparticules dans l'environnement, et pour effectuer une évaluation pertinente des risques, il faudrait alors effectuer des études et proposer des modélisations pour chaque type de nAg (Hendren et al., 2013). Par ailleurs, les nAg ayant très certainement déjà subi des transformations physiques et chimiques avant leur arrivée en STEP, il faudrait

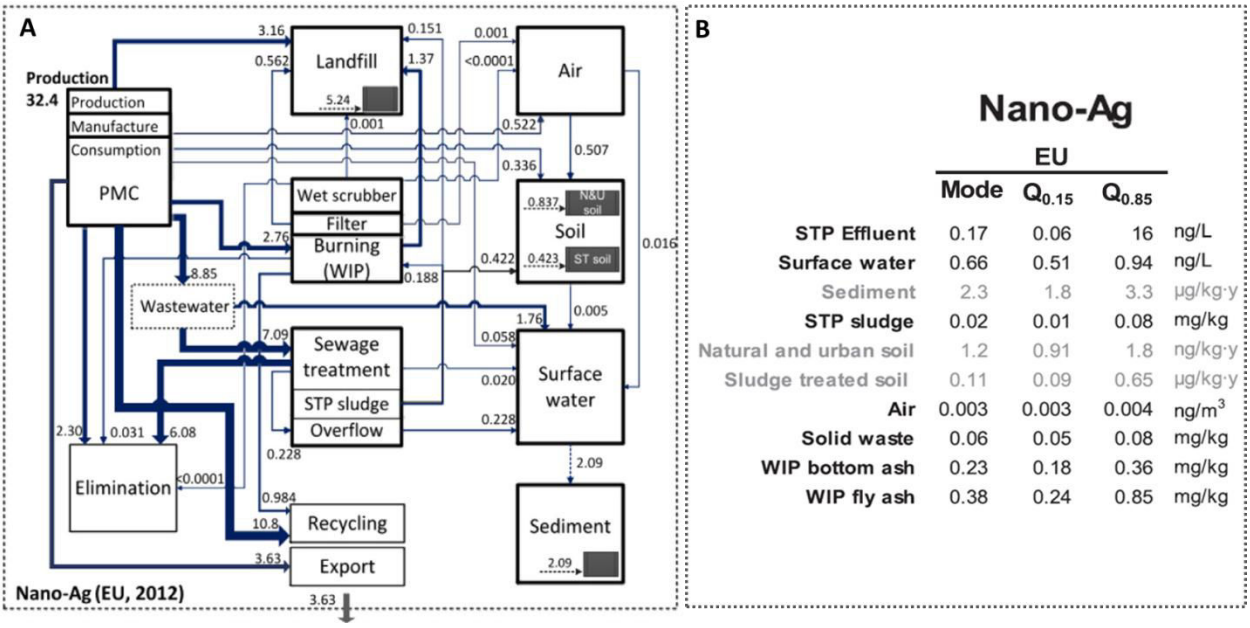
de ce fait raisonner sur des nanoparticules altérées présentant des formes, des tailles et des compositions potentiellement différentes (Lowry et al., 2012b).

Le risque d'un relargage de nAg dans les eaux de surface semble avéré, que ce soit via les effluents après leur passage en STEP, via les relargages directs dans l'environnement ou encore via la gestion des boues de STEP comme par exemple leur épandage en agriculture.

I.2.4.3. Concentration dans les cours d'eau : limites techniques et modélisations

Même si des rejets de nanoparticules semblent être inévitables, à l'heure actuelle peu de données sont disponibles concernant leurs concentrations environnementales. Des mesures quantitatives de concentrations, et qualitatives de tailles, formes et compositions des nanoparticules dans les milieux, sont nécessaires pour pouvoir étudier leur devenir, leur transport et surtout leurs risques potentiels pour les écosystèmes (Hassellöv et al., 2008). A l'heure actuelle, les techniques disponibles ne permettent pas des détections et quantifications fiables qui pourraient être applicables en routine pour des concentrations environnementales faibles (Gottschalk and Nowack, 2011). Comparées aux analyses chimiques traditionnelles, les mesures pour les nanoparticules concernent d'une part l'aspect chimique et d'autre part l'aspect physique (forme, taille) qui sont étroitement liés (von der Kammer et al., 2012). Leurs propriétés physicochimiques sont aussi reliées au milieu environnant et le traitement nécessaire à leur analyse peut modifier ces propriétés et entrainer l'apparition d'artefact de mesure (von der Kammer et al., 2012). Dans leur revue bibliographique, (von der Kammer et al., 2012) ont répertorié et décrit différentes approches permettant de détecter et caractériser les nanoparticules dans des milieux complexes. Ils ont pointé du doigt les aspects à développer avant d'élaborer de nouvelles techniques de mesure spécifiques aux nanoparticules comme par exemple la préparation des échantillons et leur condition de stockage.

A l'heure actuelle, les modélisations mathématiques restent finalement l'outil le mieux adapté pour évaluer les concentrations environnementales prédictibles (PEC) (Gottschalk et al., 2013; Gottschalk and Nowack, 2011; Mueller and Nowack, 2008). L'une des plus récentes études de modélisation a été réalisée par Sun et al. (2014) et concerne l'Europe en 2012. C'est à partir de données sur les volumes de production et sur les cycles de vie des nAg que les flux de distribution et de transfert entre compartiments ont pu être calculés (Figure 10A). Les concentrations prédictibles en nAg évaluées dans divers compartiments sont présentées dans la figure 10B. Pour les eaux de surface la PEC est de l'ordre du $ng.L^{-1}$ avec une valeur fréquente de 0,66 $ng.L^{-1}$ qui pourrait s'élever jusqu'à 0,94 $ng.L^{-1}$.



<u>Figure 10 :</u> A : Flux de transport et distribution des nAg en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 32,4 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des nAg dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014).

Dans leur étude qui a servi de précurseur dans ce domaine, Gottschalk et al. (2009) avaient quant à eux calculé une PEC de 0,76 qui pouvait aller jusqu'à 2,16 ng.L^{-1}. A l'aide de ces valeurs les auteurs avaient établi un quotient de risque correspondant au ratio des valeurs de PEC (concentration environnementale prédictible)/PNEC (concentration prédictible sans effet). En Europe, pour les nAg, ce quotient était de 1,1 pour les eaux de surface et de 61,1 pour les effluents de STEP. L'ensemble de ces valeurs montre que les rejets des nAg dans les écosystèmes d'eau douce doivent être pris en compte et nécessitent le développement de recherche visant à appréhender leur devenir dans l'environnement tout autant que leurs effets. Si pour le moment, les faibles concentrations et le quotient de risque semblent être raisonnables, il convient de pas oublier que la production et l'utilisation des nAg est en constante augmentation ce qui nécessairement induira une augmentation des concentrations et le risque associé.

I.2.4.4. Transformation et dégradation des nanoparticules

Tout au long de leur cycle de vie et dès leur production, les nanoparticules peuvent subir des transformations ou des dégradations (Lowry et al., 2012b; Nowack et al., 2012). Leur rejet dans les cours

d'eau ne se fait sans doute pas sous leurs formes originelles mais bien sous des formes altérées. Pour être le plus réaliste possible, il faudrait vieillir les nanoparticules avant d'effectuer des tests d'écotoxicologie. Cependant, il est actuellement difficile d'évaluer quelles sont ces transformations dans un cycle de vie classique puisque la technique fait encore défaut. De plus, il existe une telle multitude de nanoparticules qui ont des devenirs pouvant être complètement différents et donc des transformations qui sont propres à leur histoire, que seule une étude au cas par cas semble réellement cohérente. Toutefois pour maîtriser et comprendre au mieux les risques d'un rejet de nanoparticules dans les écosystèmes aquatiques, ces transformations sont à prendre en compte. La dissolution oxydative est le processus qui contrôle le plus le devenir et le comportement des nAg dans les systèmes aquatiques (Lowry et al., 2012b; Nowack et al., 2012; Peretyazhko et al., 2014).

En effet, au contact d'oxygène et de protons, les nAg peuvent libérer de l'argent ionique par dissolution oxydative (Lee et al., 2012; Liu and Hurt, 2010; Peretyazhko et al., 2014). Dans leur étude, Peretyazhko et al. (2014) ont décrit les réactions :

$$4\,Ag_{(s)} + O_2 = 2\,Ag_2O_{(s)} \qquad (1)$$

$$Ag_2O_{(s)} + 2H^+ = 2\,Ag^+ + H_2O \qquad (2)$$

Ils expliquent que dans un premier temps, la surface de la nAg est oxydée par du dioxygène dissous (O_2), ce qui forme une fine couche d'argent oxydé ($Ag_2O_{(s)}$, équation 1). C'est cette couche, qui, via les protons (H^+) va rejeter de l'argent dissous sous forme d'ions (Ag^+, équation 2). Une fois la couche d'$Ag_2O_{(s)}$ complètement dissoute, d'autres oxydations vont se produire sur la surface de la nanoparticule et sa dissolution continuera progressivement. Le taux de dissolution dépendra des paramètres propres à la nanoparticule comme la taille, la forme, l'enrobage ou encore la fonctionnalisation, mais il dépendra également du milieu environnant, comme par exemple la chimie de l'eau pour les écosystèmes aquatiques. La température, le pH, la force ionique ou encore la présence de ligands sont des facteurs pouvant influencer ce processus (Auffan et al., 2009; Behra et al., 2013; Elzey and Grassian, 2010; Liu and Hurt, 2010; Peretyazhko et al., 2014). Les dissolutions sont parfois contrôlées par un seul de ces paramètres mais dans la plupart des situations, c'est une combinaison de facteurs qui entre en jeu, et il devient alors compliqué d'évaluer la contribution respective de chaque facteur dans ces réactions. En faisant varier un ou deux de ces facteurs, Liu and Hurt, (2010) ont montré que dans leurs conditions d'expérimentation (principalement de l'eau déminéralisée), la dissolution des nAg (enrobage de citrate ; de 2 à 8 nm de diamètre) était accentuée par de fortes températures (20, 37°C) et de fortes concentrations (plus forte dissolution à 2 > 0,2 > 0,05 $mg.L^{-1}$ de nAg). Au contraire, elle était diminuée avec l'augmentation du pH (5 fois plus de dissolution à pH4 qu'à pH7) ou encore par la présence d'acides

fulviques et humiques. Ils ont également montré qu'en absence d'oxygène dans le milieu ce processus était quasiment nul voire inexistant. Peretyazhko et al. (2014), ont quant à eux montré l'importance de la taille des nAg sur ce processus en mesurant des taux de dissolution plus importants pour les plus petites tailles de nanoparticules.

Alors que certaines études rapportent une dissolution rapide et totale des nAg entrainant leur complète disparition (Liu and Hurt, 2010), d'autres au contraire estiment que la dissolution est incomplète et atteint même un état de stabilité après plusieurs heures (Kittler et al., 2010; Lee et al., 2012; Peretyazhko et al., 2014). Dans leur étude concernant des nAg de 10 nm immergées dans des fluides biologiques artificiels (fluides interstitiel et lysosomal), Stebounova et al. (2011) ont, quant à eux, noté une absence quasi-totale de dissolution. Ces cinétiques de dissolution ont majoritairement été évaluées sur des milieux expérimentaux simples et il serait donc un peu hâtif d'établir des généralités en terme de dynamique de dissolution alors que les moyens techniques ne sont pas encore optimaux pour des études en situation complexe, telle qu'une eau de rivière.

Le second processus de transformation chimique pouvant modifier le comportement et la surface des nAg est la sulfuration qui peut être en étroite relation avec le phénomène de dissolution. En effet, une fois oxydées, les nAg et les ions Ag^+ présentent une forte affinité avec certains ligands, par exemple les sulfures (Lowry et al., 2012b). Les nAg recouvertes de sulfure voient leurs propriétés de surface modifiées, pouvant induire leur agrégation et diminuer leur dissolution (Figure 11). Les ligands organiques pourvus de groupement thiol pourront eux aussi modifier la surface des nAg et favoriser leur dissolution. Enfin, la lumière peut aussi impacter les nAg (Nowack et al., 2012). La dégradation de leur enrobage peut favoriser leur agrégation (Lowry et al., 2012b).

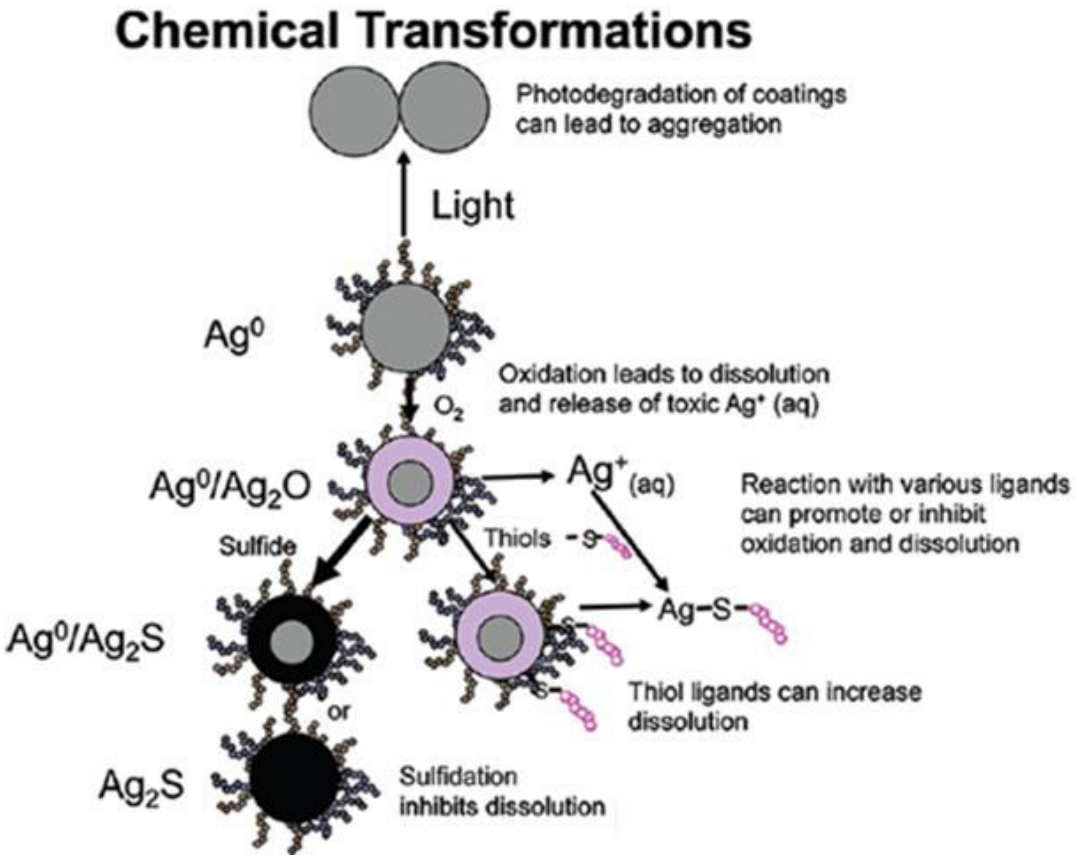


Figure 11 : *Représentation des transformations chimiques potentielles sur les nAg affectant leur comportement dans le milieu. L'épaisseur des flèches correspond à la probabilité de la réalisation du processus. La couleur grise correspond à l'Ag^0, le violet à l'Ag_2O et le noir à l'Ag_2S.*

D'après (Lowry et al., 2012b).

L'agrégation des nanoparticules fait également partie des transformations dites physiques auxquelles elles sont largement confrontées notamment dans les milieux complexes (Figure 12). L'homoagrégation correspond à l'agrégation entre plusieurs nanoparticules identiques alors que l'hétéroagrégation fait état de l'agrégation de nanoparticules avec d'autres structures. D'importantes concentrations de particules organiques dans un milieu naturel comme l'eau de rivière favorise l'hétéroagrégation (Lowry et al., 2012b).

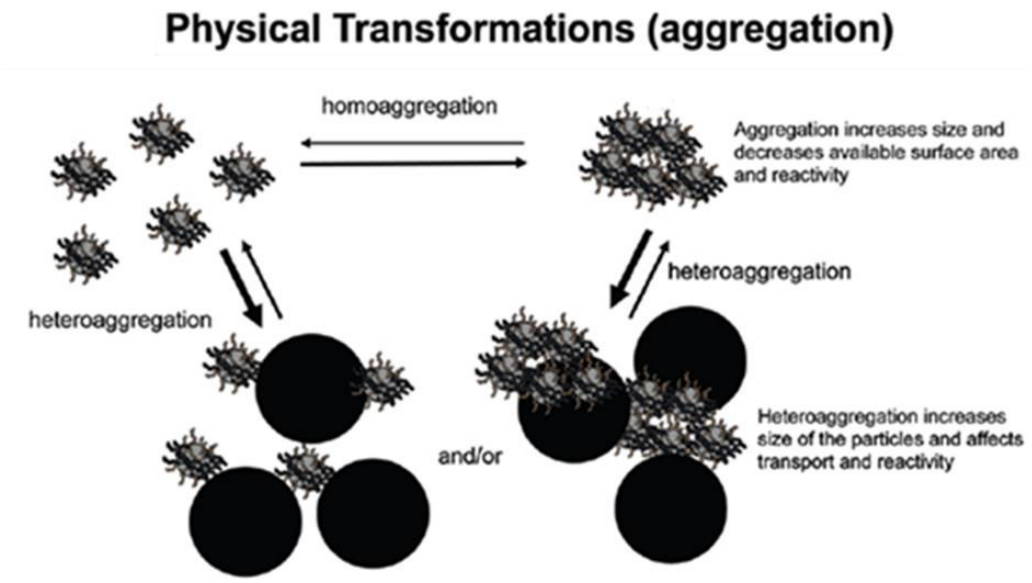


Figure 12 : Représentation d'une transformation physique potentielle des nAg : l'agrégation pouvant affecter leur comportement dans le milieu. L'épaisseur des flèches correspond à la probabilité de la réalisation du processus. D'après (Lowry et al., 2012b).

Ce phénomène d'agrégation est, comme pour la dissolution, fortement dépendant des propriétés intrinsèques des nAg ainsi que des conditions physicochimiques du milieu environnant (Behra et al., 2013; Elzey and Grassian, 2010; Fabrega et al., 2011). Les enrobages des nAg, comme par exemple l'enrobage de citrate, permet d'éviter ce phénomène d'agrégation dans le milieu. Toutefois, toutes les nAg n'en sont pas pourvues et cet enrobage peut de surcroit lui aussi être transformé voire dégradé dans les milieux aquatiques. Alors que de petites nanoparticules monodispersées sont facilement transportables dans les cours d'eau au gré des courants, les hétéroagrégats sont eux moins mobiles et ont plutôt tendance à sédimenter devenant moins disponibles pour les organismes présents dans la colonne d'eau (Behra et al., 2013). Les rapports surface/volume des agrégats sont diminués, et les nAg peuvent perdre leur caractère « nano » et donc leur réactivité de surface si particulière (Lowry et al., 2012b). Dans les eaux naturelles, la matière organique comme par exemple les substances humiques (acides humiques et acides fulviques) font partie des composants les plus susceptibles de s'agglomérer aux nAg (Chinnapongse et al., 2011; Grillo et al., 2015; Maurer-Jones et al., 2013). Le carbone organique dissous pourrait par exemple enrober les nAg et favoriser leur stabilité en empêchant leur dissolution (Jie Gao et al., 2009; Grillo et al., 2015).

L'ensemble des processus décrits précédemment, ne représente pas un inventaire exhaustif des transformations et dégradations possibles des nAg, mais il s'agit de processus qui semblent le plus

participer aux modifications de comportement et au devenir des nanoparticules dans les écosystèmes d'eau douce. Ils peuvent surtout influencer la biodisponibilité des nAg pour les organismes aquatiques et leur étude est donc d'une grande importance dans les expérimentations en écotoxicologie aquatique et en analyse du risque.

I.2.4.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique

Les rejets de nAg dans les écosystèmes aquatiques semblent être inévitables. Tout au long de leur cycle de vie les nAg ont subi des dégradations qui peuvent augmenter ou diminuer leur bioaccessibilité et leur biodisponibilité pour les organismes aquatiques. L'argent étant considéré comme l'un des métaux les plus toxiques dans les milieux aquatiques notamment pour les invertébrés (Bianchini et al., 2002; Luoma, 2008; Ratte, 1999; Wood et al., 1999), une hypothèse serait que des rejets d'argent sous forme nanoparticulaire pourraient affecter les organismes à différents niveaux d'organisation biologiques et avoir des conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes. Dans la littérature, de nombreuses études se sont intéressées aux effets des nAg sur les bactéries (Choi et al., 2008; Choi and Hu, 2008; Colman et al., 2012; Das et al., 2012; Marambio-Jones and Hoek, 2010), les algues (Navarro et al., 2008; Piccapietra et al., 2012), les invertébrés (Asghari et al., 2012; Croteau et al., 2011; Das et al., 2013; Gomes et al., 2014; Hoheisel et al., 2012) ou encore les poissons (Chae et al., 2009; Choi et al., 2010; Farkas et al., 2011a; Griffitt et al., 2009; Scown et al., 2010). Si certaines études estiment que les effets observés sont essentiellement dus au phénomène de dissolution et donc au relargage d'argent dissous (Kennedy et al., 2010), d'autres ont prouvé l'existence d'impacts ou de voies d'action uniquement dus aux nAg (Asghari et al., 2012; Chae et al., 2009; Gomes et al., 2014; Griffitt et al., 2012, 2009). Leurs forme et taille ont une grande influence sur leur dissolution ainsi que sur leur toxicité et il semble généralement admis que plus les nanoparticules sont petites et plus elles sont toxiques (Carlson et al., 2008; Hoheisel et al., 2012; Marambio-Jones and Hoek, 2010).

En termes de toxicité, des valeurs de concentrations moyennes entraînant 50% de mortalité après 48h ($CL50_{48h}$) ont été mesurées chez les daphnies entre 2 et 100 $\mu g.L^{-1}$ (Das et al., 2012; Griffitt et al., 2012; Hoheisel et al., 2012; Kennedy et al., 2010). Chez les poissons zèbres, ces CL50 ont été mesurées à des concentrations plus élevées allant de 7 $mg.L^{-1}$ après 48h d'exposition (Griffitt et al., 2008) et à 250 $mg.L^{-1}$ après 24h (Choi et al., 2010). Des tests effectués sur des embryons de poissons zèbres ont également mesuré des concentrations létales de l'ordre du $mg.L^{-1}$ avec des CL50 de 25 à 50 $mg.L^{-1}$ (Asharani et al., 2008).

Ces toxicités font suite aux interactions des nAg et/ou de l'argent dissous avec les organismes induisant des phénomènes d'adsorption et/ou d'absorption. Des études ont montré une accumulation de l'argent sous forme nanoparticulaire ou dissous au sein des organismes et parfois même dans certains tissus ou organes. En effet, après 21 jours d'exposition à des nAg de 35 nm aux concentrations de 0,01 et 0,1 $mg.L^{-1}$, des carpes (Cyprinus carpio) ont été disséquées et les tissus prélevés ont été dosés par ICP-OES (techniques analytiques à plasma induit détectée avec un spectromètre à émission optique). Des concentrations en argent ont été mesurées dans le foie, la vésicule biliaire, les intestins et les branchies des organismes contrairement au cerveau, au sang et aux reins montrant ainsi une biodistribution de l'argent (Gaiser et al., 2012). Chez les invertébrés, des concentrations en argent ont également été mesurée en spectrométrie d'absorption atomique (AAS) dans les branchies et glandes digestives de moules marines exposées 15 jours à 10 $\mu g.L^{-1}$ de nAg d'une taille inférieure à 100 nm (Gomes et al., 2014), ainsi que par ICP-MS dans les tissus mous d'escargots d'eau douce exposés par voie trophique ou directe pendant 2h à 24h à des diatomées ou à des milieux exposées de 0,4 à 250 nmol de nAg (Croteau et al., 2011). Cependant, afin de préciser et de localiser les nAg dans les tissus des organismes, les techniques d'imagerie sont à l'heure actuelle les mieux adaptées. Dans leur études Farkas et al. (2011a) ont par exemple utilisé la microscopie optique et la microscopie électronique à transmission et ont observé la présence de nAg dans des cellules branchiales de truite arc-en-ciel exposées durant 24 à 48 h à des concentration de nAg enrobées de citrate et PVP de 10 à 20 $mg.L^{-1}$. Dans une autre étude, des nAg ont même été observées par TEM à l'intérieur des cellules et plus spécifiquement au niveau des noyaux de cellules d'embryon de poissons zèbres exposés durant 48 h à des nAg enrobées de BSA et pour des concentrations de 25 $\mu g.mL^{-1}$(Asharani et al., 2008). Chez les daphnies, un nouveau type d'imagerie par NanoSIMS (spectrométrie de masse à ions secondaires) a permis d'observer la présence de nAg de 20, 23 et 200 nm dans la lumière de l'intestin ainsi que le passage des nAg de 200 nm dans l'espace intercellulaire de la couche épithéliale de la membrane de l'intestin (Georgantzopoulou et al., 2013).
Cette accumulation peut alors s'effectuer par voie directe ou trophique (Croteau et al., 2011; Gaiser et al., 2012) et entrainer des effets sur les organismes ainsi que le transfert d'argent le long du réseau trophique.

Suite à une contamination aux nAg plusieurs effets ont déjà été observés sur les organismes comme l'induction de dommages oxydatifs via la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Carlson et al., 2008; Gomes et al., 2014; Kaur and Tikoo, 2013; Lapresta-Fernandez et al., 2012; Navarro et al., 2008; Scown et al., 2010). La perturbation de la stabilité membranaire des cellules a aussi plusieurs fois été reportée (Farkas et al., 2011a; Navarro et al., 2008).

Les études des effets des nAg se sont en premier lieu focalisées sur des aspects de viabilité des organismes, de dommages cellulaires, de réponses antitoxiques ou antioxydantes via notamment l'étude de biomarqueurs (Chae et al., 2009; Farkas et al., 2011a; Gomes et al., 2014). Les résultats plus détaillés et propres chaque étude sont présentés dans le tableau 1 et seront décrits et confrontés à nos résultats tout au long du manuscrit.

Pour affiner l'évaluation du risque, les études devraient à l'avenir coupler plusieurs niveaux d'organisation en s'intéressant par exemple à des biomarqueurs comportementaux ou fonctionnels. De plus, pour que l'évaluation du risque soit la plus réaliste, et malgré un effort observé ces dernières années dans le domaine des nAg, il serait bon de réduire au maximum les concentrations d'exposition afin de se rapprocher au mieux des concentrations environnementales prédites.

<u>Tableau 1:</u> Etudes rapportant des données d'écotoxicité des nAg sur les orgnanismes aquatiques.

Organismes	Espèces	Contaminations	Tailles des nAg	Concentrations initiales en argent (nAg)	Conditions expérimentales	Effets des nAg observés	Références
Bactéries	• Bactéries autotrophes et hétérotrophes (*Escherichia coli*)	nAg • sphérique • enrobage : alcool polyvinylique (PVA) Ag ($AgNO_3$) et AgCl	• 14 ± 6 nm	• de 0 à 1 $mg.L^{-1}$	• bouillon nutritif • 20 h d'exposition	• Inhibition de croissance d'*E. coli* • Inhibition de la respiration des bactéries autotrophes	Choi et al., 2008
	• Bactéries nitrifiantes (aliquot)	nAg • sphérique • enrobage : alcool polyvinylique (PVA) Ag ($AgNO_3$) et AgCl	• de 5 à 70 nm	• de 0 à 1 $mg.L^{-1}$	• Bouillon nutritif 30 min d'exposition	• Interaction : contamination /inhibition de croissance (nAg < 5 nm) • Interaction : taille des nAg/toxicité sur les bactéries • Interaction : inhibition de croissance/stress oxydant	Choi et Hu, 2008
	• Communauté bactérienne d'une eau d'une rivière	nAg • sphérique • enrobage : polyvinylpyrrolidone (PVP) $AgNO_3$	• 21 ± 17 nm	• de 0 à 75 $mg.L^{-1}$	• eau de rivière • 8 jours d'exposition	• Baisse de la respiration due aux nAg < baisse due à l'$AgNO_3$ Effet en partie dû à la dissolution des nAg	Colman et al., 2012
	• Communauté bactérienne prélevées en rivière	nAg • enrobage : polyacrylate • fonctionnalisation : carboxy $AgNO_3$	• de 1 à 10 nm	• 0 à 10 $mg.L^{-1}$	• eau de 9 rivières • de 1 à 48 h d'exposition	• Baisse de la production bactérienne en fonction du temps, de la concentration et du milieu • LOEC de 8 à 66 $\mu g.L^{-1}$ • Très faible dissolution (<10%)	Das et al., 2012
	• *Escherichia coli*	nAg (3 formes) • sphérique • en bâtonnet • nanoplaque triangulaire tronquée	• 39 nm • 36 et 100 nm • 40 nm	• de 1 à 100 µg d'Ag dans 100 mL de bouillon nutritif	• Bouillon nutritif • 26 h d'exposition	• Baisse de la croissance et du nombre de *E. coli* • Effets des nAg dépendants de leur forme • Toxicité plus importante pour les nanoplaques triangulaires tronquées	Pal et al., 2007
Bactéries, algues et invertébrés d'eau douce	• *Vibrio fischeri* • *Desmodesmus subspicatus* • *Daphnia magna*	nAg • sphérique • 2 tailles issus par synthèse chimique • 2 types issues d'une synthèse biologique par des végétaux	20 et 200 nm • 23 et 27 nm	• de 0,003 à 300 $mg.L^{-1}$ • selon les tests	• *V. fisheri* : solution isotonique ; 30 min • *D. subspicatus* : milieu de culture ; 72 h • *D. magna* : eau Volvic ; 48 h d'exposition	• Effets toxiques des nAg sur les 3 espèces • Effets dépendants de la taille, de la voie de synthèse et de la chimie de surface des nAg (nAg 27 nm plus toxique) • *D. magna :* nAg 20, 23 et 200 nm observées dans la lumière intestinale (aggrégat) • Entrée des nAg 200 nm dans l'espace intercellulaire de la couche épithéliale via la membrane de l'intestin des *D. magna* (NanoSIMS) • Dissolution des nAg n'expliquant pas la totalité des effets	Georgantzopoulou et al., 2013

Invertébrés d'eau douce	• *Daphnia magna*	nAg • sphérique • 3 types selon les fournisseurs $AgNO_3$	• de 5 à 25 nm	• de 0,001 à 0,32 mg.L^{-1}	• Milieu M4, test OCDE • 48 h d'exposition	• Toxicité dépendante de la dose et des types de nAg • Ingestion et accumulation des nAg sous la carapace, sur l'extérieur du corps et les appendices • Comportement de nage anormal	Asghari et al., 2012
	• *Daphnia magna* (juvéniles)	nAg • enrobage : polyacrylate • fonctionnalisation : carboxy	• de 1 à 10 nm	• de 0,5 à 5 µg.L^{-1}	• Test OCDE méthode 202, milieu, eau déminéralisée • 24 h et 48 h d'exposition	• NOEC = 0,75 µg.L^{-1} • LOEC = 1,3 µg.L^{-1} • $CL50_{48h}$ = 2,75 µg.L^{-1}	Das et al., 2013
Invertébrés et poisson d'eau douce	• *Daphnia magna* • *Cyprinus carpio*	nAg micro-Ag	• 35 nm • 0,6 à 1,6 µm	• de 0 à 10 mg.L^{-1}	• Eau du protocole standard U.S. EPA (test Daphnie) • Eau du robinet déchlorée • 96 h et 21 jours	• *D. magna* : $CL50_{48h}$ = 0,1 mg.L^{-1} • *Cyprinus carpio* : concentration en argent mesurées dans l'intestin, le foie, la vésicule biliaire et les branchies • Toxicité et distribution tissulaire nAg > micro-Ag • Dissolution des nAg n'expliquant pas la totalité des effets	Gaiser et al., 2010
	• *Daphnia magna* • *Pimephales promelas*	nAg et Ag colloïdal (8 types) • 4 tailles de nAg sphériques • nAg enrobage citrate • nAg enrobage polyvinylpyrrolidone (PVP) • nAg enrobage éthylène diamine tétra-Acétique (EDTA) Boisson commerciale Ag colloïdale $AgNO_3$	• de 10 à 80 nm	• Gamme de concentrations de 0 à plus de 100 µg.L^{-1}	• Eau moyennement dure • 48 h d'exposition	• *D.magna* : $CL50_{48h}$ = de 2 à 97 µg.L^{-1} (8 types nAg) *P.promelas* : $CL50_{48h}$ = de 9 à 126 µg.L^{-1} (8 types nAg) • $CL50_{48h}$ $AgNO_3$ << nAg (8 types) • Toxicité plus forte pour l'argent colloidal et plus faible pour les nAg-PVP • Grande importance de la dissolution des nAg sur les effets observés	• Kennedy et al., 2010
	• *Daphnia magna* • *Pimephales promelas*	nAg • sphérique • sans enrobage $AgNO_3$	de 10 à 200 nm	• *D. magna* : de 0,1 à 100 µg.L^{-1} • *P. promelas* : de 0,01 à 1000 µg.L^{-1}	• Eau (lac) • De 48 à 96 h d'exposition	• D. magna : $CL50_{48h}$ = de 4,31 à 30,36 µg.L^{-1} (toxicité plus importante pour les plus petites tailles) • P. promelas : $CL50_{96h}$ = 89,4 µg.L^{-1} (nAg de 10 nm) • CL50 $AgNO_3$ << CL50 nAg	Hoheisel et al., 2012
Bivalve marin	• *Mytilus galloprovincialis*	nAg • sphérique $AgNO_3$	< 100 nm	10 µg.L^{-1}	• Eau de mer • de 3 à 15 jours d'exposition	• Concentrations en Ag mesurées dans les branchies et les glandes digestives • Augmentation des enzymes antioxydantes : SOD, CAT, Gpx • Induction des MT (branchies > glandes digestives) • Augmentation de la péroxydation lipidique (branchies > glandes digestives)	Gomes et al., 2014
Gastéropode d'eau douce	• *Lymnaea stagnalis*	nAg • sphérique • enrobage : citrate • enrobage : acide humique Ag ($AgNO_3$) et AgCl	• 17 ± 5 nm • 13 ± 3 nm	• de 0,4 à 250 nmol selon les formes d'argent et les tests	• Eau moyennement dure • Exposition par voie directe ou trophique (*Nitzschia palea* = ressource nutritive) • de 2 à 24 h d'exposition	• Contamination à l'Ag dissous > nAg pour les 2 voies d'exposition (Influx nAg-PVP>nAg-cit) • Assimilation de l'Ag issu des nAg • Voie trophique : effets des nAg sur la consommation, la digestion et la croissance des organismes • Concentration en argent plus élevées pour les organismes exposés par la voie trophique que par la voie directe	Croteau et al., 2011

Bivalve et Polychète (estuaire)	• *Scrobicularia plana* • *Hediste diversicolor*	nAg enrobage : maltose $AgNO_3$	• 40-45 nm	• 10 µg.L^{-1}	• Eau de mer et sédiment • 7, 14 et 21 jours d'exposition Simulation des marées • Mésocosmes	• *S. plana* : augmentation des activités des GST, CAT, CSP, Laccase-type PO, Lysozyme et diminution des SOD, TBARS. • Pas d'effet sur les dosages et activités des MT, LDH, AChE, phosphatase acide, sur l'enfouissement, la consommation. Dommage sur l'ADN (glandes digestives) • *H. diversicolor* : augmentation GST, CAT, CSP, ACP, Laccase-type PO, lysosyme. Pas d'effet sur LDH, SOD, AChe, TBARS, l'enfouissement et la consommation • Effets parfois dus spécifiquement à la forme nAg	Buffet et al., 2014
Poissons d'eau douce	*Oryzias latipes*	nAg plusieurs formes dans un même lot (sphérique, octaédrique et décaédrique) $AgNO_3$	• taille moyenne de 50 nm	• de 1 et 25 µg.L-1	• Eau douce • De 1 à 10 jours d'exposition	• $CL50_{96h}$ = 34,6 µg.L^{-1} • Induction des gènes CYP1A, HSP70 et p53 et induction ponctuelle des MT • Dommages cellulaires et à l'ADN, stress oxydatif, mise en place et régulation de mécanismes de détoxication • Empreinte toxique différentes entre les nAg et $AgNO_3$	Chae et al., 2009
	Danio rerio	nAg sans ions Ag^+ (désionisé) AgNO3	• de 5 à 20 nm	• 30, 60 et 120 mg.L^{-1}	• 24 h d'exposition	• induction MT, augmentation MDA, GSH et augmentation de l'expression des gènes bax1, nova et p21 • Baisse de CAT et Gpx • Pas de modification de SOD et des expressions des gènes p53 et blp • nAg induisent une hépatotoxicité : stress oxydatif, dommage à l'ADN et apoptose	Choi et al., 2009
	Oncorhynchus mykiss (cellules branchiales)	nAg enrobage : citrate • enrobage : polyvinylpyrrolidone (PVP) AgNO3	• 12 nm • 7 nm	• de 0 à 20 mg.L-1	• Milieu de culture cellulaire L15 • 24 - 48 h d'exposition	• nAg retrouvées dans les cellules et nAg transportées au travers de multiples couches de cellules épithéliales (différences entre les 2 enrobages et nAg< à AgNO3) • Effet sur la viabilité cellulaire • Augmentation de la GST	Farkas et al., 2011
	Danio rerio	nAg AgNO3	• 26,6 ± 8,8 nm	• 1000 µg.L^{-1}	• Eau moyennement dure • 48 h	• [Ag] dans branchies n'induisant pas de modification de morphologie • Réponse génétique suggérant des réponses biologiques suite à la contamination • Effets pas uniquement dus à la dissolution des nAg	Griffit et al., 2009

Cyprinodon variegatus (juvéniles et adultes)	nAg AgNO3	• 35 nm	• 10 µg.L-1 • 1 µg.L-1	• Eau de mer • 28 à 35 jours Organismes nourris	• [Ag] organismes induisant un épaississement du tissu épithéliale des branchies • Effets non attribuables à la dissolution des nAg	Griffit et al., 2012
Oncorhynchus mykiss	nAg AgNO3	• 10 nm ; 35nm • 600 à 1600 nm	• 10 et 100 $\mu g.L^{-1}$	• Eau déchlorée • 10 jours	• [Ag] dans les différents tissus en fonction des concentrations et type de nAg (nAg 10 les plus concentrées dans les branchies) • Pas d'effet des nAg sur la péroxydation lipidique • Induction d'expression génique dans les branchies suite à l'exposition des nAg 10 nm	Scown et al., 2010

I.2.4.6. Entre représentation hygiéniste et crainte : le cas particulier de l'argent colloidal

L'argent a de tout temps était considéré comme un bon antibactérien. Présent naturellement sur Terre, son utilisation en médecine a longtemps été légitime. Avant le développement des antibiotiques, l'argent colloidal était notamment prescrit dans les pathologies du système nerveux, comme par exemple l'épilepsie (Fung and Bowen, 1996; Wadhera and Fung, 2005). L'argent colloïdal correspond à une solution aqueuse qui peut contenir des ions et/ou des nAg (Berge, 2013). Ces dernières années, un réel engouement s'est installé autour des produits naturels et biologiques. L'argent étant largement considéré comme un produit naturel, par extension, l'argent colloidal a été lui aussi vanté comme sain et bon pour la santé. Même si pour les producteurs et revendeurs il est légalement interdit en France et aux Etats-Unis (Food and Drug Administration, 1999) de vanter les mérites thérapeutiques d'une telle substance, l'utilisation d'internet, de forums et divers sites et blogs vantant les bénéfices de ce remède universel qui est décrit comme guérrissant toutes sortes de pathologies, ont rassemblé de nombreux adeptes. Sur un site français de vente en ligne (http://consomacteurs.com/argent-colloidal/) l'achat de flacons d'argent colloïdal d'une concentration de 15 $mg.L^{-1}$ est possible. La société explique que: « Depuis le 1 janvier 2010, la commercialisation de compléments alimentaires contenant le minéral argent sous toutes ses formes est interdite. » ; puis : « Pour respecter la législation concernant les compléments alimentaires, le Laboratoire Bio Colloïdal France commercialise son argent colloïdal comme produit cosmétique bien que sa composition n'ait pas changé depuis cette mesure... ». Si cette solution aqueuse est conseillée pour une utilisation en application locale pour purifier la peau, atténuer les rougeurs ou soulager les tiraillements, une possible ingestion par voie orale est aussi suggérée. La société américaine Purest colloids, qui a déjà reçu des avertissements par la FDA (Food and Drud Administration), a directement mis en vente un complément alimentaire visant à optimiser la santé et à « booster » le système immunitaire : Le Mesosilver. Sur leur site (https://www.purestcolloids.com/mesosilver.php) il est dit que cette eau serait composée de nAg uniquement (sans présence d'ion), d'un diamètre moyen de 0,65 nm à une concentration de 20 $mg.L^{-1}$ dans de l'eau déminéralisée. Sur le flacon, il est conseillé par exemple d'en ingérer une cuillère à soupe par jour dans un estomac vide, cette posologie pouvant être multipliée par 4 si nécessaire (1 cuillère à soupe = 15 mL équivalent à 300 µg d'argent).

Certains de ces utilisateurs, pensant être détenteurs de la panacée accusent les firmes pharmaceutiques, les politiciens et même les associations écologistes d'être au service des compagnies pharmaceutiques et de leurs intérêts économiques quand ces derniers préviennent et mettent en garde des risques et des dangers des nAg et de l'argent colloïdal (Berge, 2013). Pourtant, la pathologie nommée argyrie, bien

connue de par son effet de coloration de la peau en bleue, est une des conséquences directes de la consommation d'argent en excès (Fung and Bowen, 1996). Outre l'aspect esthétique, cette maladie n'est pas anodine puisqu'elle s'accompagne généralement d'autres troubles tels que des ulcères (Wadhera and Fung, 2005).

Au contraire d'autres voix composées d'institutions et d'associations s'élèvent contre le développement et l'usage des nAg et de l'argent colloïdal en suggérant de les classer dans la catégorie des pesticides. Elles demandent et recommandent de ne plus utiliser de produits alimentaires et d'usages quotidiens qui en contiennent avant d'avoir obtenu une évaluation des risques sur la santé humaine et environnementale.

I.3. Les nanoparticules de dioxyde de titane ($nTiO_2$)

I.3.1. Marché

Avec une estimation globale de production de plus de 80 000 tonnes en 2010, les nanoparticules de dioxyde de titane ($nTiO_2$) sont les nanoparticules les plus produites (Keller et al., 2010). En France, en 2013, les productions et importations cumulées se trouvaient dans un intervalle de tonnage compris entre 10 000 et 100 000 tonnes (Direction générale de la prévention des risques, 2014). La figure 6 (section I.2.1.) montre qu'en 2013, avec 179 produits, les $nTiO_2$ se plaçaient à la 2ème place des nanoparticules incorporées dans des produits derrière les nAg (The Project on Emerging Nanotechnologies). Enfin, ce sont celles qui sont les plus connues du grand public notamment pour leur incorporation largement médiatisée dans les crèmes solaires.

I.3.2. Propriétés et utilisations

Les $nTiO_2$ possèdent de nombreuses propriétés qui conditionnent leur utilisation dans de nombreux produits de la vie courante. L'une des plus connues et étudiées est leur propriété d'absorption et de dispersion d'une large gamme de rayonnements UV (Shi et al., 2012). C'est pour cette raison mais également pour des propriétés optiques, que les $nTiO_2$ sont incorporées dans de nombreuses crèmes solaires (Johnson et al., 2011; Labille et al., 2010; Weir et al., 2012). En effet, c'est pour le pouvoir de coloration notamment en blanc et d'épaississement qu'elles sont largement incorporées dans divers produits de cosmétiques comme des crèmes, des dentifrices ainsi que des produits alimentaires comme les bonbons ou les chewing-gums (Weir et al., 2012). Weir et al. (2012) ont effectué un inventaire non

exhaustif des produits commerciaux indiquant la présence de dioxyde de titane sur leurs étiquettes et possédant une couleur blanche. Leurs concentrations en titane ont été quantifiées et certains des produits sélectionnés ont été caractérisés en microscopie électronique afin de visualiser la présence de titane sous forme nanoparticulaire. Dans certains produits ne comportant pas le terme « nano » sur l'étiquette, des nanoparticules ont quand même été observées. La figure 13 présente les concentrations en titane mesurées dans divers produits alimentaires.

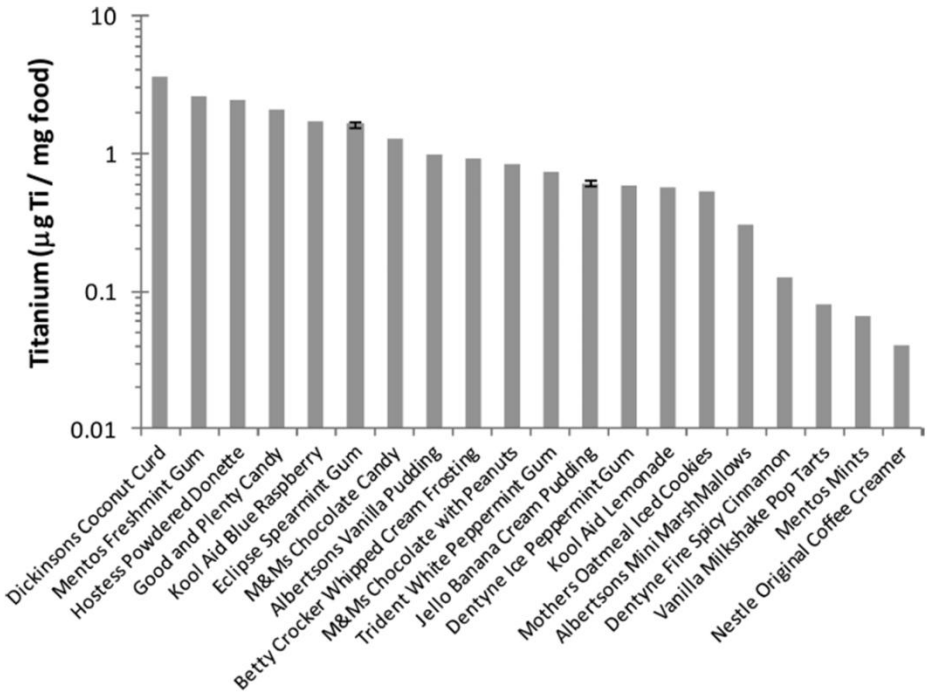


Figure 13 : *Concentrations en titane mesurées dans divers produits fréquemment consommés. Les barres d'erreur représentent les écart-types pour les échantillons traités en triplicats. Figure tirée de Weir et al. (2012).*

Les $nTiO_2$ peuvent aussi être utilisées pour leur propriétés photocatalytiques, énergétiques ou encore photovoltaïques (Chen and Mao, 2007; Ni et al., 2007).

I.3.3. Synthèse, forme

De par leur large gamme de propriétés innovantes et leur utilisation dans de nombreux domaines, les différentes voies de synthèse et de production des $nTiO_2$ ont connu un réel engouement ces dernières années. Dans leur très complète revue bibliographique, Chen and Mao (2007) avaient déjà répertorié une quinzaine de méthodes de synthèse en proposant même des modifications pour améliorer ces nanoparticules. La synthèse de différentes formes, structures cristallines et tailles de $nTiO_2$ dépend entièrement de la méthode de préparation. Le TiO_2 est polymorphe, c'est-à-dire qu'il peut exister sous

plusieurs phases correspondant à des structures cristallines différentes : l'anatase, le rutile et la brookite sont les 3 plus courantes (Muscat et al., 2002; Reyes-Coronado et al., 2008). En fonction de la température, ces structures peuvent passer d'une phase à l'autre (Chen and Mao, 2007). La synthèse des $nTiO_2$ favorise souvent la phase anatase qui est alors la plus fréquemment retrouvée, alors que la phase brookite est plutôt rare (Muscat et al., 2002; Zhang and Banfield, 2000). Lorsqu'une $nTiO_2$ est nommée, la forme et la structure cristalline sont précisées comme par exemple les $nTiO_2$ nanotiges anatases ou les $nTiO_2$ nanotiges rutiles. Il existe donc aussi une grande variété de formes de $nTiO_2$ comme par exemple: les tiges, les tubes, les fils, les cubes, les bâtonnets, les sphères ou encore les ellipses (Liao and Liao, 2007). Ces $nTiO_2$ peuvent aussi posséder un enrobage pour favoriser leur stabilité et prévenir leur agrégation (Carlotti et al., 2009; Labille et al., 2010; Weir et al., 2012). Les formes, tailles, conformations cristallines et enrobages des $nTiO_2$ ont une grande influence sur leur propriété et sur leur réactivité de surface et donc également sur leurs possibles risques pour l'environnement.

I.3.4. Cycle de vie des $nTiO_2$: de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau

I.3.4.1. Exemple des rejets des $nTiO_2$ via l'utilisation de nanoproduits

Largement utilisées dans les crèmes solaires, les cosmétiques et les peintures, les $nTiO_2$ peuvent être directement rejetées dans les écosystèmes aquatiques et terrestres via la baignade ou le lessivage. Certaines études ont d'ailleurs évalué la dispersion et la dégradation dans l'eau de $nTiO_2$ qui sont couramment intégrées dans la composition des crèmes solaires (Auffan et al., 2010; Labille et al., 2010). D'autres travaux ont étudié le relargage par le lessivage des peintures (Kaegi et al., 2008; Som et al., 2011). Kaegi et al. (2008) ont par exemple étudié une vieille façade d'immeuble peinte en 2006 avec une peinture contenant des $nTiO_2$ et en utilisant le même produit, ils ont construit une façade expérimentale qu'ils ont peinte. Les eaux de ruissellement de ces 2 surfaces ont été plusieurs fois récupérées et analysées. En parallèle de ces prélèvements, les eaux de ruissellement d'une grande zone urbaine ont également été recueillies à proximité des façades expérimentales. Des mesures en microscopie électronique ont montré que sous l'influence des conditions météorologiques naturelles, des particules de titane de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres pouvaient se détacher des façades (âgées et neuves), entrer dans les eaux de ruissellement de la ville et être potentiellement rejetées dans les écosystèmes aquatiques. Ces quelques exemples montrent le risque de relargage direct des $nTiO_2$ dans l'environnement, mais leur large gamme d'applications notamment dans l'alimentation, le dentifrice, le shampooing et toute sorte de crèmes impliquent un rejet via les urines et les eaux usées et donc leur entrée dans les STEP (Johnson et al., 2011; Kiser et al., 2009; Weir et al., 2012).

I.3.4.2. Comportement des $nTiO_2$ dans les stations d'épuration

Les $nTiO_2$ vont donc, pour une grande majorité, rejoindre les STEP pour être traitées, mais une partie d'entre elles vont par la suite être rejetées dans les effluents puis se retrouver dans les eaux de surfaces. Dans leur étude, Johnson et al. (2011) ont montré une baisse de 90% des fractions de titane inférieures à 0,45 µm entre l'influent (30 $\mu g.L^{-1}$) et l'effluent (3,2 $\mu g.L^{-1}$). Au long du processus de traitement des eaux, les $nTiO_2$, comme beaucoup de nanoparticules métalliques oxydées sont en très grande majorité adsorbées dans les boues et ne sont donc plus en suspension dans l'eau (Johnson et al., 2011; Kiser et al., 2009; Limbach et al., 2008). En revanche, même si les $nTiO_2$ sont adsorbées par les boues de STEP, certains composés présents dans les eaux peuvent faire varier leur propriété d'adsorption (Christian et al., 2008a; Kiser et al., 2009). Ainsi, des $nTiO_2$ peuvent rester en suspension dans l'eau et être rejetées dans les écosystèmes aquatiques. Par ailleurs, la grande quantité de nanoparticules présentes dans les boues de STEP représente aussi une menace pour les écosystèmes terrestres et aquatiques puisque dans de nombreux pays, ces boues sont répandues sur les terrains agricoles comme agent fertilisant. Le risque d'un lessivage des sols et d'un rejet dans les cours d'eau est donc bien présent (Johnson et al., 2011; Kiser et al., 2009).

I.3.4.3. Concentration dans les cours d'eau : limites techniques et modélisation

Même si une étude a pu identifier la présence en microscopie électronique de particules de titane dans les eaux de ruissellement d'une ville (Kaegi et al., 2008), comme pour les nAg, la technique est encore trop limitée pour effectuer des mesures de concentrations fiables dans les systèmes complexes que sont les eaux de surface. Différentes études ont mesuré ou modélisé la concentration en titane dans les effluents de STEP. Certains ont mesuré des concentrations entre 3 et 15 $\mu g.L^{-1}$ de titane (Johnson et al., 2011; Kiser et al., 2009), ce qui est cohérent avec les résultats des études de modélisation effectuée pour l'Europe qui ont évalué ces concentrations entre 2,5 et 110 $\mu g.L^{-1}$ avec des valeurs mode de concentrations (valeur la plus fréquemment retrouvée) entre 3,47 et 16 $\mu g.L^{-1}$ (Figure 14, Gottschalk et al., 2009; Sun et al., 2014). La Figure (14) montre les provenances des différents rejets de $nTiO_2$ qui peuvent entrer dans les eaux de surface. Sur une production estimée à 10 200 tonnes en Europe en 2012, un total de 1 944 tonnes de $nTiO_2$ auraient atteint les eaux de surface, 1 940 aurait sédimenté laissant quand même plus de 4 tonnes de nanoparticules dans les eaux de surface sous leur forme initiale ou sous une forme dégradée et transformée.

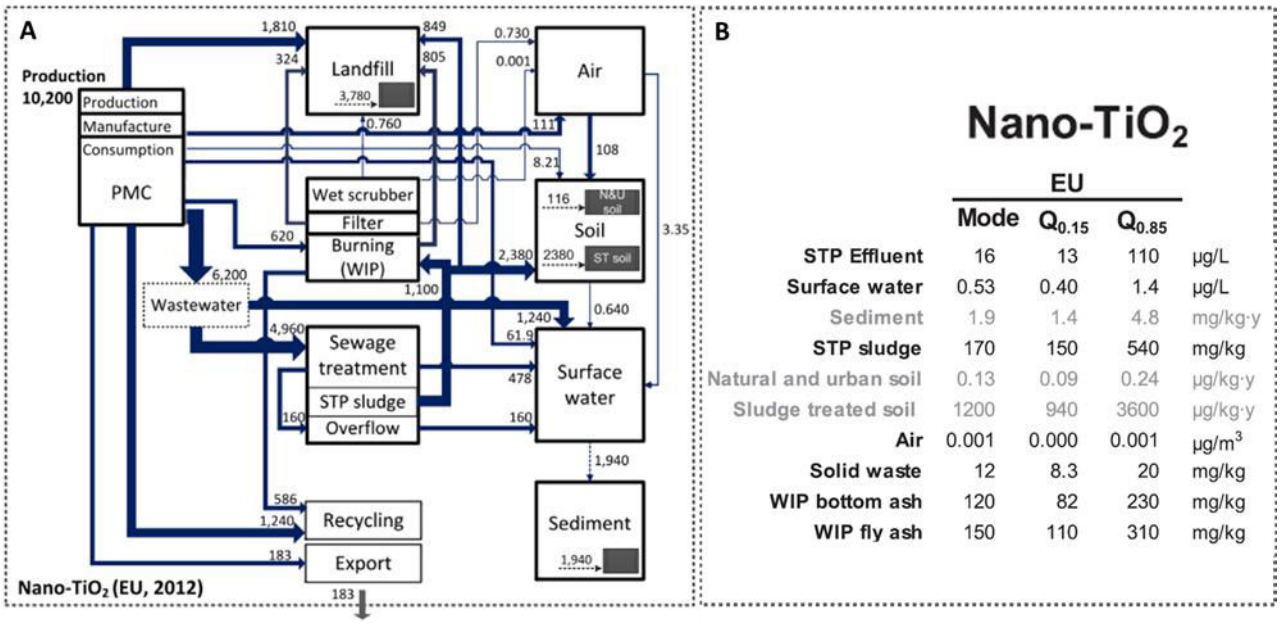


Figure 14 : A : Flux de transport et distribution des $nTiO_2$ en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 10 200 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des n TiO_2 dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014).

I.3.4.4. Transformation et dégradation des $nTiO_2$

Contrairement au nAg, les $nTiO_2$ sont peu solubles dans l'eau et n'entrainent donc pas de réaction de dissolution du titane (Auffan et al., 2010; Shi et al., 2013; Som et al., 2011). Les $nTiO_2$ qui sont classiquement intégrées dans les crèmes solaires comme par exemple les nanoparticules T-Lite SF produites par la société BASF peuvent posséder un enrobage d'hydroxyde d'aluminium ($Al(OH)_3$) évitant leur photo-oxydation, et elles sont souvent fonctionnalisées avec un polymère (polydiméthylsiloxan, PDMS $(C_2H_6OSi)_n$) qui permet leur dispersion dans la lotion. Dans leurs études, Auffan et al. (2010) et Labille et al. (2010) ont montré que la fonctionnalisation de ces nanoparticules pouvaient être altérée, alors que l'enrobage et le noyau de titane restait stable dans leurs conditions d'expérimentation. Les auteurs ont également montré que ces $nTiO_2$ devenaient alors hydrophiles et pouvaient former des agrégats (Auffan et al., 2010). Ainsi altérées, elles sont considérées comme inertes grâce à la stabilité de leur enrobage et peuvent, soit rester stables et bien dispersées dans la colonne d'eau, soit s'agréger et sédimenter (Labille et al., 2010). Plus généralement, des analyses en SEM et spectres EDX ont montré la présence de $nTiO_2$ seules et/ou agrégées, de formes et de tailles différentes, dans des effluents de STEP et des eaux de ruissellement (Kaegi et al., 2008; Kiser et al., 2009). En fonction des conditions

physicochimiques du milieu comme la force ionique et la quantité de matière organique, mais aussi en fonction des concentrations en nanoparticules, les $nTiO_2$ présenteront des taux et vitesses d'agrégation et de sédimentation variables. Les $nTiO_2$ sont par exemple plus stables dans les eaux pluviales et les effluents de STEP possédant une faible force ionique et beaucoup de carbone organique total car elles possèdent une charge négative importante qui réduit leur efficacité d'attachement. A l'inverse, dans les eaux de mer ou de rivière, d'importantes forces ioniques et de faibles quantités de carbone organique total entrainent une rapide agrégation et sédimentation des $nTiO_2$ (Keller et al., 2010).

I.3.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique

Les $nTiO_2$ sont potentiellement biodisponibles pour les organismes. Avec des PEC évaluées de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$ dans les eaux de surface, de nombreux tests de toxicité (CL50) effectués sur les Daphnies ont mesuré des concentrations létales bien plus élevées allant de 4 jusqu'à 500 $mg.L^{-1}$ en fonction des conditions d'expérimentation (Das et al., 2013; García et al., 2011; Kim et al., 2014; Ma et al., 2012). Les $nTiO_2$ sont photoactives, soumises à la lumière, elles peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jovanović, 2015). Ces ROS peuvent causer des dommages oxydatifs, des lésions cellulaires conduisant à la mortalité des organismes. Dans leur étude Mansfield et al. (2015) ont calculé des CL50 6 fois plus faibles en fonction de la luminosité croissante confirmant une toxicité des ROS sur les daphnies. La structure cristalline anatase est par exemple responsable de production de ROS plus importante que la structure rutile (Mansfield et al., 2015; Menard et al., 2011). Les $nTiO_2$ associées aux rayonnements UV peuvent aussi causer des effets létaux et sub-létaux sur les gammares notamment sur leur activité d'alimentation dès 0,2 mg $nTiO_2.L^{-1}$ (Bundschuh et al., 2011). Il existe un large panel d'études montrant des effets des $nTiO_2$, que ce soit sur les microorganismes (Adams et al., 2006; Jomini et al., 2015; Jovanović, 2015; Pagnout et al., 2012), les invertébrés d'eau douce (Bundschuh et al., 2011; Couleau et al., 2012; Ma et al., 2012; Menard et al., 2011; Wiench et al., 2009), les poissons (Griffitt et al., 2009; Ma et al., 2012; Menard et al., 2011) ou encore sur l'homme via par exemple leur absorption par la peau (Crosera et al., 2009). En fonction des $nTiO_2$ étudiées, des conditions d'exposition et des organismes, divers effets ont pu être observés que ce soit au niveau cellulaire comme l'augmentation et la stimulation d'enzymes antioxydantes, une possible activation du système immunitaire (Couleau et al., 2012), ou encore au niveau comportemental et fonctionnel avec des effets sur la reproduction des daphnies ou la consommation des gammares (Bundschuh et al., 2011; Wiench et al., 2009). Cependant la grande majorité de ces études sont menées pour des concentrations de l'ordre du $mg.L^{-1}$ et concernent très rarement des concentrations de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$ rendant les conditions expérimentales peu

environnementalement réalistes. Malgré les limites techniques auxquelles les scientifiques sont confrontés, les études devraient s'efforcer de s'intéresser à plusieurs niveaux d'intégration biologique et pour des concentrations plus réalistes afin de préciser les risques potentiels engendrés par les $nTiO_2$ dans les écosystèmes d'eau douce. Les résultats plus détaillés et propres chaque étude seront décrits et confrontés à nos résultats tout au long du manuscrit.

I.4. Les nanotubes de carbone (NTC)

I.4.1. Marché

Depuis leur découverte en 1991 par Iijima, les nanotubes de carbone (NTC) ont vu leur intérêt et leur développement grandir et évoluer très rapidement (Iijima, 1991). En 2010, leur production a été estimée à plus de 3 000 tonnes dans le monde dont 377 tonnes pour l'Europe en 2012 (Keller et al., 2013; Sun et al., 2014). Ils occupent un marché important dans les secteurs de l'électronique, l'optique, les matériaux composites et l'énergétique (Keller et al., 2013).

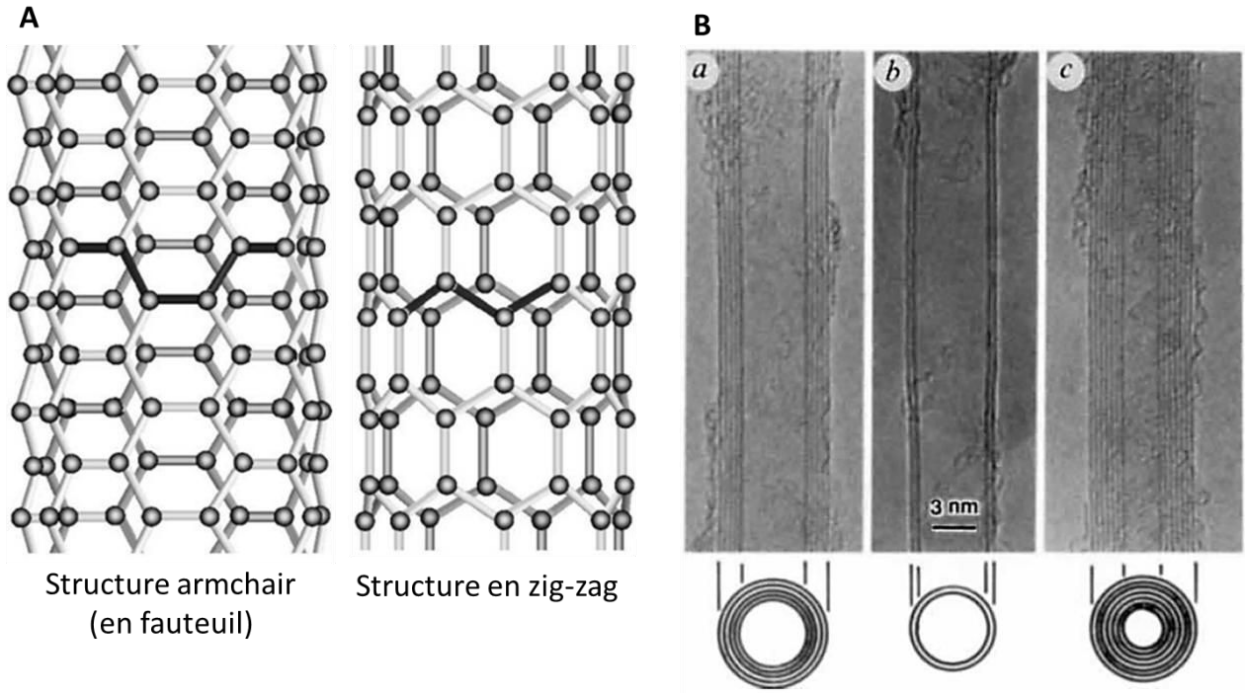
I.4.2. Propriétés et utilisations

Les NTC possèdent de très nombreuses propriétés qui sont largement exploitées dans beaucoup d'applications regroupant divers secteurs d'activité. Les NTC possèdent des propriétés mécaniques impressionnantes alliées à une faible masse faisant de ces nanoparticules des composites de choix pour renforcer la résistance de structures (Coleman et al., 2006) ou encore pour la conduction d'électricité (Baughman et al., 2002). Des propriétés électrochimiques, chimiques et thermiques peuvent aussi permettent leur utilisation dans des électrodes, capteurs, biocapteurs, nanocapteurs, sondes mais aussi dans le stockage d'énergie et d'hydrogène (Baughman et al., 2002; Coleman et al., 2006; Moniruzzaman and Winey, 2006; Riu et al., 2006; Thostenson et al., 2001; Wang, 2005). On peut donc retrouver des NTC dans de nombreux produits comme les écrans de télévision, les vélos, les pneus, les raquettes de tennis, les peintures ou encore les vêtements techniques (Baughman et al., 2002; Mouchet et al., 2011).

I.4.3. Synthèse, forme

Il existe différents protocoles de synthèse des NTC permettant de produire des nanotubes de différentes formes, diamètres, longueurs et de différentes structures, qui sont autant de paramètres influant sur leurs propriétés et donc leurs applications. Ces protocoles, non détaillés dans ce manuscrit, ont été répertoriés dans plusieurs revues bibliographiques (Baughman et al., 2002; Coleman et al., 2006;

Moniruzzaman and Winey, 2006; Thostenson et al., 2001). Les NTC sont, comme leur nom l'indique, des nanotubes, d'une forme cylindrique, d'un diamètre nanométrique (de 1 à 30 nm) et d'une longueur qui se mesure en micromètres (Iijima, 1991; Mouchet et al., 2011). Il existe principalement 2 types de NTC différents par leur structure. Les nanotubes monoparoi (single walled nanotube, SWNT, simple paroi) sont souvent décrits comme étant une feuille de graphite enroulée dans un tube (Figure 15A, Baughman et al., 2002; Iijima, 1991; Moniruzzaman and Winey, 2006; Thostenson et al., 2001). Les NTC multi-parois (multi-walled nanotubes, MWNT, multiple paroi) représentés dans la figure 15B, sont formées de monoparoi empilés les uns sur les autres à la manière des cernes des troncs d'arbres (Baughman et al., 2002; Iijima, 1991). Les nanotubes peuvent exister sous plusieurs structures atomiques, deux d'entre elles : la structure en fauteuil (armchair) et la structure en zig-zag sont schématisées dans la figure 15B.



<u>Figure 15 :</u> A : Illustration des structures en fauteuil (armchair) et en zig-zag des NTC monoparoi (d'après Thostenson et al., 2001) ; B : Photo de microscopie électronique à haute résolution de NTC multiparois comportant 5, 2 et 7 feuillets pour les photo a, b et c respectivement (d'après Iijima, 1991).

I.4.4. Cycle de vie des NTC : de la production en usine aux rejets dans les cours d'eau

Les NTC sont généralement incorporés dans des produits comme composite de soutien et de structure dont l'utilisation entraine potentiellement peu de rejets directs dans l'environnement. La modélisation du flux de transport des NTC représenté dans la figure 16A montre que sur un total de

production de 377 tonnes en Europe, 50% sont entreposés dans des décharges, 22% sont incinérés, 20% sont recyclés, 5% sont exportés et seulement 0,5% sont rejetés via le réseau des eaux usées (Sun et al., 2014). De très faibles quantités de NTC sont donc susceptibles de rejoindre les stations d'épuration contrairement aux autres nanoparticules (Keller et al., 2013). En effet, les NTC incorporés dans les produits sont plutôt majoritairement entreposés dans des décharges. De par leurs rejets directs et passages restreints dans les STEP, des modélisations ont quand même suggéré des PEC pour les eaux de surface inférieures au ng.L^{-1} pour l'année 2012 en Europe (Figure 16B). Les NTC se dispersent difficilement dans l'eau, mais leur fonctionnalisation potentielle ou leur enrobage naturel par la matière organique présente dans l'eau peut favoriser cette dispersion (Jackson et al., 2013). Comme pour les autres types de nanoparticules, leur comportement dans le milieu dépend essentiellement de leur forme, longueur, diamètre mais aussi des conditions environnementales.

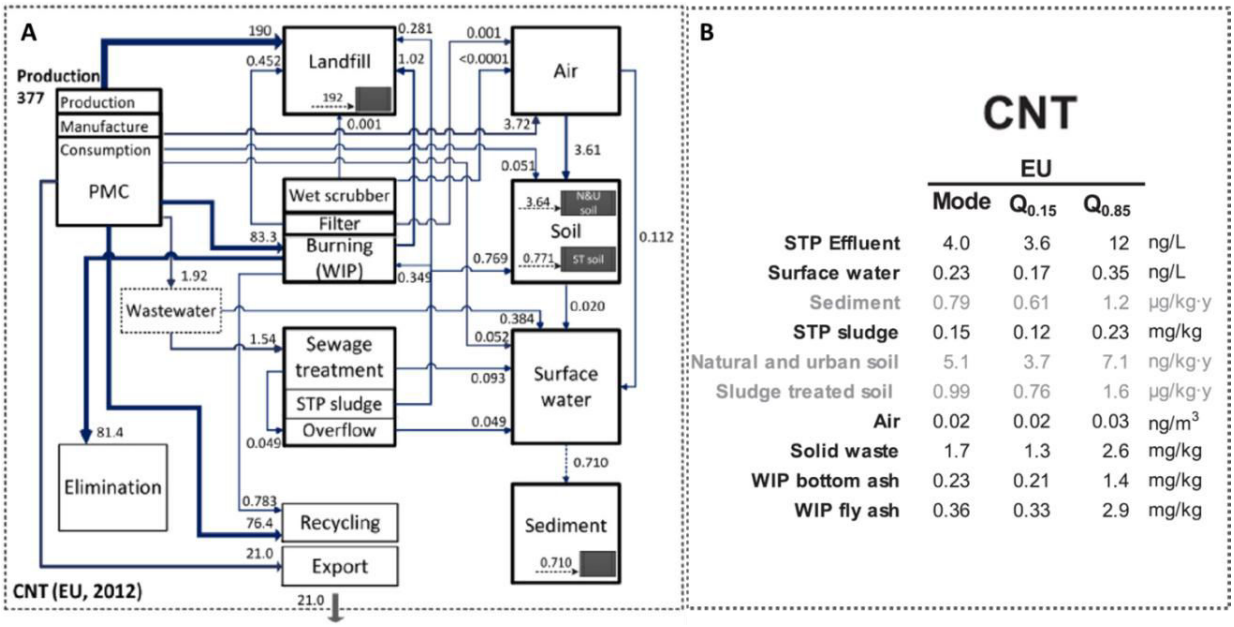


Figure 16 : A : Flux de transport et distribution des NTC en Europe pour l'année 2012 à partir d'une production de 377 tonnes ; B : Concentrations prédictibles des NTC dans différents compartiments techniques et environnementaux. La valeur « Mode » correspond à la valeur la plus fréquente alors que les valeurs Q0.15 et Q0.85 correspondent aux percentiles les plus faibles et les plus élevés. Les valeurs en noir désignent des concentrations alors que les valeurs en gris désignent les augmentations annuelles des concentrations. Adapté de Sun et al. (2014).

I.4.5. Effets sur les organismes du milieu aquatique

Malgré une utilisation accrue des NTC et des rejets dans les écosystèmes aquatiques qui pourraient s'accentuer dans les années à venir, les études sur les effets potentiels dans les cours d'eau sont encore peu nombreuses. Elles se sont dans un premier temps surtout focalisées sur la santé humaine, laissant

l'écotoxicologie en second plan (Mouchet et al., 2009). Cependant des études sur les invertébrés (Galloway et al., 2010; Ki T. Kim et al., 2010; Mwangi et al., 2012; Petersen et al., 2009), les poissons (Fraser et al., 2011; Klaper et al., 2010; Smith et al., 2007) et les amphibiens (Bourdiol et al., 2013; Mouchet et al., 2011, 2010, 2008, 2007) ont déjà été recensées. Cependant, il est difficile de clairement définir la toxicité de ces NTC puisque les expérimentations portent sur différents types de NTC possédant des caractéristiques et des protocoles de dispersion très variés (Jackson et al., 2013). De plus, généralement, les concentrations et les comportements des NTC au cours des expériences ne sont pas présentés. Une toxicité dans les écosystèmes aquatiques est potentielle, et, serait plus importante pour les NTC monoparoi ou double parois que pour les multiparois (Jackson et al., 2013; Mouchet et al., 2010). En effet suite à plusieurs études, Mouchet et al. (2010) ont émis l'hypothèse que les double parois pourraient entrainer des obstructions branchiales et intestinales alors que les multiparois, non observées dans les branchies des larves d'amphibien *X. laevis* pourraient seulement avoir des effets sur le tractus digestif les rendant moins toxiques. L'ingestion et la présence de NTC dans le tractus digestif des organismes a effectivement plusieurs fois été rapportée dans la littérature (Jackson et al., 2013; Mouchet et al., 2010, 2008; Mwangi et al., 2012; Petersen et al., 2009). Les invertébrés semblent y être plus sensibles que les vertébrés même si le passage des NTC le long des barrières biologiques n'a pas encore été observé. Les NTC pourraient également présenter une plus forte toxicité quand leur surface hydrophobe est enrobée, favorisant ainsi leur stabilité dans la colonne d'eau. En effet Mouchet et al. (2011) ont observé la présence d'effets génotoxiques dans les érythrocytes des larves de xénope exposées à 1 $mg.L^{-1}$ de DWNT seulement lorsque ces dernières étaient en présence de gomme arabique. Enfin, les NTC pourraient servir de vecteur et permettre le transport d'autre contaminant, comme par exemple le cuivre, entrainant une toxicité supérieure chez les daphnies (Kim et al., 2010). La plupart de ces conclusions sont en accord avec les synthèses bibliographiques de Petersen et al. (2011) et Mouchet et al. (2008) et les auteurs concluent sur de potentiels effets et risques à des concentrations de l'ordre du $mg.L^{-1}$, une concentration qui est bien au-dessus des concentrations prédictibles.

II. Organisme modèle : le gammare

II.1. Généralités

II.1.1. Systématique

Les gammares sont de petits Crustacés appartenant à l'ordre des Amphipodes. Sur les 6000 à 9000 espèces d'Amphipodes, 80% sont classées comme appartenant au Sous-Ordre des Gammaridea qui sont largement répandus dans les écosystèmes marins, d'eau douce ou terrestres (Gledhill et al., 1993; Kunz et al., 2010; Väinölä et al., 2008). Sur les 304 espèces qui composent la famille des Gammaridae (Väinölä et al., 2008), plus de 100 espèces épigées d'eau douce distribuées dans tout l'hémisphère Nord appartiennent au genre *Gammarus* (Karaman and Pinkster, 1977a; Kunz et al., 2010). On compte parmi elles notamment les 3 espèces : *Gammarus fossarum* (Koch, 1835), *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) et *Gammarus roeseli* (Gervais, 1835).

II.1.2. Morphologie

Morphologiquement, les gammares ressemblent à de petites crevettes (Figure 17) ne dépassant pas, sous les latitudes tempérées, les 20 mm (Tachet et al., 2000). Ils ne peuvent cependant pas être considérés comme tels puisqu'ils ne possèdent pas de carapace céphalo-thoracique, mais sont plutôt recouverts par un exosquelette calcifié composé de chitine couramment dénommé : cuticule. C'est cette dernière, qui, contenant des dépôts de caroténoïdes, donne cette couleur orangée aux gammares (Czeczuga, 1975; Gledhill et al., 1993).

La présence d'un corps comprimé latéralement, d'yeux sessiles, d'antennes de tailles homogène ou encore de gnathopodes ovalaires, permet de classer ces gammares dans l'ordre des Amphipodes (Grassé et al., 1961). Un autre caractère distinctif est notamment la présence chez la femelle de dépendances fixées sur les appendices thoraciques et nommées oostégites. Ils forment une chambre incubatrice permettant d'abriter les œufs. Ces femelles sont de plus, beaucoup plus petites que les mâles (Felten, 2003; Tachet et al., 2000).

Le corps des gammares est métamérisé et s'organise en 4 parties (Figure 17) :

Le prosome est la région céphalique composée d'une seule pièce issue d'une fusion de métamères (Felten, 2003). La tête porte un rostre de taille variable, 2 yeux sessiles ainsi que 2 paires d'antennes, supérieures et inférieures servant d'organes sensoriels. Des pièces buccales (4 paires d'appendices :

lèvres, mandibules, maxilles et maxillipèdes) permettent la prise de nourriture et la mastication (Chevreux and Fage, 1925; Felten, 2003).

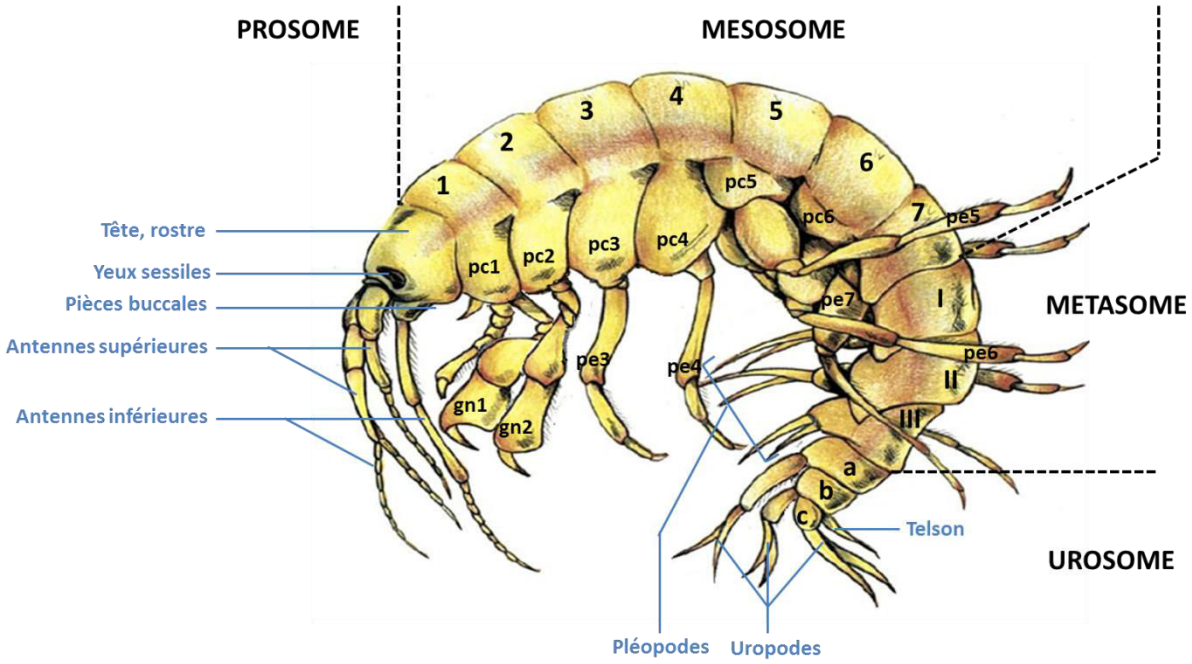


Figure 17 : *Vue latérale d'un Gammarus. Les numérotations de 1 à 7 ; I à III et a à b correspondent respectivement aux métamères du mésosome, métasome et urosome. pc, plaque coxale ; gn, gnathopode ; pe, péréiopode. Dessin modifié de C. Goergel et E. Walter (association CINCLE).*

Le mésosome se compose de 7 métamères portant chacun une paire de lames : les plaques coxales ainsi qu'une paire d'appendices articulés uniramés: les péréiopodes (Chevreux and Fage, 1925). Les péréiopodes correspondant aux segments 1 et 2 du mésosome sont spécifiques car ils sont destinés à la préhension et se nomment les gnathopodes (Chevreux and Fage, 1925). Ces derniers, tous comme les péréiopodes 3 à 4, sont orientés vers l'avant de l'organisme et permettent aussi l'activité de locomotion. C'est également le rôle des péréiopodes 5 à 7 qui sont quant à eux dirigés vers l'arrière du gammare (Felten, 2003; Grassé et al., 1961).

Le métasome possède 3 métamères généralement bien développés, portant chacun une paire d'appendices : les pléopodes. Outre leur rôle dans la locomotion, ces pléopodes ont surtout une fonction importante de ventilation. En effet, en perpétuels mouvements synchrones, ils favorisent la circulation et le renouvellement constant de l'eau autour des branchies fixées aux plaques coxales sous les péréiopodes (Chevreux and Fage, 1925; Grassé et al., 1961).

L'urosome possède quant à lui 3 segments portant chacun une paire d'uropodes biramés. Cet urosome constitue un battant natatoire qui permet au gammare de se déplacer en mouvements saccadés (Grassé et al., 1961). L'urosome se termine par un petit appendice : le telson.

II.1.3. Ecologie- Habitat

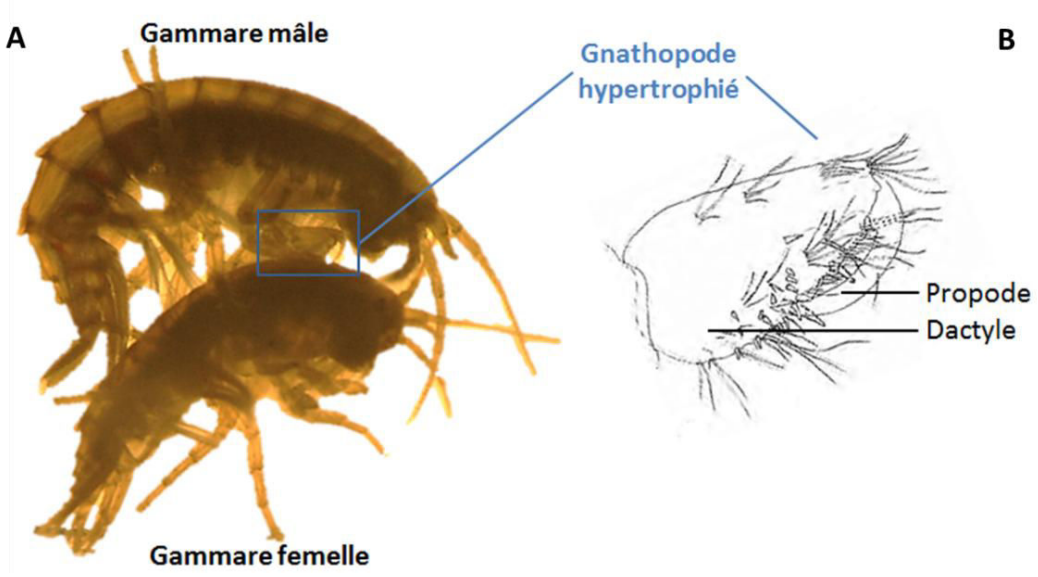
Le genre *Gammarus* sp. est largement répandu dans la région Paléarctique (Grabowski et al., 2007; Karaman and Pinkster, 1977a). Ces organismes peuvent occuper des eaux marines ou des eaux douces ainsi que des systèmes lotiques ou lentiques. Largement présents dans les écosystèmes d'eau douce, ils peuvent s'adapter à des conditions variées et rapidement dominer la faune des macroinvertébrés benthiques du milieu, que ce soit en termes de densité ou de biomasse (MacNeil et al., 1997). Cependant, ils peuvent aussi être géographiquement contraints par des facteurs abiotiques tels que la température, la luminosité, la dureté, l'oxygène, le pH, les concentrations en calcium, le courant ou encore la pollution du milieu (Duran, 2007; Peeters and Gardeniers, 1998). Colonisant tous les types d'habitats, ils préfèrent néanmoins les zones ombragées composées de substrats grossiers comme les galets et les graviers, ainsi que les zones possédant des substrats organiques comme des végétaux qui leur servent de nourriture et d'abri contre les prédateurs. Leurs préférences écologiques varient sensiblement en fonction des espèces (Peeters and Gardeniers, 1998).

II.1.4. Plasticité alimentaire

Traditionnellement considérés comme des herbivores ou des détritivores déchiqueteurs (Dangles and Guérold, 2001; Kelly et al., 2002b), les gammares sont en fait pourvus d'une grande plasticité alimentaire qui a notamment permis leur succès dans la colonisation de divers habitats (MacNeil et al., 1997). Certaines espèces de gammares ont une préférence pour les litières de feuilles qui, colonisées par des micro-organismes, deviennent plus appétentes (Gessner and Chauvet, 1994). C'est le cas par exemple des feuilles d'aulne ou d'érable colonisées par des champignons hyphomycètes aquatiques (Danger et al., 2013; Maltby, 1994). D'autres espèces peuvent présenter un comportement de prédation voire de cannibalisme (Dick, 1995; Kelly et al., 2002b; MacNeil et al., 1997). Kelly et al. (2002a) ont par exemple étudié l'activité de prédation des gammares sur des nymphes d'éphémères (*B. rhodani*). Finalement, les gammares peuvent être considérés comme herbivores et carnivores mais également comme prédateurs et proies (MacNeil et al., 1999, 1997).

II.1.5. Reproduction

Chez les gammares, la reproduction est sexuée, externe, ovovivipare et suit un cycle complexe. Alors que les femelles ne peuvent se reproduire qu'après une période de mue, les mâles quant à eux, peuvent le faire à n'importe quel moment de l'année. L'activité de reproduction est cependant réduite d'octobre à décembre, et connait un pic important dépendant de la température durant le printemps et en début d'été (Gledhill et al., 1993; Pöckl et al., 2003). Quand les femelles sont sexuellement matures, elles libèrent des phéromones qui sont détectées par les chémorécepteurs des mâles situés au niveau de leurs antennes (Sutcliffe, 2010). Ces derniers choisissent alors des femelles qui apparaissent comme étant les plus aptes à produire une grande quantité d'œufs (Kunz et al., 2010). Les mâles vont de ce fait s'accrocher aux femelles à l'aide de leur première paire de gnathopodes et vont former une figure nommée amplexus copulatoire (Figure 18A ; Borowsky, 1984; Chevreux and Fage, 1925; Conlan, 1991). Les gnathopodes sont, pour cela, plus développés chez les mâles, ce qui constitue un bon critère de différentiation sexuelle (Figure 18B). Les gammares sont dits en précopulat et peuvent y rester pendant plusieurs semaines. Le mâle se situe donc au-dessus, il est en moyenne de 1,3 à 1,5 fois plus grand que sa femelle et il assure tous les mouvements pour deux (Gledhill et al., 1993). La fertilisation est externe et elle s'effectue juste après la mue de la femelle.



<u>Figure 18 :</u> A : Vue latérale d'un gammare mâle et d'un gammare femelle appartenant à l'espèce G. roeseli en précopulat. Source : J. Andreï ; B : Dessin du Propode et du Dactyle hypertrophié d'un gammare mâle d'après Chevreux and Fage, (1925).

Le mâle abandonne ensuite sa femelle et les œufs se développeront et écloront en 3 semaines environ dans une poche incubatrice, le marsupium (Figure 19A, B). Les juvéniles y resteront jusqu'à la prochaine mue de la femelle, moment à partir duquel ils nageront alors à l'extérieur (Figure 19C).

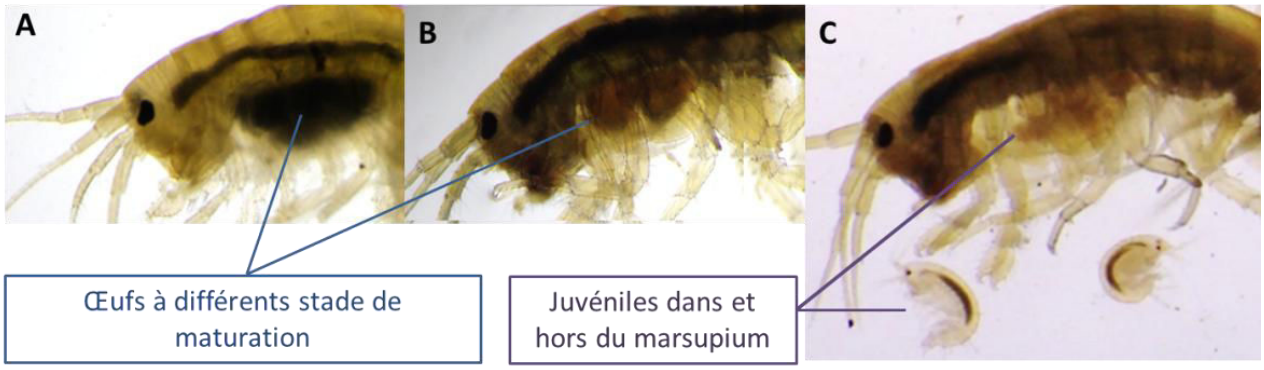


Figure 19 : Vues latérales de gammares femelles appartenant à l'espèce G. pulex portant des œufs à différents stades de maturation (A, B) puis au stade ultime où les juvéniles nagent hors du marsupium (C). Source : J. Andreï.

II.1.6. Croissance, cycle de vie

A leur sortie du marsupium, les juvéniles se nourrissent dans un premier temps des fèces des gammares adultes (Kunz et al., 2010; McCahon and Pascoe, 1988). C'est au bout de 3 à 4 mois, soit après 9 à 10 mues, que les gammares atteignent leur maturité sexuelle (Pöckl, 1992). La croissance est en effet discontinue et s'effectue par des périodes de mues et d'intermues qui se succèdent pendant toute la vie du gammare, soit environ 2 ans. Ce cycle de vie est sensiblement le même pour les différentes espèces appartenant au genre *Gammarus*, mais il peut parfois connaître des variations en fonction des facteurs abiotiques comme par exemple, la température de l'eau. Pöckl (1992) a ainsi observé que pour une température inférieure à 12°C, la croissance et la maturation étaient plus rapides chez *G. pulex* et *G. fossarum* que chez *G. roeseli*.

II.1.7. Physiologie, respiration

Le gammare a une respiration branchiale et possède 6 paires de branchies qui sont des expansions latérales des pattes thoraciques (Felten, 2003; Sutcliffe, 1984). Les 3 paires de pléopodes se situant au niveau du métasome sont en perpétuel mouvement, ce qui favorise un renouvellement constant et un flot turbulent d'eau sur la surface des branchies. Cette activité de ventilation réduit alors l'épaisseur d'eau au contact des branchies et améliore la diffusion de l'oxygène (Sutcliffe, 1984). En effet, cette diffusion d'oxygène présent dans l'eau au travers des branchies répond à 3 grandes règles (Figure 20) : 1)

le taux de diffusion est proportionnel à l'aire de surface de la branchie ; 2) le taux de diffusion est proportionnel à l'épaisseur de la branchie mais surtout à l'épaisseur de la couche d'eau au contact de cette branchie ; 3) le taux de diffusion est avant tout largement dépendant d'une différence de pressions partielles en oxygène entre l'eau et le gammare (Sutcliffe, 1984).

Après avoir traversé les branchies, l'oxygène est fixé par un pigment respiratoire, l'hémocyanine, qui facilite le transport d'oxygène dans l'hémolymphe et vers les organes. En effet, chez les gammares l'appareil circulatoire est ouvert, les tissus et organes baignent dans le liquide extracellulaire hémolymphatique.

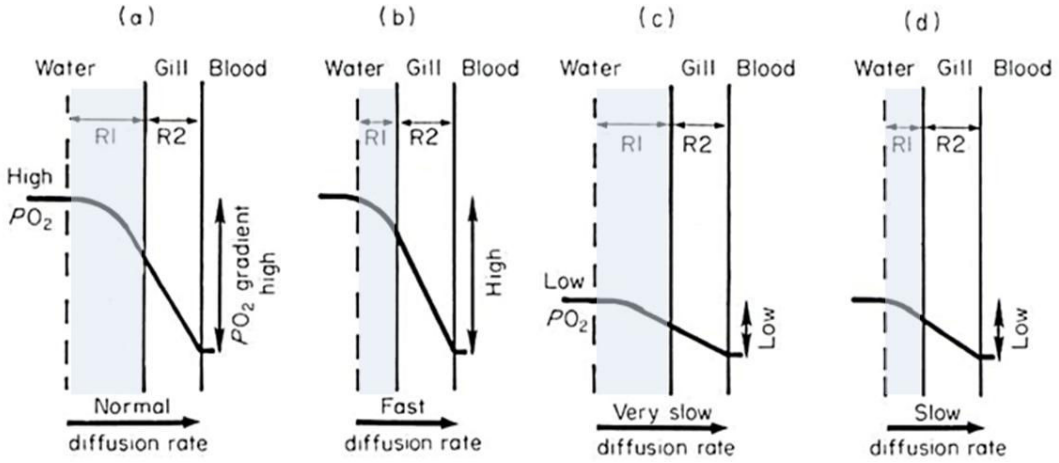


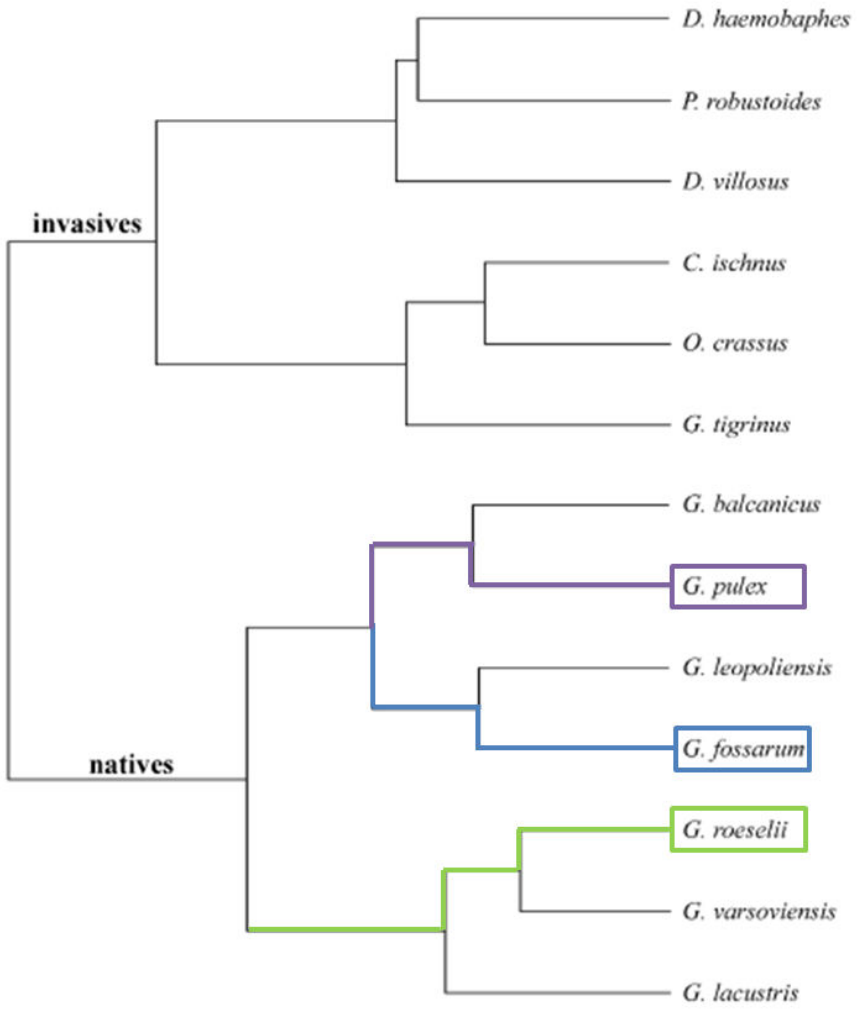
Figure 20 : Diagrammes montrant l'importance de l'épaisseur de la couche d'eau (R1) au contact de la branchie (R2) ainsi que l'importance du gradient de pression partielle en oxygène (PO_2 gradient) sur le taux de diffusion d'oxygène de l'eau vers le gammare. Adapté de Sutcliffe, (1984).

L'hémolymphe est notamment composée d'ions chlorure et sodium qui contribuent majoritairement à la pression osmotique. Chez les gammares, l'osmolarité de l'hémolymphe se situe généralement aux alentours de 300 mOsmol (Arce Funck, 2014; V. Felten et al., 2008a; Issartel et al., 2010; Vellinger et al., 2013). Dans leur habitat naturel, les gammares ont comme tous les organismes animaux aquatiques la capacité de réguler la composition et la pression osmotique (Felten, 2003; Lignot et al., 2000) du milieu intérieur (=hémolymphe chez les invertébrés).

II.2. Espèces

Parmi les nombreuses espèces appartenant au genre *Gammarus*, 3 sont largement présentes en Lorraine : *G. fossarum*, *G. pulex* et *G. roeseli*. Cette dernière, originaire des Balkans (Karaman and

Pinkster, 1977b), a longtemps été qualifiée d'espèce invasive mais est désormais considérée comme une espèce native naturalisée (Gismondi, 2012; Grabowski et al., 2007). Dans leur étude, Grabowski et al. (2007) ont couplé les réponses de 8 paramètres, 6 se rapportant à des traits d'histoire de vie, et 2 à des traits écologiques. En se basant sur des données bibliographiques, les auteurs ont classé les différentes espèces les unes par rapport aux autres dans un diagramme représenté en figure 21.



<u>Figure 21 :</u> Diagramme regroupant les distances entre 13 espèces de gammares en se basant sur 8 paramètres : 1) taille moyenne des femelles reproductrices ; 2) nombre d'œufs dans le marsupium ; 3) indice de fécondité (nombre d'œufs/taille de la femelle) ; 4) durée de la période de reproduction ; 5) âge de maturité ; 6) nombre de générations par an ; 7) tolérance à la salinité ; 8) tolérance à l'impact de l'homme. D'après (Grabowski et al., 2007).

II.2.1. Identification

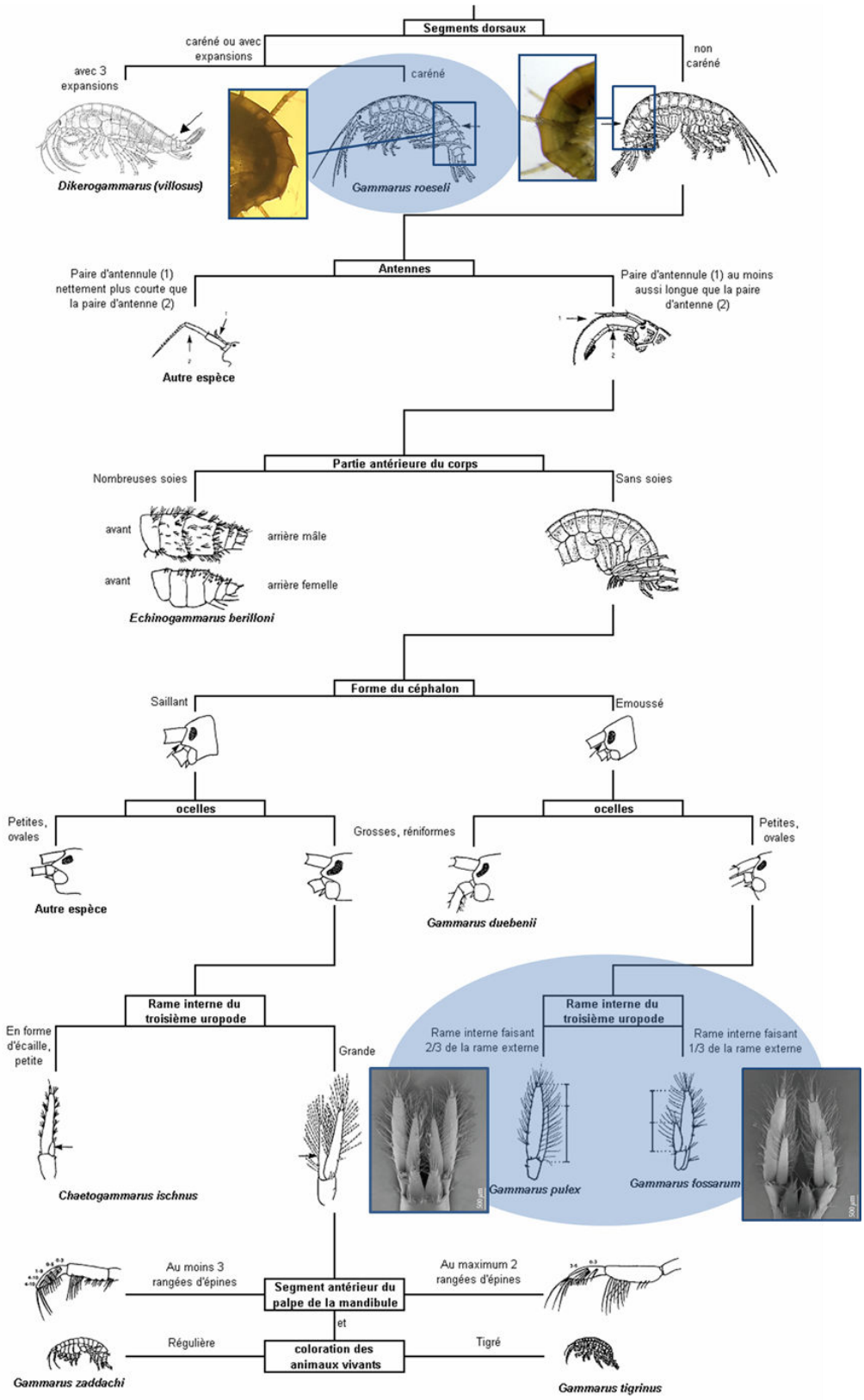
Si parmi les 3 espèces, l'identification de *Gammarus roeseli* est assez aisée de par la présence de carènes dorsales rapidement identifiables, les espèces *G. fossarum et G. pulex* ne peuvent pas être différenciées par un rapide coup d'œil (Figure 22). La clé de détermination adaptée par Felten (2003) permet l'identification de ces 2 espèces. Cette identification se base sur la rame interne du troisième uropode. Pour l'espèce *G. pulex*, la taille de cette rame interne correspond au 2/3 de la taille de la rame externe alors que pour *G. fossarum* elle correspond seulement à 1/3 de la rame externe.

II.2 .2. Exigences environnementales

Bien que plusieurs espèces de gammares puissent coexister dans un même type d'habitat, leurs diverses exigences environnementales gouvernent leur distribution dans les habitats d'eau douce (Pöckl et al., 2003; Toman and Dall, 1998). Par exemple, l'espèce *G. fossarum* qui préfère les eaux fraîches, bien oxygénées et qui supporte peu les milieux pollués, sera distribuée dans de petites rivières de têtes de bassins versants souvent situées en zone montagneuse et possédant un fort courant (Grabowski et al., 2007; Karaman and Pinkster, 1977a; Pöckl et al., 2003; Toman and Dall, 1998). Au contraire, l'espèce *G. roeseli,* plus tolérante aux pollutions, aux températures élevées et aux baisses d'oxygène dans le milieu, sera plutôt présente dans les larges rivières à faible courant (Grabowski et al., 2007; Pöckl et al., 2003; Toman and Dall, 1998). La troisième espèce, *G. pulex* présente des exigences environnementales intermédiaires aux deux précédentes.

II.2.3. Les espèces invasives

Certaines espèces de gammares sont qualifiées d'invasives. Elles possèdent généralement une bonne tolérance à une large gamme de conditions environnementales qui leur permet de survivre dans de nouvelles conditions suite par exemple à un transport par bateau via des eaux de ballast (Ricciardi and Rasmussen, 1998). La discrimination entre une espèce invasive et native est délicate et doit reposer sur une combinaison de diverses caractéristiques biologiques et écologiques. Si ce sont les traits écologiques et notamment leur forte tolérance environnementale qui permettent la survie des espèces dans un nouveau type d'habitat, les traits biologiques comme par exemple la reproduction favorisent par la suite leur large propagation (Devin and Beisel, 2006). Les espèces *G. pulex* et *G. roeseli* ont un temps été considérées comme d'anciennes espèces invasives de par leur origine (Devin and Beisel, 2006). Etablies en France depuis plusieurs dizaines d'années, elles sont maintenant considérées comme natives naturalisées (Felten et al., 2008; Grabowski et al., 2007; Wijnhoven et al., 2003).



<u>Figure 22 :</u> Détermination de G. fossarum, G. pulex et G. roeseli adaptée d'après (Felten, 2003; Mayer et al., 2012).

II.3. Place, rôle dans les écosystèmes d'eau douce

II.3.1. Place dans le réseau trophique

Les gammares sont omniprésents dans les écosystèmes d'eau douce tout au long de l'année. Les 3 espèces de *Gammarus* sont omnivores et consomment un large spectre de ressources trophiques (végétaux vivants, algues, matériel détritique, animaux). Elles sont également les proies de différentes espèces d'invertébrés et de vertébrés prédateurs. Ils peuvent représenter par ailleurs la partie dominante des macroinvertébrés benthiques des rivières en terme de densité d'organismes et de biomasse (MacNeil et al., 1997). Véritable réserve de nourriture pour de nombreuses espèces de poissons, ils sont également largement consommés par des amphibiens tels que les grenouilles ou salamandres mais également par d'autres macroinvertébrés comme les coléoptères (Baudin and Garnier-Laplace, 1994; MacNeil et al., 1999). Fait plus étonnant, ils servent également de ressource alimentaire à certaines espèces d'oiseaux. En effet, les gammares parasités peuvent présenter des comportements modifiés quand les parasites développent une stratégie de prise de contrôle de leurs hôtes primaires. Les gammares sont alors attirés par la lumière, nagent plus en surface et sont ainsi plus consommés par des oiseaux, hôtes définitifs des trématodes (Beisel and Médoc, 2010; MacNeil et al., 1999).

Les gammares sont également eux-mêmes des prédateurs actifs des cours d'eau. Dans leur étude, Kelly et al. (2002a) ont mis en évidence l'activité de prédation de *G. pulex* sur des nymphes de l'espèce d'éphémère *Baetis rhodani.* Mais, c'est par leur activité de fragmentation des litières de feuilles et de la matière organique détritique, que les gammares occupent une place clé dans le réseau trophique et dans le fonctionnement des écosystèmes d'eau douce (Dangles and Guérold, 2001; Kelly et al., 2002b; MacNeil et al., 1999, 1997; Wallace and Webster, 1996).

II.3.2. Rôle fonctionnel

De par leurs habitudes alimentaires de déchiqueteurs, les gammares jouent un rôle clé dans la fragmentation et la transformation de la matière organique allochtone dans les écosystèmes de tête de bassin versant. Ainsi, les apports de litières provenant de la ripisylve servent de ressources nutritives aux macroinvertébrés déchiqueteurs tels que les gammares et représentent alors une source importante d'entrée d'énergie dans le milieu (Anderson and Sedell, 1979; Wallace and Webster, 1996). L'activité de déchiquetage par ces macroinvertebrés permet la conversion des particules organiques grossières en fines particules d'une taille intermédiaire entre 0,45 µm et 1 mm : les FPOM (Fine Particulate Organic

Matter ; Anderson and Sedell, 1979; Dangles and Guérold, 2001; Navel et al., 2011; Wallace and Webster, 1996). Les FPOM produites par les gammares correspondent principalement aux fèces et aux pseudo-fèces. Transportées le long du cours d'eau ou déposées sur les substrats, elles servent alors de source de nourriture à de nombreuses espèces de collecteurs actifs et passifs, permettant ainsi l'incorporation du carbone (allochtone) dans le réseau trophique (Cushing et al., 1993; Wallace and Webster, 1996).

II.3.3. Importance des FPOM dans le cycle de la matière organique

Les approches fonctionnelles et notamment les relations entre les organismes benthiques et la dynamique de la matière organique dans les rivières, ont fait l'objet d'une abondante littérature (Dangles and Guérold, 2001; Navel et al., 2011; Van Dokkum et al., 2002; Wallace and Webster, 1996). Il a été montré que les FPOM produites notamment par les gammares pouvaient être transportées sur plusieurs kilomètres de distance dans les cours d'eau en alternant des phases de dépôt/rétention dans le sédiment et des phases de remise en suspension dans la colonne d'eau (Cushing et al., 1993). Ce déplacement de matière organique le long d'un cours d'eau à flux unidirectionnel a une influence directe sur l'activité de consommation d'autres organismes : les organismes collecteurs. Dans leur étude, Navel et al. (2011) ont par exemple montré l'influence de *G. roeseli* sur le taux d'assimilation du collecteur *Niphargus rhenorhodanensis* qui se nourrit principalement des FPOM produites par le gammare déchiqueteur. Ils concluent alors sur l'existence d'une interaction positive entre les organismes déchiqueteurs et collecteurs. D'autres études ont mis en évidence qu'une diminution en grand nombre de la communauté des déchiqueteurs benthiques présents dans les cours d'eau engendrerait des baisses significatives de la production et de l'export des FPOM (Wallace et al., 1982; Wallace and Webster, 1996). Même si des FPOM peuvent aussi être produites par abrasion physique ou par l'activité des micro-organismes (Anderson and Sedell, 1979), une dimution drastique de leur production par l'activité de déchiquetage par les macroinvertébrés benthiques aurait d'importantes conséquences sur les organismes qui en dépendent.

Les macroinvertébrés déchiqueteurs et donc les gammares, ont une influence importante et essentielle sur le cycle des nutriments et de la matière organique dans les écosystèmes d'eau douce. Ils occupent une place clé dans son fonctionnement et participent à son bon équilibre. Une importante perte de biomase et/ou d'activité de ces organismes pourrait avoir de graves conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème.

II.4. Le gammare en écotoxicologie

Les crustacés et plus particulièrement les gammares font partie des organismes couramment étudiés en écotoxicologie aquatique. Ils peuvent par exemple, aisément être étudiés dans des manipulations *in situ* dans des cages, ou dans des expérimentations en conditions de laboratoire. De nombreuses études ont mesuré ou mis en évidence une bioaccumulation ou une concentration de contaminant au sein de ces organismes après un relargage dans le milieu d'exposition. Les quantités de contaminant mesurées dans les gammares sont le plus souvent proportionnelles et dépendantes des quantités de contaminant introduites dans le milieu ce qui en fait de bon biomoniteurs (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b; Güven et al., 1999; Lebrun et al., 2012; Vellinger et al., 2012). De nombreuses études ont aussi montré la sensibilité des gammares à différents types de polluants organiques ou inorganiques selon différents scénarios d'exposition : *in situ*, *ex situ*, exposition par pulse dans l'eau ou via le sédiment (Kunz et al., 2010). Ces travaux se basent souvent sur des tests de toxicité normalisés CL50 (concentrations létales pour 50% de la population, Arce Funck et al., 2013; Ozgul Ozalp et al., 2011; Pantani et al., 1997; Taylor et al., 1991; Vellinger et al., 2012), mais aussi sur des mesures de différents types de biomarqueurs qui seront énumérés dans la section III.2. de ce chapitre (Borlakoglu and Kickuth, 1990; Garaud et al., 2015; Horion et al., 2015; Sroda and Cossu-Leguille, 2011).

Dans sa revue bibliographique très complète sur l'étude des gammares dans les tests d'écotoxicologie aquatique, Kunz et al. (2010) affirment qu'avec la quantité d'études d'écotoxicologie publiées, et le recul que la communauté scientifique possède sur ces organismes, les gammares sont de bons candidats pour des études plus intégratives couplant plusieurs niveaux d'intégrations. Ils proposent alors que les futures recherches adoptent une approche plus complète en étudiant par exemple les effets multigénérationnels de polluants, le développement de nouveaux biomarqueurs et ils proposent également de favoriser au maximum les liens entre des aspects biochimiques, physiologiques, comportementaux et fonctionnels (Lagadic et al., 1994).

III. Outils pour l'évaluation des risques : vers une approche plus environnementalement réaliste

L'évaluation des risques pour l'environnement implique notamment la compréhension de l'exposition et des effets des contaminants, leur interaction avec les organismes, et également leur conséquences sur les populations et les écosystèmes. Les études en écotoxicologie disposent de plusieurs outils qui permettent d'adopter des approches plus environnementalement réalistes.

III.1. Complexification des systèmes expérimentaux

III.1.1. Définition des microcosmes et des mésocosmes

Les tests d'écotoxicité peuvent s'effectuer à différents niveaux de complexité : du test « simple » de toxicité en laboratoire aux tests plus complexes en extérieur voire en milieux naturels. La distinction entre des systèmes expérimentaux qualifiés de microcosmes et mésocosmes se base classiquement sur une notion de taille et de complexité physico-chimique et/ou biologique (Lähteenmäki et al., 2015; Teuben and Verhoef, 1992). Généralement, en écotoxicologie, de nombreuses expériences réalisées en laboratoire concernent une espèce placée dans des conditions contrôlées. Ces études relèvent typiquement d'une approche en microcosme. Une réplicabilité importante des dispositifs expérimentaux est associée à ce type de test.

Pour les études en mésocosmes, en termes de complexité, elles se situent entre les expérimentations en laboratoire et l'écosystème naturel (Bour et al., 2015). Souvent plus lourdes à élaborer, elles demandent un travail préparatoire plus important. Les dispositifs expérimentaux doivent être assez grands pour fonctionner sur une longue durée pouvant aller de quelques semaines à plusieurs mois. Il n'existe pas de taille « réglementaire » définissant un dispositif comme étant un mésocosme, puisque la taille idéale est entièrement dépendante de l'étude ainsi que des objectifs considérés. Des mésocosmes peuvent par exemple, recréer des conditions de sol (Colman et al., 2013; Gohil et al., 2014; Teuben and Verhoef, 1992), de rivières (Böttger et al., 2013; Kulacki et al., 2012; Roussel et al., 2008), d'estuaires (Cleveland et al., 2012) ou encore d'écosystèmes marins (Buffet et al., 2014, 2013).

Classiquement, les microcosmes et mésocosmes peuvent être classés en 3 catégories : 1) fermés, sans contact avec l'extérieur, 2) semi-ouverts, soumis à certains paramètres naturels ou 3) ouverts et directement disposés à l'extérieur (Teuben and Verhoef, 1992). Dans la littérature, la majorité des

études dites en mésocosmes a utilisé des dispositifs ouverts et soumis aux conditions de température et d'humidité naturelles (Buffet et al., 2014; Colman et al., 2013; Lähteenmäki et al., 2015; Lowry et al., 2012a; Roussel et al., 2008). Cependant, d'autres études également réalisées en mésocosmes ont été effectuées sous serre (Cleveland et al., 2012; Gohil et al., 2014) ou en laboratoire (Kulacki et al., 2012; Tella et al., 2014).

Dans leur revue bibliographique, Bour et al. (2015) ont notamment discuté de ces différentes notions de microcosmes et mésocosmes présentes dans la littérature. Sans pour autant vouloir définir une nomenclature qui catégoriserait les différents types de systèmes expérimentaux, et en gardant à l'esprit qu'il apparait difficile de définir une limite franche entre un système simple et un système complexe, ils suggèrent alors qu'une distinction pourrait se baser sur la localisation des dispositifs. Ceux disposés en extérieur et donc soumis aux conditions climatiques sont plus représentatifs de la complexité d'un écosystème et s'apparenteraient mieux au terme de mésocosme, plutôt que les dispositifs en laboratoire qui correspondraient plutôt à des microcosmes.

Dans ce manuscrit de thèse, la totalité des expériences a été effectuées en laboratoire. Comme deux niveaux de complexités en termes d'études, de tailles des dispositifs (de 400 mL à 50 litres, Figure 23) et de durées d'expérimentation (de 3 à 21 jours) ont été élaborés, nous nous baserons donc sur la notion classique de complexité pour distinguer les mésocosmes, des microcosmes.

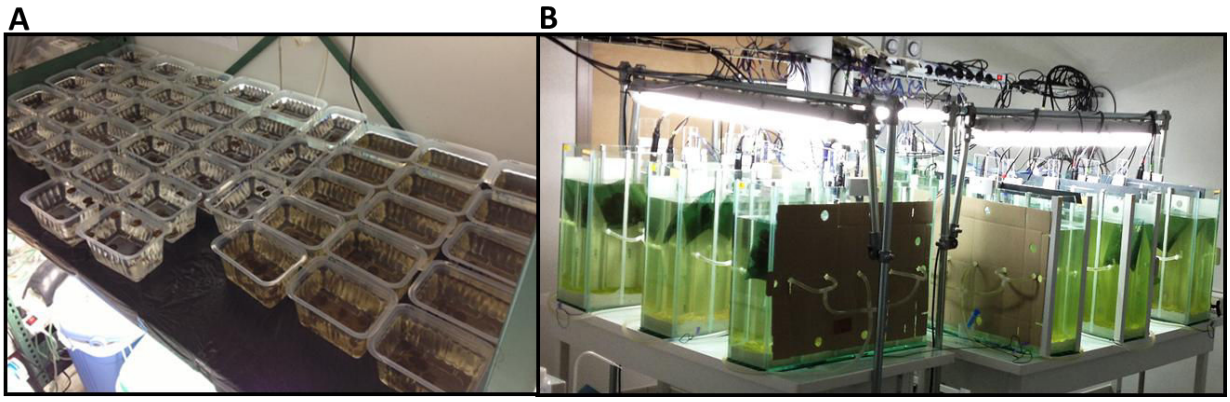


Figure 23 : *Dispositifs expérimentaux de A) 400 ml à B) 50 litres. Photos : J. Andreï*

III.1.2. Avantages et limites d'une démarche de complexification

Chaque type d'étude présente évidemment des avantages et apporte des informations spécifiques. Les études en microcosme, peuvent être plus facilement contrôlées et peuvent alors présenter un

caractère exploratoire. Elle permettent d'apporter par exemple, une base de données fiables, reposant sur de nombreux réplicats en termes de dispositifs ou d'expériences avant de pouvoir se positionner dans des situations plus complexes, plus chronophages et plus onéreuses qui sont développées en mésocosmes (Gohil et al., 2014). Pour cette raison la plupart des études d'écotoxicité conduites notamment sur les nanoparticules ont été effectuées en laboratoire, sous conditions contrôlées et via l'étude d'une seule espèce (Buffet et al., 2014). Essentielles, ces études ont permis de révéler et d'évaluer de potentielles toxicités sur les espèces étudiées ainsi que les mécanismes d'action (Bour et al., 2015). Depuis quelques années seulement, des expérimentations visant à étudier les effets des nanoparticules en conditions plus complexes se sont développées (Buffet et al., 2014; Cleveland et al., 2012; Colman et al., 2013; Kulacki et al., 2012; Lowry et al., 2012a). Toutefois, ces études en mésocosmes, certes plus réalistes et prenant en compte plusieurs interactions interspécifiques ou trophiques présentent différents inconvénients. Longues, coûteuses, complexes à mettre en place et disposant de peu de réplicats, elles peuvent garder ce caractère artificiel de par la présence de parois non naturelles, mais elles sont surtout difficilement contrôlables (Bour et al., 2015). De fortes variabilités entre des réplicats appartenant à une même condition peuvent par exemple devenir difficiles à interpréter. C'est pour cela, que les objectifs d'une étude doivent être clairement définis pour s'assurer que le dispositif en mésocosme soit bien le plus adapté au questionnement (Pascoe et al., 2000). Ces limites et difficultés d'interprétation, notamment en ce qui concerne les nanoparticules, peuvent aussi majoritairement être dues aux limites techniques. Le développement d'études en mésocosmes nécessite un savoir-faire technique ainsi que la possession et maitrise d'outils permettant une bonne caractérisation des milieux et un suivi de la pression de contamination.

C'est par exemple ce que l'on peut observer dans l'étude de (Lowry et al., 2012a) qui ont rapporté pour la première fois le devenir de nAg commerciales dans des mésocosmes simulant une zone humide d'eau douce composée d'une partie terrestre et d'une partie aquatique. Ils ont pu évaluer la distribution et la spéciation de l'argent dans les différents compartiments pendant 18 mois et ont également montré une biodisponibilité de l'argent pour les moustiques, poissons et chironomes suite à une sulfuration incomplète. Cette étude complexe sur le devenir des nAg dans une situation environnementalement réaliste, n'a cependant pas cherché à évaluer la toxicité des nAg sur les organismes. Plusieurs expériences ont par la suite couplé une étude de caractérisation des nanoparticules à une étude de toxicité en mésocosmes (Buffet et al., 2014; Colman et al., 2013). Ces études montrent que ces rares expérimentations sont fondamentalement différentes ce qui ne permet pas de les comparer. Il est donc pour le moment encore difficile d'établir des tendances générales de toxicité des nanoparticules en

conditions complexes (Bour et al., 2015). Les artefacts d'expériences, les difficultés d'interprétation et les faiblesses techniques compliquent ces études qui s'avèrent pourtant nécessaires pour permettre une évaluation certainement plus pertinente des effets des nanoparticules en conditions environnementalement réalistes.

III.2. Prise en compte des différentes échelles biologiques : des indicateurs cellulaires aux indicateurs fonctionnels

Pour la définition de biomarqueur nous nous référons à celle proposée par Lagadic et al. (1997). Ainsi, « *tout changement observable au niveau de l'individu et mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, révélant une exposition présente ou passée à un ou à des contaminants, peut être défini comme un biomarqueur »*. Indicateurs précoces et sensibles des effets des contaminants sur les organismes, ces biomarqueurs son couramment étudiés en écotoxicologie (Chae et al., 2009; Cossu et al., 1997; Galloway et al., 2004; Garaud et al., 2015; Gomes et al., 2014; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). Pour les invertébrés, plusieurs études de « multibiomarqueurs » ont par exemple été effectuées sur des bivalves (Cossu et al., 2000; Gomes et al., 2014; Rocha et al., 2015), des amphipodes (Correia et al., 2002; Guerlet et al., 2008; McLoughlin et al., 2000) ou même sur les deux conjointement (Garaud et al., 2015). Pour être écologiquement le plus pertinent possible, et pour pouvoir comprendre les mécanismes liant les effets au stress, une batterie de biomarqueurs devrait étudier des biomarqueurs reliés à différentes fonction de l'organisme et concernant plusieurs niveaux d'organisation, comme par exemple des biomarqueurs moléculaires, physiologiques et comportementaux (Garaud et al., 2015; Moore et al., 2004; Sroda, 2010).

L'étude des biomarqueurs n'étant pas le sujet de ce manuscrit de thèse mais plutôt un outil pour répondre à notre problématique, les biomarqueurs étudiés seront brièvement décrits et listés. Cependant, dans la littérature, de nombreuses études, s'y sont largement intéressées et les ont clairement défini un à un. Dans son manuscrit de thèse, Sroda, (2010) a par exemple développé l'étude d'une batterie de biomarqueurs sur les gammares pour évaluer la qualité des milieux aquatiques. Plus récemment, une batterie de biomarqueurs (incluant la majorité de ceux cités dans ce manuscrit) a fait l'objet d'une étude approfondie sur les moules zébrées *Dreissena polymorpha* suite à des contaminations aux nanoparticules (Garaud, 2015).

III.2.1. Les biomarqueurs cellulaires (défense antitoxique, défense antioxydante, dommage et réserve énergétique)

La présence d'ions ou de nanoparticules métalliques dans la cellule peut entrainer différents modes d'action présentés en grande majorité dans la figure 24.

Au niveau des membranes, une catégorie de protéines transmembranaires peut interagir avec des xénobiotiques, ce sont les protéines de résistance multi-xénobiotiques, les MXR. Ce mécanisme de défense peut se résumer en un complexe de protéines qui ont en charge d'expulser les xénobiotiques hors de la cellule (Achard et al., 2004; Bard, 2000; Epel et al., 2008; Hyde et al., 1990; Pain and Parant, 2003). Les activités MXR sont plus largement étudiées chez des espèces de mollusque (Luedeking and Koehler, 2004; Pain and Parant, 2003) et les études sur les gammares sont encore rares (Horion et al., 2015; Timofeyev et al., 2007). Plusieurs études repertoriées dans la synthèse bibliographique de Pain and Parant (2003) ont mesuré une induction de ces MXR chez les bivalves suite à la présence d'une contamination. Achard et al. (2004) et Canesi et al. (2014) ont respectivement montré des inductions des activités MXR suite à des contaminations métalliques telles que le cadmium sur les bivalves *Corbicula fluminea* et les $nTiO_2$ sur les branchies des *Mytilus galloprovincialis.*

Dans la cellule et en ce qui concerne les métaux, ils peuvent directement être séquestrés par des métalloprotéines spécifiques : les métallothionéines (MT) les rendant ainsi non disponible. Cette voie de détoxication bien connue a plusieurs fois été décrite (Amiard et al., 2006; Hamer, 1986). Dans la littérature, des inductions de ces MT ont été mesurées chez des crustacés en réponse à une contamination métallique (Amiard et al., 2006; Correia et al., 2002; Galloway et al., 2004). Certaines études comme celle de Buffet et al. (2014) ont au contraire montré que l'exposition du bivalve marin *Scrobicularia plana* à l'argent soluble et au nAg n'avait pas eu d'effet sur les quantités de MT dosées.

Dans la cellule, le contaminant peut aussi interagir avec l'oxygène et entrainer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species). Si les ROS ne sont pas prises en charge et neutralisées par le système de défense antioxydant, elles peuvent conduire à de nombreux dommages cellulaires. Plusieurs enzymes comme la glutathion péroxydase totale (GPxtot), la catalase (CAT), ou encore la superoxyde dismutase (SOD) appartiennent à ce système de défense et participent à la capacité totale antioxydante (TAC), qui regroupe des systèmes de protections enzymatiques et non-enzymatiques. Suite à une contamination et à une production anormale de ROS, ces enzymes apparaissent comme étant de bons biomarqueurs. Leur induction peut être considérée comme une réponse et/ou une adaptation des organismes à leur environnement contaminé alors qu'une déficience de leur activité peut mettre en évidence un état précaire de l'organisme, suggérant des effets toxiques

dans une situation de stress oxydatif (Cossu et al., 2000). D'autres enzymes occupent un rôle secondaire ou intermédiaire comme la phosphatase acide (ACP) et la glutathion-S-transférase (GST) qui permet par exemple la conjugaison des glutathions avec les xénobiotique, ce qui en fait également de bons biomarqueurs de contamination face à une production anormale de ROS. Dans la littérature, les études qui se sont intéressées à ces activités antioxydantes chez les crustacés suite à des contaminations métalliques n'ont pas permis un généralisation des effets observés (Sroda, 2010). Barata et al. (2005) ont par exemple étudié ces activités sur des daphnies exposées à 5 $\mu g.L^{-1}$ de cadmium et 20 $\mu g.L^{-1}$ de cuivre. Si ces métaux ont augmenté les activités des GPx et GST, les CAT et SOD ont vu leur activité différer en fonction de la nature du métal. Le cadmium a diminué l'activité de la CAT et augmenté celle de la SOD alors que le cuivre a augmenté la CAT sans modifier la SOD. Quelques récentes études se sont intéressées aux réponses de ces biomarqueurs suite à des contaminations aux nAg. Chez le bivalve marin *Scrobicularia plana*, de très faibles concentrations d'exposition de 10 $\mu g.L^{-1}$ (nAg de 150 à 500 nm dans l'eau de mer artificielle) ont pu entrainer chez les organismes contaminés des concentrations plus importantes en GST, CAT et SOD (Buffet et al., 2014). Chez les *G. fossarum* exposés à des nAg d'une vingtaine de nanomètres pour des concentrations de 3 $\mu g.L^{-1}$, aucune modification de ces activités n'a été observée (Mehennaoui et al., en préparation).

Quand ces mécanismes de défense sont dépassés, les métaux, nanoparticules ou ROS peuvent engendrer des effets toxiques sur l'organisme en passant dans un premier temps par des dommages cellulaires.

Les principales atteintes cellulaires suite à un stress oxydatif sont des dommages aux niveaux des lipides membranaires. L'oxydation des lipides par les ROS ou encore la peroxydation lipidique ou la lipoperoxydation (LPO) peut engendrer de nombreux dégâts sur la cellule et notamment sur sa perméabilité membranaire. Ces dommages peuvent être quantifiés par le dosage des structures lipidiques intermédiaires comme les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) mais aussi via le dosage du malondialdéhyde (MDA), le produit ultime de cette LPO. D'autres dommages cellulaires peuvent concerner la modification et la perte de fonction entrainant la lyse de protéines, mais aussi des dommages au niveau du cytosquelette et de l'ADN et enfin une mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Rocha et al., 2015). La mort cellulaire par apoptose peut par exemple être évaluée via le dosage de l'enzyme caspase 3 (CAS). Ces dommages cellulaires et notamment une augmentation de la peroxydation lipidique a déjà plusieurs fois été observée sur différentes espèces de gammares contaminés aux cuivre et au cadmium (Sornom et al., 2012; Sroda and Cossu-Leguille, 2011; Vellinger et al., 2012) contrairement aux *G. fossarum* contaminés aux nAg (Mehennaoui et al., en préparation).

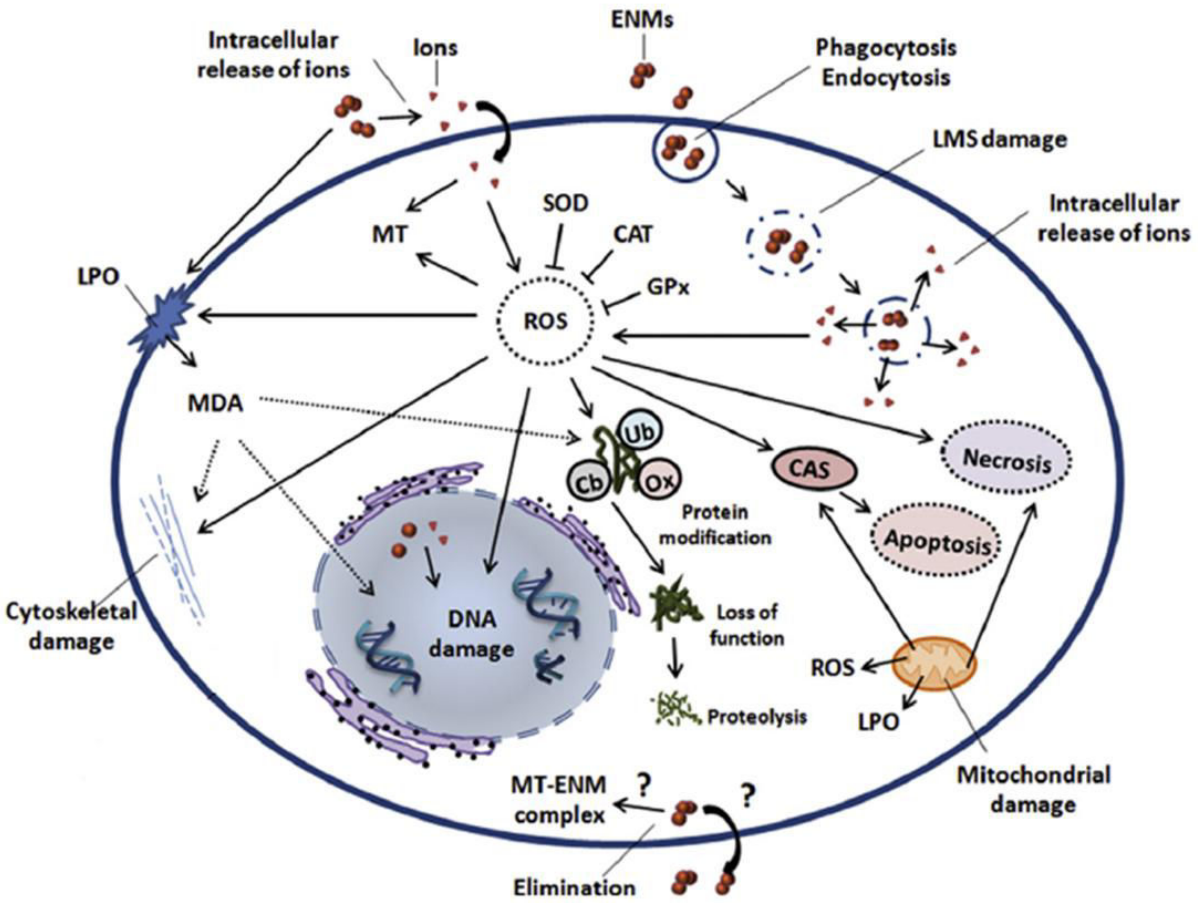


Figure 24 : Schémas général illustrant les principales voies de défenses antioxydantes et antitoxiques ainsi que les voies de dommages cellulaires suite à l'entrée de nanoparticules métalliques ou d'ions métalliques dans une cellule. CAS = casapse, CAT = catalase, Cb = carbonylation, ENP = nanoparticules métalliques manufacturées, GPx = glutathion péroxydase, LMS = stabilité de la membrane lysosomale, LPO = lipoperoxydation, MDA = malondialdéhyde, MT = metallothionéine, Ox = oxydation, ROS = espèces réactives de l'oxygène, SOD = superoxyde dismutase, Ub = ubiquitination. Schémas initialement effectué pour les mollusques bivalves, adapté de Rocha et al. (2015).

L'induction de protéines, d'enzymes et la mise en place des mécanismes de détoxication, décris précédemment, pour faire face à une contamination entraine un accroissement de la dépense d'énergie et donc l'induction des voies du métabolisme énergétique (Lagadic et al., 1997). Le glycogène est la principale forme d'énergie facilement mobilisable et directement utilisable par les cellules. Il peut donc être un bon biomarqueur de stress (Lagadic et al., 1994), tout comme les enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides comme par exemple la lactate déshydrogénase (LDH ; Diamantino et al., 2001; Domingues et al., 2015; Ribeiro et al., 1999). Les quantités de protéines, triglycérides et cholestérol peuvent elles-mêmes apporter des informations intéressantes sur les réserves énergétiques et à ce titre

être considérées comme des biomarqueurs (Garaud et al., 2015; Sroda and Cossu-Leguille, 2011; Mehennaoui et al., en préparation). Le système de transport d'électron (ETS) localisé dans la membrane mitochondriale interne est un système enzymatique permettant la respiration et la production d'énergie par la génération d'ATP (Cammen et al., 1990). La mesure de son activité peut renseigner sur l'activité métabolique de l'organisme au niveau cellulaire. Plusieurs études ont étudié ce biomarqueurs chez des gammares (Schmidlin et al., 2015a; Simcic and Brancelj, 2006) et certaines d'entre elles ont révélé des baisses significatives des activités de l'ETS suite à une contamination des gammares au cuivre (Schmidlin et al., 2015b, 2015c).

III.2.2. Les biomarqueurs individuels (physiologie et comportement)

Ainsi que nous l'avons expliqué dans le chapitre 1, chez les crustacés, la capacité osmorégulatrice concerne le maintien de la différence de pression osmotique entre l'hémolymphe et le milieu externe à une salinité donnée (Lignot et al., 2000). L'osmolalité est un biomarqueur écophysiologique qui permet la mesure de la pression osmotique de l'hémolymphe et qui renseigne donc sur l'état de santé des organismes (Felten et al., 2008). Plusieurs études ont montré l'intérêt de ces biomarqueurs lors de contaminations métalliques et pour de très faibles concentrations (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b; Issartel et al., 2010).

L'activité de consommation en oxygène des organismes peut également s'avérer être un bon biomarqueur physiologique dans l'évaluation des effets d'un contaminant sur l'activité métabolique des organismes. Ainsi, les études de Simcic et al., (2005) et de Simcic and Brancelj, (2006) ont considéré la respiration chez des gammares mais à notre connaissance, concernant les nAg, les rares études se sont plutôt focalisées sur les poissons (Bilberg et al., 2010; Cowart et al., 2011).

Les biomarqueurs écophysiologiques et comportementaux telles que la ventilation ou la locomotion des gammares permettent l'évaluation rapide d'effets sub-létaux (Gerhardt, 1996). Leur utilisation permet d'effectuer une évaluation sensible, simple et surtout non invasive de l'état des organismes au niveau de l'individu et des populations (Wallace et Estephan, 2004 ; Sornom et al., 2010). Plusieurs études se sont intéressées aux effets des métaux sur les activités de locomotion et de ventilation des gammares, et globalement un stress métallique peut entrainer une baisse de ces activités (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b; Kunz et al., 2010; Vellinger et al., 2012).

III.2.3. Les indicateurs fonctionnels

Ces marqueurs fonctionnels dépendant de l'espèce considérée ont déjà bien été décrits, en ce qui concerne les gammares, dans le chapitre 1-II. En effet, de par le résultat de leur activité de consommation et de fragmentation de la matière organique, ces organismes jouent un rôle clé dans les écosystèmes d'eau douce. La production de FPOM qui en découle est alors très importante dans le cycle de la matière organique des cours d'eau. Ces deux activités fonctionnelles hautement reliées que sont la consommation et la production de FPOM des gammares peuvent être impactées par une pollution environnementale. Des baisses d'activité de consommation ont déjà été observées chez des gammares exposé à des métaux (Dedourge-Geffard et al., 2009; V. Felten et al., 2008b) et des baisses consommation et/ou de productions de FPOM chez des gammares exposés à un fongicide (Zubrod et al., 2014, 2011, 2010).

CHAPITRE 2

Optimisation de la contamination – Matériel et Méthodes

I. Techniques de prélèvement, stockage et préparation de l'eau, des gammares et des feuilles avant leur utilisation expérimentale

I.1. Choix des sites d'étude : prélèvements d'eau, d'organismes et incubation des litières

Afin de nous rapprocher au mieux des conditions en milieu naturel, les expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail de thèse ont nécessité des prélèvements *in situ* d'organismes (Gammaridae) et d'eau pour les milieux d'exposition en laboratoire. Par ailleurs, dans certaines expérimentations pour lesquelles nous avons fait le choix de nourrir les organismes durant l'exposition, des disques de feuilles ont au préalable subi un conditionnement microbien *in situ*.

I.1.1. L'eau des milieux d'exposition

Plutôt que d'utiliser de l'eau minérale ou de l'eau de source pour réaliser les milieux d'exposition, nous avons opté pour de l'eau provenant d'une rivière dite de « référence » et qui héberge une population abondante de *Gammarus pulex*. La bonne qualité a été déterminée à l'aide des données de l'agence de l'eau Rhin-Meuse via le site web S.I.E.R.M (Système d'information sur l'Eau Rhin-Meuse ; Annexe 1) mais également grâce aux des données acquises par C. Vellinger au cours de sa thèse (Vellinger, 2012). Dans ce travail, différentes rivières de la région avaient été prospectées et la Méholle avait finalement été choisie comme eau de référence. C'est donc tout naturellement que nous avons considéré ce cours d'eau comme milieu de référence ainsi que comme eau naturelle d'exposition.

La Méholle est un petit ruisseau qui coule sur la commune de Void-Vacon située dans le sud de la Meuse (Latitude 48°0'53.9598 ; Longitude 6°23'36.7764, Figure 25). Les suivis de mesures de qualité SEQ-Eau (Agence de l'Eau Rhin-Meuse) la classe dans la catégorie des ruisseaux de très bonne qualité sur ses paramètres généraux ainsi que de première catégorie piscicole (Annexe 1, A).

I.1.2. Les Gammaridae comme organismes modèles

Les gammaridae sont depuis quelques années couramment utilisés pour réaliser des tests en écotoxicologie. Leur large distribution, la facilité de prélèvement, de détermination des espèces et des

sexes ainsi que leur sensibilité à certains polluants en font des organismes de choix. Dans nos études nous avons souhaité travailler sur différentes espèces ainsi que sur plusieurs populations d'une même espèce afin de pouvoir comparer leurs réponses. Sur la base d'études réalisées antérieurement au laboratoire, notre choix S'est porté sur 3 espèces : *Gammarus pulex* (Vellinger, 2012)*, G. fossarum* (Arce Funck, 2014; Felten, 2003; Sroda, 2010) *et G. roeseli* (Gismondi, 2012; Sroda, 2010). Ces trois espèces ont été échantillonnées dans trois cours d'eau différents en termes de localisation géographique, morphologie, berges et qualité de l'eau.

La Maix (Latitude 48°29'02.1'', Longitude 007°04'008.5'') est un ruisseau d'ordre 2 drainant un bassin versant dans les Vosges gréseuses (Figure 25). Avec une faible hauteur d'eau, ce ruisseau n'est soumis à aucune pression anthropique directe exception faite de l'exploitation forestière. *G. fossarum* y est abondant et représente la principale espèce de déchiqueteur de cet écosystème.

La Méholle (Latitude 48°0'53.9598, Longitude 6°23'36.7764) est également un cours d'eau d'ordre 2 (Figure 25). Il présente cependant un gabarit sensiblement plus important que le ruisseau de La Maix avec notamment une profondeur d'eau plus importante selon les facies d'écoulement. Il draine un bassin calcaire composé majoritairement de forêts et de prairies. La Méholle héberge une importante population de *G. pulex* associés à quelques *G. roeseli*.

La Nied Française sur le site de Rémilly en Moselle (Latitude 49°0'15.0333, Longitude 6°39'35.5971) est un cours d'eau d'ordre 3 qui draine un bassin versant principalement agricole (cultures intensives et prairies) et forestier. Les facies d'écoulement sont fortement différents des deux autres cours d'eau et les macrophytes occupent la majeure partie du lit mineur (Figure 25 et 26). Selon le S.I.E.R.M, la qualité générale de ce cours d'eau est considérée comme passable (Annexe 1B). Les gammaridae semblent n'y être représentés que par *G. roeseli*.

Quelle que soit l'espèce étudiée et le site de prélèvement, la présence de parasites acanthocéphales a été observée. De fait, les organismes parasités ont soigneusement été retirés des prélèvements.

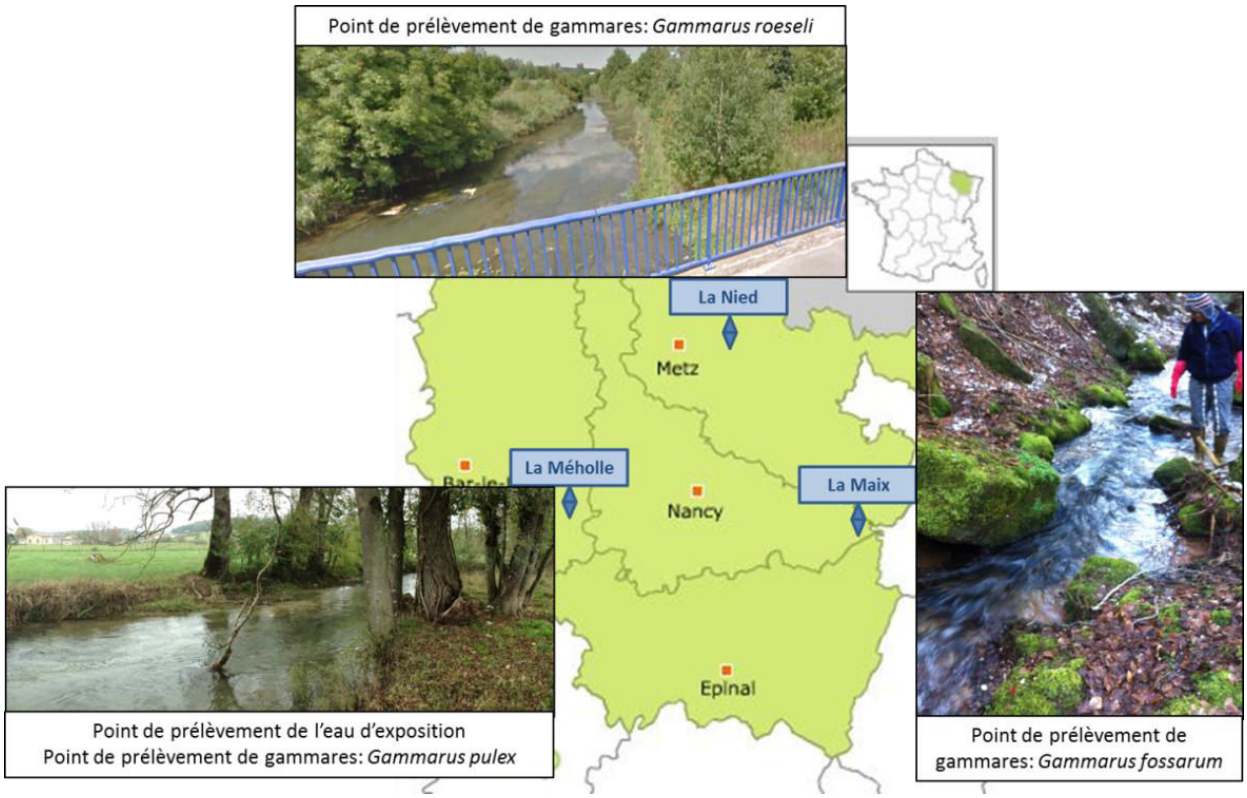


Figure 25 : Localisation géographique et photographies des 3 sites de prélèvements des espèces de gammares et de l'eau utilisée lors des expositions en laboratoire. Sources : Google map (La Nied) ; A. Gossiaux (La Maix) et J. Andreï (La Méholle).

Pour l'étude des populations, un travail de prospection dans la région a été réalisé par Simon Devin et Van Xuan Nguyen. Deux autres populations de l'espèce *Gammarus roeseli,* qui est facilement indentifiable *in situ* ont été localisées.

Ainsi, une deuxième population a été prélevée dans La Nied sur le site d'Oron en amont du premier site Rémilly (Latitude : 48.905652, Longitude : 6.479068). Ces deux points de prélèvement dans la Nied sont géographiquement très éloignés (Figure 26) et possèdent des caractéristiques différentes mais ont tous deux une qualité d'eau considérée comme passable (Tableau 2, Annexe 1, B : site de Rémilly, point de mesure à Lemud et C : site d'Oron, point de mesure à Baudrecourt).

La troisième population a été prélevé dans la Seille au niveau de la commune de Marly en Moselle (Figure 26 ; Latitude : 49.061197, Longitude : 6.152600). Cette rivière, qui se jette dans la Moselle, possède également une qualité d'eau passable (Tableau 2, Annexe 1, D).

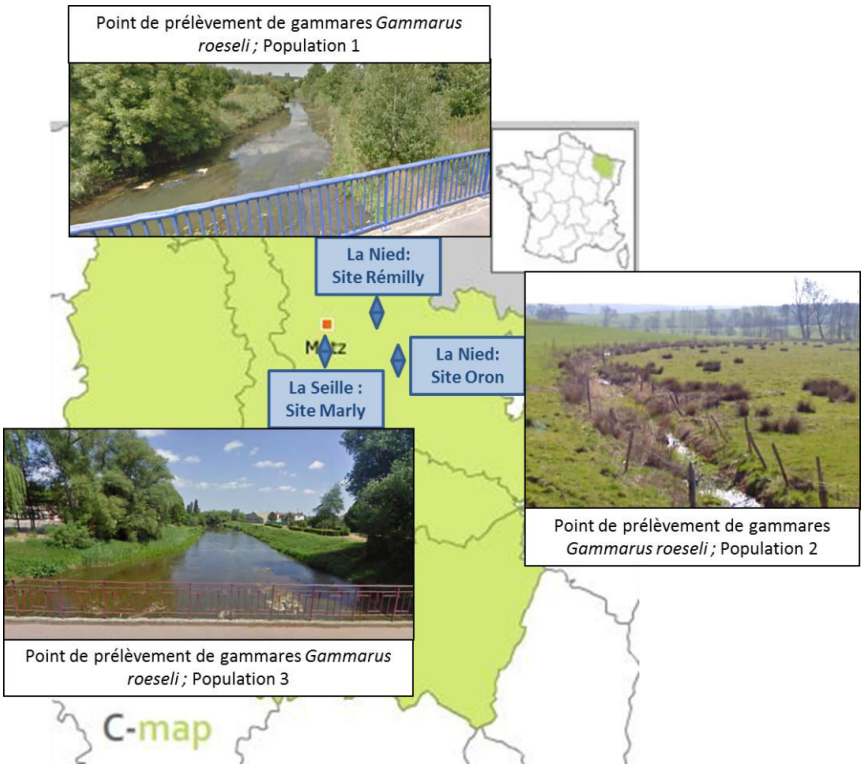


Figure 26 : Localisation géographique et photographies des 3 sites de prélèvements des populations de gammares appartenant à l'espèce G. roeseli. Sources :Google map.

Les qualités des eaux ainsi que les valeurs de pH, conductivité, oxygène dissous et de quantité de matière en suspension de chacun de ces sites de prélèvement sont résumées dans le tableau 2. Les moyennes correspondent aux valeurs mesurées entre les années 2005 et 2013. Malheureusement, ces valeurs n'étaient pas disponibles pour le cours d'eau de la Maix.

Tableau 2 : Paramètres physicochimiques (pH, Conductivité, Oxygène dissous, Matières en suspension) mesurés entre 2005 et 2013 et qualité générale en 2013 établie par l'Agence de l'eau Rhin-Meuse et consultables sur le site du S.I.E.R.M (Annexe 1).

Cours d'eau	**La Méholle**	**La Nied**	**La Nied**	**La Seille**
Point de mesure S.I.E.R.M	**Void-Vacon**	**Lemud**	**Baudrecourt**	**Metz**
Point de prélèvement pour expérience	**Void-Vacon**	**Rémilly**	**Oron**	**Marly**
pH	8,01 ± 0,05	7,98 ± 0,05	7,88 ± 0,03	8,14 ± 0,09
Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)	498,77 ± 18,06	1488,13 ± 165,97	1384,67 ± 158,79	1980,00± 315,04
Oxygène dissous ($mgO_2.L^{-1}$)	10,70 ± 0,38	8,70 ± 0,46	8,98 ± 0,41	9,78 ± 0,55
Matières en suspension ($mg.L^{-1}$)	5,11 ± 2,28	21,22 ± 8,22	15,56 ± 11,01	36,27 ± 18,27
Qualité générale	**Très Bonne**	**Passable**	**Passable**	**Passable**

I.1.3. Les feuilles

Au laboratoire, les gammares ont été nourris avec des feuilles d'aulne collectées au moment de l'abscission. Il s'agit là d'une espèce qui même en absence de conditionnement microbien est appétente pour les organismes benthiques. Son appétence est cependant augmentée après la colonisation par des hyphomycètes aquatiques qui constituent les principaux acteurs microbiens de la décomposition de la matière organique allochtone dans les cours d'eau.

I.2. Méthodologie de prélèvement *in situ*, de stockage en laboratoire et de préparation avant expérimentation

I.2.1. Filtration de l'eau

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, l'eau a été prélevée dans la rivière la Méholle. Lors de chaque prélèvement, la température, le pH, la conductivité et le pourcentage en oxygène de la rivière ont été mesurés à l'aide d'une sonde multiparamétrique (Multi 3430 SET G, WTW) pour s'assurer de prélever une eau comportant des caractéristiques homogènes entre les différentes semaines, mois ou années. Des bidons de 20 L en polyéthylène préalablement lavés ont été utilisés. Après trois rinçages des bidons avec l'eau de la rivière, l'eau a été prélevée au centre du lit de la Méholle. Au retour au laboratoire, les bidons ont été immédiatement stockés en chambre froide à 4°C et à l'obscurité.

Avant utilisation l'eau a été filtrée sous vide à l'aide de filtres en microfibres de verre de 90 mm de diamètre ayant une porosité de 1,2 µm (Cat No 1822 090, Whatman®). Cette filtration permettait de retirer du milieu les matières en suspension susceptibles d'interagir avec les nanoparticules. Après cette étape, l'eau était placée à l'obscurité à 12°C pendant 48h avant son utilisation pour permettre une augmentation progressive de sa température avant d'y introduire les organismes. Si pour certaines études, les lancements étaient décalés dans le temps, les volumes d'eau nécessaires étaient eux-aussi acheminés en décalé. Avant chaque début d'utilisation de cette eau, son pH, sa température, son pourcentage d'oxygène dissous et sa conductivité étaient contrôlés à l'aide d'une sonde multiparamétrique.

I.2.2. Acclimatation des gammares

Sur le terrain les organismes ont été collectés de différentes façons en fonction des saisons et des niveaux d'eau. Ainsi nous avons eu recours à des « substrats pièges » constitués de brosses de balais en fibre de coco ou encore des cages grillagées remplies de galets, disposés dans les cours d'eau plusieurs semaines avant les prélèvements. Enfin, lorsque les conditions le permettaient, des collectes effectuées directement dans le cours d'eau à l'aide de filets ont été effectuées. Les organismes ont ensuite été rapportés au laboratoire dans des glacières remplies de l'eau du site et contenant des litières comme source d'alimentation et d'abris. Possédant un comportement grégaire lorsqu'ils sont confinés en forte densité, des bandelettes de mailles (500 µm) étaient étalées dans le fond des glacières pour permettre aux gammares de s'accrocher afin d'éviter qu'ils ne s'attaquent entre eux. Les glacières étaient ensuite disposées à 12°C dans une chambre thermostatée et l'eau oxygénée à l'aide de bulleurs. Une lumière diffuse et indirecte était appliquée en suivant une photopériode de 16h de luminosité et 8h de nuit. Les organismes ont à chaque fois été prélevés seulement quelques jours avant le début des processus d'acclimatation et d'expérimentation.

Comme les espèces et populations étudiées provenaient de milieux différents, et qu'il était primordial d'effectuer la totalité des études dans une même eau de référence, il a fallu progressivement acclimater les organismes. Nous avons donc cherché à vérifier que les changements de milieux n'affectaient pas les organismes au moment du démarrage des expositions.

Pour cela, un protocole d'acclimatation a été mis en place puis testé avant de commencer les premières expériences. Environ 200 mâles issus de précopulats et appartenant à l'espèce *G. fossarum* qui est considérée comme étant la moins tolérante aux changements de milieu ont été prélevés dans la Maix. La moitié d'entre eux ont été acclimatés à l'eau de la Méholle alors que pour l'autre moitié, les gammares ont été maintenus dans leur eau d'origine, celle de la Maix. Ainsi articulée, l'étude nous a permis d'observer si la nouvelle eau d'acclimatation pouvait impacter les organismes par rapport à leur eau d'origine. Pour cela, pendant 3 jours, l'eau initiale a progressivement été remplacée par la nouvelle puis les organismes ont été laissés pendant 7 jours dans cette nouvelle eau avant d'être utilisés. En effet, le premier jour, 1/3 du volume de la Maix a été retiré au profit de la Méholle ou de la Maix. Le second jour, les 2/3 de ce premier mélange ont été remplacés et le troisième jour la totalité de l'eau a été remplacée au profit de l'eau finale désirée (Maix ou Méholle). Dès le lendemain ainsi que 7 jours après, 30 organismes ont été prélevés dans chaque bac afin d'y mesurer leur osmolalité, leur ventilation et leur locomotion. L'activité des protéines MXR a été mesurée seulement 7 jours après (n=36). Les protocoles de mesures concernés sont détaillés dans le paragraphe VI. Durant la période d'acclimatation, les

gammares étaient nourris *ad libitum* avec des feuilles récupérées sur le terrain puis renouvelées périodiquement par des feuilles d'aulne entières. L'eau était également constamment oxygénée par bullage et soumise à une lumière indirecte qui suivait une photopériode de 16h de luminosité et 8h de nuit.

Le tableau 3 illustre les résultats obtenus. Une unique différence significative due au changement de milieu des gammares dans la Méholle a été observée au niveau de leur ventilation un jour après la fin de leur acclimatation (Test student : p-value < 0,05). En les transférant dans une eau plus minéralisée qu'est la Méholle (525 µS.cm^{-1}) par rapport à la Maix (50 µS.cm^{-1}), les organismes doivent adapter leur régulation ionique au nouveau milieu qui est plus concentré que le milieu d'origine. C'est donc logiquement que la ventilation ait dans un premier temps été réduite puisque les gammares ont moins besoin d'investir d'énergie dans la récupération d'ions. Après 7 jours dans la nouvelle eau les gammares sont bien adaptés, et aucune différence significative n'est observée entre les différentes valeurs des paramètres mesurés.

Tableau 3 : Paramètres étudiés (MXR : n=9 ; Osmolalité : n=10 ; Ventilation : n=10 et Locomotion : n=10) et résultats mesurés chez G. fossarum mâles, 1 et 7 jour après la fin de leur acclimatation dans la même eau que celle de la rivière dans laquelle ils ont été prélevés : La Maix, ou dans une autre eau : La Méholle. L'astérisque correspond à une différence significative entre les deux types d'acclimatation

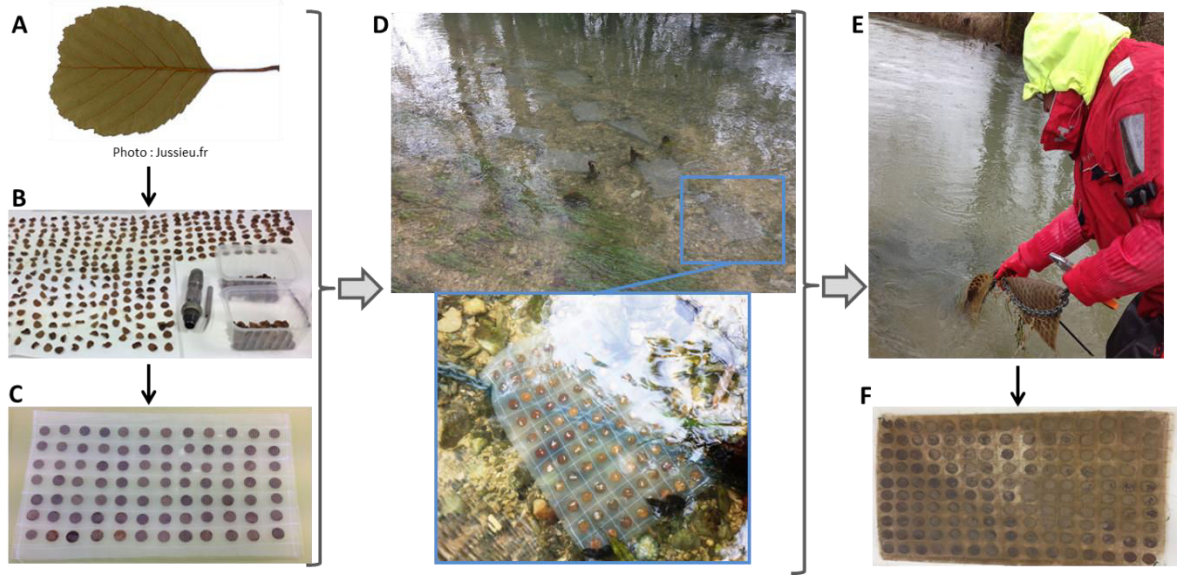
Temps après acclimatation	**Jour 1 après renouvellement**		**Jour 7 après renouvellement**	
Type d'acclimatation	**Maix -> Maix**	**Maix-> Méholle**	**Maix -> Maix**	**Maix-> Méholle**
MXR (Emissivité UA/[protéines])	*Non mesuré*	*Non mesuré*	0, 18 ± 0,03	0,13 ± 0,04
Osmolalité (mOsmol/kg)	282,61 ± 12,39	310,43 ± 30,16	279,76 ± 19,96	276,13 ± 17,43
Ventilation (nombre de battements de pléopodes/minute)	201,60 ± 2,50 *	179,18 ± 7,8	197,60 ± 3,22	197,00 ± 3,05
	Test Student : p.value < 0,05			
Locomotion (% du nombre d'individus en mouvement)	51 ± 2,08	55 ± 2,33	47 ± 2,26	52 ± 1,41

I.2.3. Conditionnement *in situ* des feuilles

Les feuilles ont été collectées au moment de l'abscission. Pour cela, pendant l'automne des filets avait été disposés à un mètre de hauteur sous des aulnes pour éviter tout contact avec le sol évitant ainsi la colonisation par des micro-organismes présents dans ce sol. Quelques semaines après la pose des filets et en fonction des conditions météorologiques, les feuilles étaient collectés et rapportés au

laboratoire où elles étaient étalées sur des paillasses sous serre, afin de les sécher pendant plusieurs semaines avant d'être stockées à l'obscurité dans des cartons jusqu'à leur utilisation.

La figure 27 explique le protocole de conditionnement des feuilles d'aulne par les micro-organismes présents dans la Méholle. Ce conditionnement permet de rendre les feuilles plus appétentes pour les gammares. Les feuilles d'aulne séchées à l'air libre ont été ré-humidifiées puis des disques de 16 mm de diamètre ont été découpés en évitant les nervures principales à l'aide d'un emporte-pièce (Figure 27 A et B). Les disques de feuilles ont ensuite été disposés un à un entre 2 portions d'un tissu nylon d'une maille de 500 µm, puis les contours de chaque disques ont été cousus à la machine (Figure 27 C). Ainsi disposés, les disques de feuilles ont ensuite été immergés dans La Méholle (Figure 27 D) où ils ont été accrochés par lots de 4 à des chaines fixées au fond de la rivière. Ce type de disposition permettait de s'assurer que les sachets de feuilles resteraient en place quelques soient les conditions hydrologiques. Après 10 à 12 jours de conditionnement *in situ*, les disques ont été récupérés (Figure 27 E) puis ramenés au laboratoire dans des glacières remplies d'eau de la rivière. Une fois acheminés au laboratoire, les dispositifs de nylon maintenant les disques ont été soigneusement découpés et les disques ont été rincés dans l'eau de la rivière. En fonction des expériences, ils ont soit été directement utilisés, soit congelés. Avant de servir de ressource alimentaire pour les gammares, les disques ont été déshydratés soit par lyophilisation (24h à -80°C) soit à l'étuve (24 à 48h à 105°C) puis pesés.



<u>Figure 27 :</u> Protocole et étapes (de A à F) du conditionnement des feuilles sur le terrain. Sources : Jussieu.fr (feuille) ; J. Andreï

I.3. Le cas particulier des expériences en conditions plus complexes (Chapitre 4)

Les expériences en conditions plurispécifiques et en mésocosmes ayant été conduites dans des contextes différents (présence de sédiment et d'autres organismes ; contexte collaboratif avec protocole commun entre plusieurs laboratoires), les protocoles utilisés diffèrent de ceux exposés précédemment.

I.3.1. Expérience en condition plurispécifique (*G. roeseli* et *D. polymorpha*)

Dans cette étude, deux types d'eau ont été étudiés : l'eau du Rhône à Arles et celle du Rhône à Jons (Tableau 4). La méthodologie sera plus détaillée dans le chapitre 4. Les protocoles de prélèvement et d'acclimatation des gammares étaient les mêmes que ceux détaillés précédemment.

Tableau 4 : Paramètres physicochimiques (Température, pH, Conductivité, Oxygène dissous, Matières en suspension et Carbone organique) mesurés entre 2012 et 2013. D'après des mesures établies par l'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée et consultables sur le site du S.I.E.R.M (http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/donnees-documents/).

Paramètres	Rhône à Arles	Rhône à Jons
Température (°C)	15,87 ± 5,92	13,68 ± 5,56
pH	8,31 ± 0,14	8,03 ± 0,19
Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)	426,43 ± 25,04	349,06 ± 31,13
Oxygène dissous ($mgO_2.L^{-1}$)	10,09 ± 1,62	10,14 ± 1,19
Matière en suspension ($mg.L^{-1}$)	29,31 ± 34,48	85,94 ± 230,16
Carbone organique ($mg.L^{-1}$)	1,67 ± 0,27	1,48 ± 0,34

I.3.2. Expériences en mésocosmes

L'eau utilisée dans les expositions en mésocosmes était de l'eau de Volvic complémentée avec 6,8 $mg.L^{-1}$ de Chlorure de Calcium dihydraté ($CaCl_2$ $2H_2O$, Sigma-Aldrich). Les gammares (*G. roeseli*) avaient donc été acclimatés dans cette même eau selon le protocole détaillé plus haut. Concernant les feuilles d'aulne, une fois leurs pétioles retirés elles avaient été pesées entières puis autoclavées 20 minutes à 120°C. Après 3 rinçages successifs à l'eau MilliQ, elles avaient ensuite été mises à conditionner dans l'eau des mésocosmes 2 jours avant l'ajout des gammares dans le milieu. Les gammares avaient quant à eux été prélevés selon le protocole décrit plus haut.

II. Caractérisation des nanoparticules (Nanosight, Zetasizer, MET)

Plusieurs types de nanoparticules ont été étudiés (Tableau 5) : des nanoparticules commerciales et d'autres synthétisées spécialement par les partenaires du programme MESONNET (CEREGE, Aix en Provence, France ; LCMCP, Paris, France).

Les nanoparticules d'argent étudiées dans les expériences en microcosmes ont d'abord été commandées chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). La société Sigma-Aldrich a changé en cours de thèse son listing de produits mais nous a confirmé qu'elle se fournissait chez Nanocomposix (Prague, République Tchèque) pour les nanoparticules d'argent. Par la suite nous avons donc préféré commander les nanoparticules directement à cette société qui disposait de surcroit d'un plus grand choix de tailles.

A leur réception, les nanoparticules d'argent de forme sphérique se présentaient sous forme d'une suspension dans un tampon aqueux de citrate avec un enrobage de citrate de sodium. Les solutions stocks présentaient toutes une concentration en argent de 0.02 mg mL^{-1} ± 5% et un potentiel zeta entre -35 et -49 mV. Dès réception elles ont été stockées à 4°C et à l'obscurité avant leur utilisation. Comme spécifié par le fournisseur, les flacons ont été vigoureusement agités avant chaque prélèvement.

Afin de vérifier les tailles des diamètres mesurés au microscope électronique à transmission (MET) par Sigma-Aldrich et au zetasizer Nano ZS (Malvern) par Nanocomposix, des volumes de 1 mL ont été prélevés dès l'ouverture des flacons et stockés dans des tubes éppendorf à 4°C et à l'obscurité. Ces échantillons ont rapidement été analysés au LIST (Belvaux, Luxembourg) avec un Nanosight (NanoSight 500, Malvern Instrument Ltd, UK). Après une dilution au 200ème des solutions stocks dans de l'eau déminéralisée, les distributions de taille ont été mesurées grâce à une technique de suivi des nanoparticules (NTA) permettant de détecter les nanoparticules en temps réel, de les compter et de les mesurer. Les nanoparticules en suspension sont illuminées avec un laser. La diffusion de la lumière due à la présence des nanoparticules est détectée grâce à une caméra, puis analysée (logiciel, NTA Version 2.3). Les distributions de tailles moyennes obtenues prennent en compte la totalité des particules mesurées. Les distributions nommées « mode » prennent en compte la taille majoritaire pour laquelle le pic de distribution est le plus élevé. C'est cette valeur qui nous informe sur le diamètre hydrodynamique moyen de la plupart des nanoparticules présentes dans les solutions mères. Les rapports d'analyse obtenus dans l'eau déminéralisée sont présentés dans l'annexe 2.

Pour aller sensiblement plus loin dans la caractérisation, des mesures de distribution des nanoparticules dans l'eau des milieux d'exposition ont aussi été effectuées. Des échantillons d'eau de la Méholle filtrée (1,2 µm) contenant uniquement l'eau du milieu ont été passés au nanosight. Avec une moyenne des diamètres de 182 ± 11 nm sur la totalité de la distribution et un mode s'élevant à 86 ± 4.1 nm, les mesures au nanosight ont montré l'existence de particules organiques à l'échelle nanométrique dans l'eau. Lorsque les mesures seront faites dans cette eau, ces particules représenteront donc des artéfacts de mesure.

Tableau 5 : Caractéristiques des solutions stocks des nanoparticules d'argent étudiées lors des expositions en microcosmes. La dernière ligne représente les « modes » du diamètre hydrodynamique mesuré dans de l'eau milliQ à l'aide du Nanosight. NR : Non renseigné.

nAg	10 nm	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	60 nm	100 nm
Société	Nanocomposix NanoXact™ silver	Sigma-Aldrich	Nanocomposix NanoXact™ silver	Nanocomposix NanoXact™ silver	Nanocomposix NanoXact™ silver	Sigma-Aldrich	Nanocomposix NanoXact™ silver
Diamètre MET (nm)	9,3 ± 1,8	10 ± 4	19.9 ± 2.9	39.0 ± 5.2	60.8 ± 6.6	60 ± 4	103.0 ± 11.0
Diamètre hydrodynamique (nm)	14,6	NR	27.2	41.8	62.5	NR	106.5
Potentiel zeta (mV)	-35,9	NR	-40.5	-40.3	-49.9	NR	-42.6
[Ag] ($mg.mL^{-1}$)	0,021	0.02	0.021	0.022	0.021	0.02	0.022
Concentration en particules ($particules.mL^{-1}$)	4.70E+12	NR	4.8E+11	6.70E+10	1.70E+10	NR	3.60E+09
Aire de surface MET ($m^2.g^{-1}$)	57.2	NR	27.6	14.2	9.2	NR	6.5
Surface de la particule	Citrate de sodium	Citrate de sodium	Citrate de sodium	Citrate de sodium	Citrate de sodium	Citrate de sodium	Citrate de sodium
Solvant	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM	Solution aqueuse de citrate 2mM
pureté de l'argent (%)	99.99	NR	99.99	99.99	99.99	NR	99.99
Diamètre Nanosight (MODE, eau milliQ)	**14 ± 1.3**	**NR**	**24 ± 1.2**	**46 ± 0.3**	**58 ± 1.0**	**NR**	**92 ± 2.6**

III. Comportement des nanoparticules, optimisation de la contamination

Compte tenu du type d'exposition souhaitée (eau prélevée *in situ*, exposition à des concentrations faibles, nature des contaminants), nous avons réalisé un panel d'expérimentations visant à mieux comprendre et maîtriser la pression de contamination dans les milieux expérimentaux. Cette approche expérimentale préliminaire indispensable a constitué une grande part de cette première partie de thèse.

Les nanoparticules peuvent s'agréger, sédimenter, se dissoudre ou encore s'adsorber (Nowack et al., 2012). Les premiers travaux ont donc consisté à maîtriser le comportement des nanoparticules dans les dispositifs expérimentaux (en polystyrène standard ou polypropylène, de 250 à 500mL) dans le but de s'assurer que la pression de contamination pouvait être maintenue constante lors des expérimentations envisagées. Des expériences déjà réalisées au laboratoire sur l'argent dissous, ont montré l'importance d'une pré-saturation des dispositifs avant l'exposition pour limiter les phénomènes d'adsorption (Arce Funck et al., 2013). Les nanoparticules d'argent n'ayant pas forcément le même potentiel d'adsorption que l'argent lui-même, différents tests de saturation, d'adsorption et désorption de l'argent dissous sous forme de nitrate d'argent ($AgNO_3$) et de nanoparticules (60 nm) ont été réalisés. Chacun de ces tests a été conduit à 12°C avec une photopériode de 16h de luminosité et 8h de nuit dans de l'eau de la Méholle filtrée comme expliqué dans le paragraphe I.3.1. Plusieurs paramètres ont été pris en compte comme : la nature des microcosmes, la luminosité ou encore le volume afin de pouvoir par la suite optimiser et reproduire aux mieux les expériences de contamination.

Pour chaque contamination aux nanoparticules d'argent, les solutions tests ont été préparées en diluant la solution stock de nanoparticule (0.02 $mg.mL^{-1}$) dans l'eau d'exposition (La Méholle). Le mélange des nanoparticules dans l'eau d'exposition était garanti par l'ajout d'un volume d'eau très important sur un volume très faible de contaminant. Le volume total était préparé dans un grand bécher en verre de 800 mL à 2 L puis les volumes d'exposition voulus étaient déversés un à un dans les dispositifs de contamination. Concernant le nitrate d'argent, 25 mg de cristaux étaient minutieusement pesés puis dilués dans de l'eau déminéralisée afin d'obtenir une solution à 250 $mg.L^{-1}$. Cette solution était par la suite diluée par 10 pour obtenir une solution à 25 $mg.L^{-1}$ soit 0.025 $mg.mL^{-1}$. A l'instar des nanoparticules, les solutions tests ont été préparées à partir de cette solution mère.

III.1. Tests d'adsorption et désorption sur les dispositifs

III.1.1. Choix des dispositifs de contamination

Le premier test a eu pour objectif de définir le type de matériaux à utiliser comme dispositif expérimental. Ce premier test a donc comparé l'utilisation de petites barquettes en polystyrène standard (PS) ou en polypropylène (PP) ayant chacune des contenances de 125 mL. Chaque dispositif a été saturé pendant 48h par 100 mL de la condition de contamination voulue soit : des conditions contrôles sans argent et des conditions contaminées à 0,5 µg.L^{-1} d'argent sous forme $AgNO_3$ ou sous forme nAg 60nm de diamètre. Après ce temps de saturation, les milieux ont été renouvelés par 100 mL de milieux de contamination puis, après 24h, un prélèvement de 10 mL a été effectué puis acidifié à 1% d'acide nitrique (HNO_3) avant d'être dosé en spectrométrie d'absorption atomique (AAS, Figure 28).

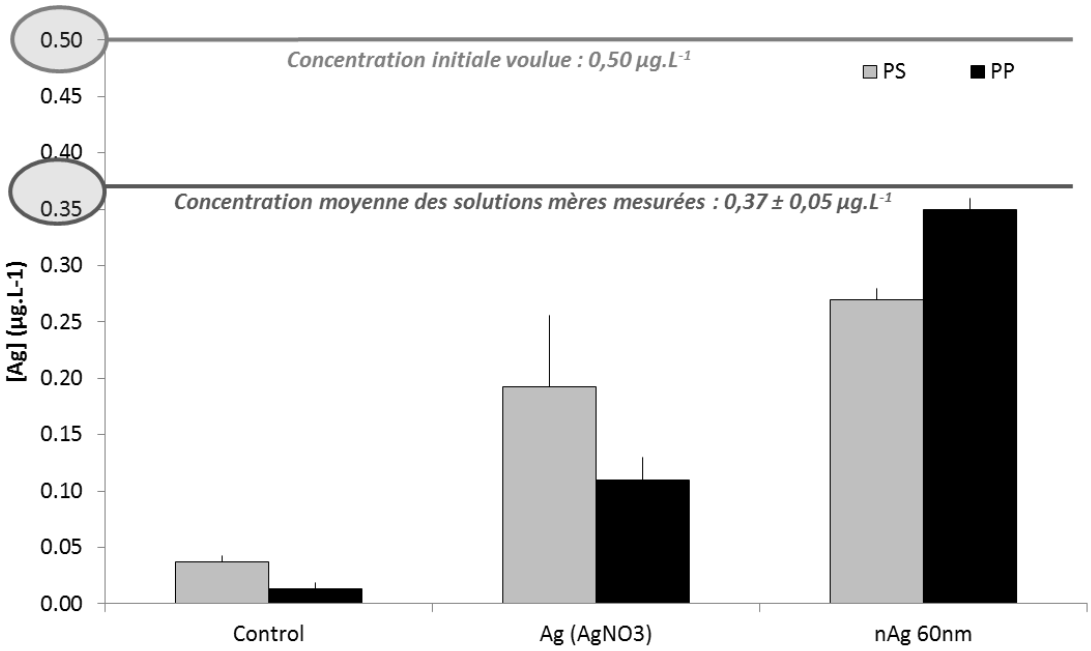


Figure 28 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h de contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre contenus dans des dispositifs composés de Polystyrène Standard (PS) ou de Polypropylène (PP).

Les résultats montrent que l'argent disposé dans le milieu n'est pas entièrement retrouvé après 24h, et ce, malgré une saturation à l'argent en amont de tous les dispositifs. L'écart entre les concentrations initiales voulues et les concentrations dosées dans les solutions mères n'est pas négligeable et pourrait être dû à des processus d'adsorption. Pour l'argent dissous sous forme d'$AgNO_3$, sa disparition dans la

colonne d'eau après 24h est très importante et laisse supposer qu'un processus ici non étudié entre en jeu. Pour les contaminations aux nanoparticules d'argent, c'est l'utilisation de barquette en polypropylène qui a permis de rester dans des gammes de concentrations proches de celles dosées dans les solutions mères. Toutefois un écart reste perceptible et c'est pour cela que le second test a concerné le protocole de saturation des dispositifs.

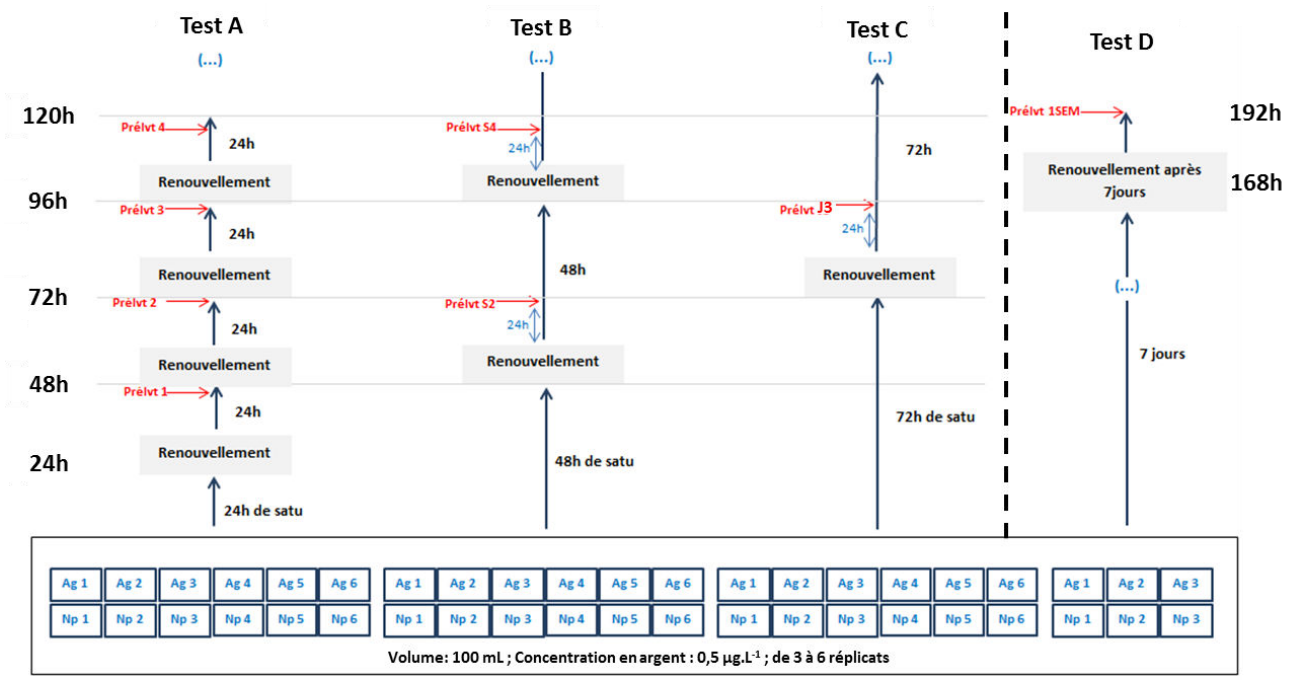
III.1.2. Mise en place du protocole de saturation

Une perte d'argent dans la colonne d'eau comme celle observée précédemment pourrait être due à une adsorption importante sur les parois des dispositifs (barquettes en polypropylène). Ce constat réalisé, nous avons effectués des tests d'adsorption du nitrate d'argent et des nAg de 60 nm en comparant différents protocoles de saturation (Figure 29). Il est à noter qu'une verrerie spécifique à chaque condition de contamination a été employée et qu'elle n'a pas été lavée entre les opérations ce qui a permis de la saturer également.

Le test A (Figure 29) consistait à saturer pendant 24h les dispositifs à la concentration voulue : 0,5 $\mu g.L^{-1}$. Après remplacement par la solution de contamination, des dosages suivis de renouvellements ont été effectués toutes les 24h.

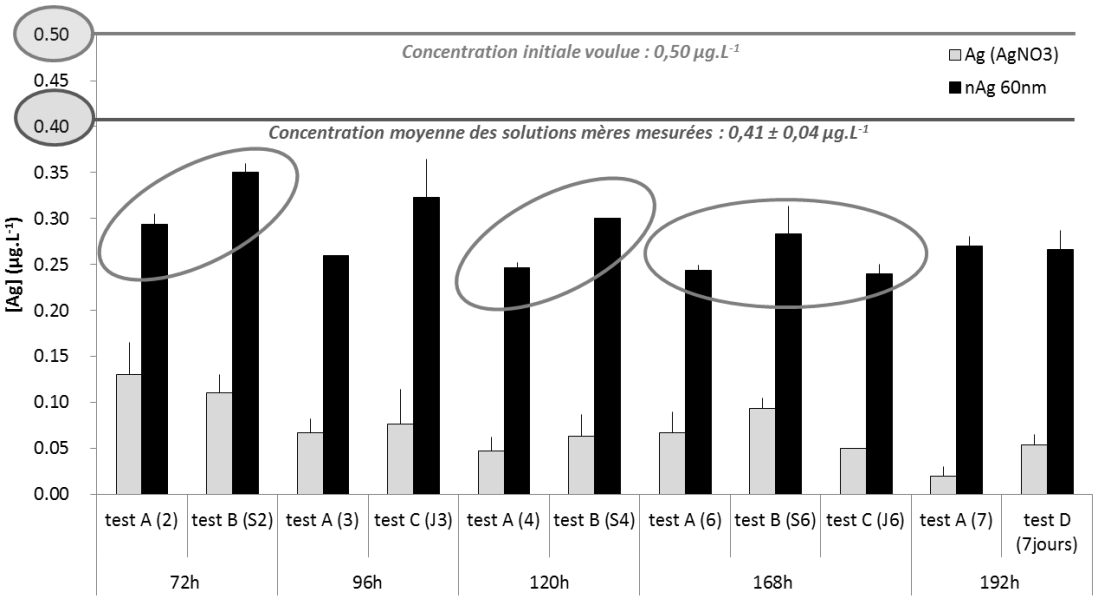
Pour le second test, le test B (Figure 29), le renouvellement a eu lieu 48h après saturation et la solution a été changée toutes les 48h.

Le même protocole a été suivi pour le troisième test C et le quatrième test D avec une saturation et un renouvellement de 72h et 168h respectivement. Notons que pour pouvoir comparer convenablement tous les protocoles, les volumes de milieux à doser ont toujours été prélevés 24h après chaque renouvellement (protocole résumé en Figure 29).



<u>Figure 29 :</u> Schémas des différents tests de protocole de saturation : Test A : jours 2 - 3 - 4 - 6- 7 : 24h de saturation + renouvellements et dosages quotidien. Test B : S2 - S4 - S6 : 48h de saturation + renouvellements et dosages toutes les 48h. Test C : J3- J6 : 72h de saturation + renouvellements et dosages toutes les 72h. Test D : 168h de saturation + renouvellement et dosage.

La figure 30 ci-dessous donne les concentrations moyennes en argent mesurées dans les milieux en fonctions des différents types de protocoles appliqués afin d'observer lequel semble être le mieux adapté pour maintenir la concentration en argent.



<u>Figure 30 :</u> Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h de contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre après différents tests de protocoles de saturation détaillés en Figure 29.

Pour une même concentration de solution mère appliquée (0,41 ± 0,04 µg.L^{-1}), la perte de l'argent sous forme $AgNO_3$ est beaucoup plus importante que celle des nAg de 60nm. Pour les nanoparticules, 48h de saturation correspondant au test B avec un renouvellement tous les deux jours a permis d'obtenir une pression moyenne de contamination en argent de 0,31 ± 0,03 µg.L^{-1}. Le test B est donc celui qui a permis de se rapprocher le plus de la concentration voulue de 0,50 µg.L^{-1}. Malgré tout, un phénomène de dissolution ou d'adsorption sur la verrerie et les plastiques semble encore avoir lieu. Pour l'argent dissous sous forme $AgNO_3$, sa disparition quasi complète dans la colonne d'eau laisse encore à supposer qu'un processus ici non identifié entre en jeu.

Etant donné que pour le milieu de contamination, l'eau qui a été utilisée (eau de la Méholle) possède une forte conductivité (545 µS.cm^{-1}) et donc une quantité importante d'ions ; La question de la formation de chlorure d'argent par l'argent dissous peut se poser. En effet, en présence de lumière, les ions Cl^- et Ag^+ pourraient entrainer une réaction d'oxydo-réduction et former un précipité : le chlorure d'argent. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons réalisé une troisième expérience d'adsorption basée sur l'effet potentiel de la luminosité (Figure 31).

III.1.3. Luminosité

Pour cette expérimentation et en tenant compte des résultats précédents (choix du matériau et du protocole de saturation), seul le paramètre luminosité a été modifié afin de voir s'il avait une influence sur le comportement de l'$AgNO_3$ et des nAg de 60 nm. La totalité des expériences précédentes s'est déroulée en lumière directe sous une luminosité de 416.18 ± 47.37 Lux. Ici, la luminosité a été occultée d'un facteur 10 pour une partie des dispositifs expérimentaux (39.06±2.58 Lux) et les autres ont été laissés sous la luminosité initiale (441.47±55.69 Lux).

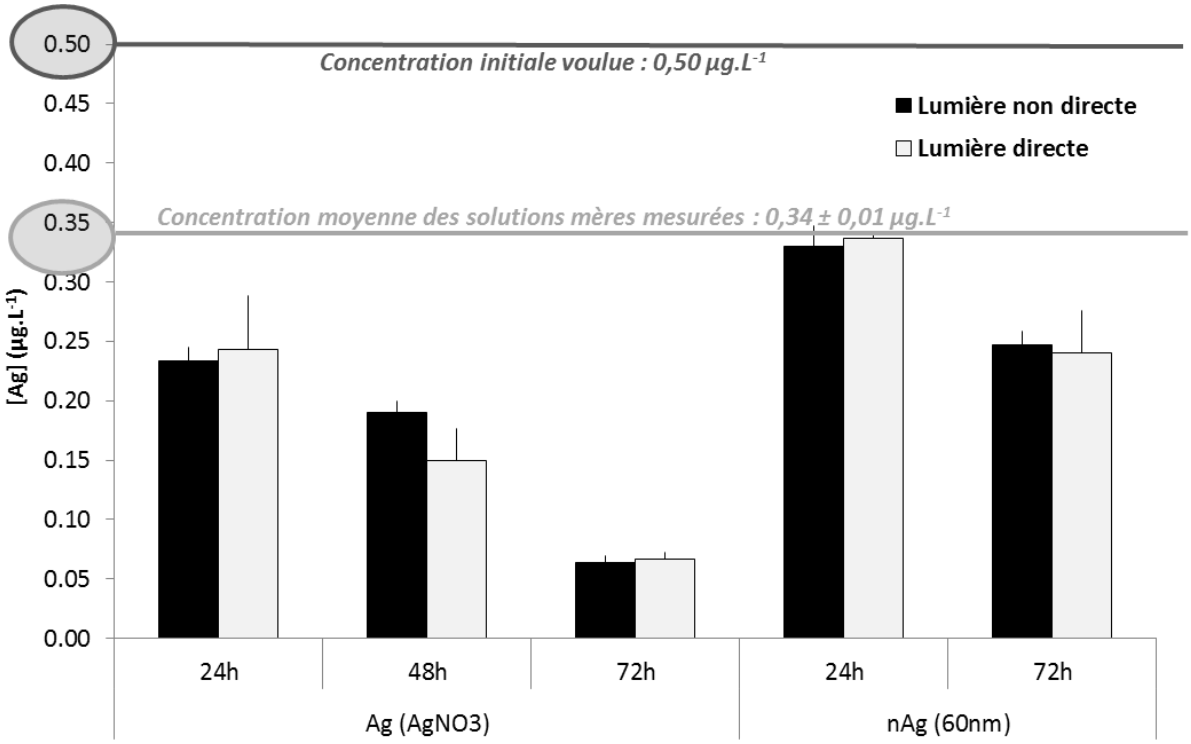


Figure 31 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24, 48 et 72h de contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre soumis à une lumière indirecte ou directe.

Les résultats n'ont pas montré de différence entre les conditions en pleine lumière et celles occultées. Les concentrations en argent dissous et nanoparticulaire (60nm) sont donc similaires à celles présentées plus haut. La luminosité appliquée ne semble donc pas responsable de la perte importante d'argent en fonction du temps de contamination. Toutefois, il semblerait qu'une lumière indirecte limiterait les risques de transformation photochimiques et donc les risques d'une photoréaction des nanoparticules

(Nowack et al., 2012). Le protocole utilisant une lumière indirecte a été conservé puisque c'est celui le plus adaptée aux gammares qui ont un comportement lucifuge.

III.1.4. Test à l'eau déminéralisée

Une autre hypothèse quant à la disparition de l'argent dans les milieux était que des phénomènes physicochimiques pourraient impacter la qualité des dosages en spectrométrie d'absorption atomique (SAA, dosages effectués par P. Rousselle). En effet tous les tests précédents ont été réalisés avec de l'eau issue de la rivière la Méholle. Cette eau, au préalable filtrée, pourrait de par sa composition propre, induire un biais dans les dosages d'argent. Pour cela, une expérience regroupant l'ensemble des paramètres établis plus haut a été menée dans de l'eau déminéralisée et des prélèvements ont été effectués après 24 et 72h d'une contamination à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticule de 60nm (Figure 32).

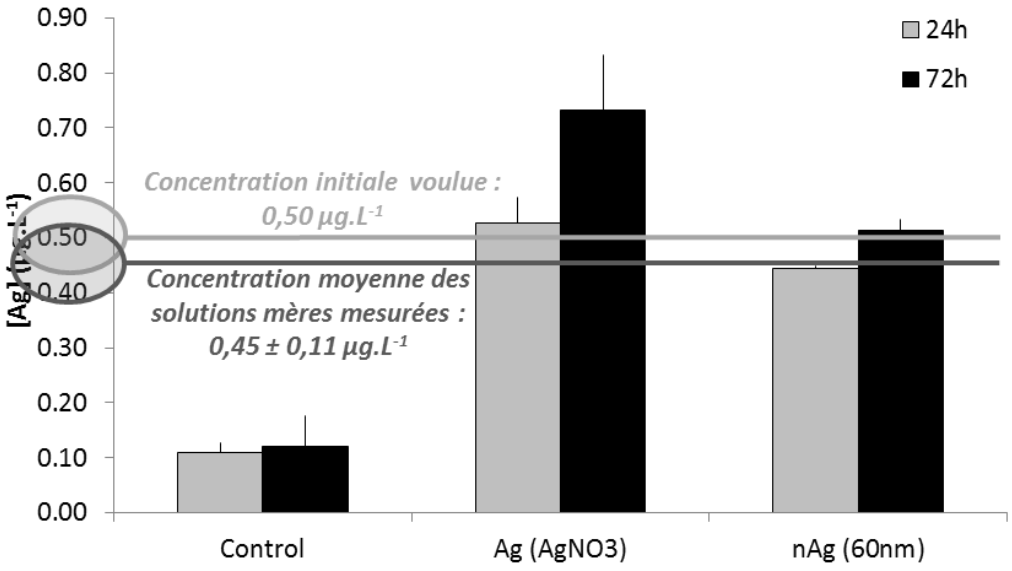


Figure 32 : Concentrations moyennes (± écart types) en argent mesurées dans les solutions mères et dans les milieux après 24h et 72h de contamination d'une eau déminéralisée à 0,5 µg.L^{-1} de nitrate d'argent et de nanoparticules d'argent de 60 nm de diamètre.

Cette fois-ci, nous observons une moyenne des concentrations des solutions mères très proche de celles voulues de 0,5 µg.L^{-1}. Concernant les concentrations retrouvées dans le milieu après 24h et 72h, elles restent de l'ordre de cette concentration appliquée que ce soit pour le nitrate d'argent ou les nAg. Cependant, nous notons un pic d'argent après 24h d'une contamination au $AgNO_3$ qui pourrait être dû à un phénomène d'évaporation de milieu qui de ce fait entrainerait une surconcentration dans le volume

de milieu restant. Dans tous les cas, si dans les expériences menées avec de l'eau de la Méholle, nous observions des diminutions de 20 à 80% de l'argent dans nos milieux, ce phénomène est bien dû à l'usage d'une eau naturelle prélevée en rivière puisqu'il n'est plus observable lorsque ces mêmes tests sont reproduits avec de l'eau déminéralisée. L'hypothèse serait alors qu'une adsorption de l'argent dissous sur la matière organique présente dans les milieux (malgré leur acidification avant dosage), empêcherait sa bonne détection et donc son dosage précis en SAA. Un test de sonication des milieux composés d'eau de la Méholle n'a toutefois pas permis de s'affranchir de ce biais de dosage.

III.1.5. Dissolution des nanoparticules

Comme expliqué dans le chapitre 1, paragraphe I.2.4.4., les nanoparticules peuvent relarguer de l'argent ionique par dissolution oxydative (Liu and Hurt, 2010). Cet argent dissous pourrait alors participer à l'écart de concentration mesuré entre les solutions mères et les milieux comme expliqué ci-dessus. Cette expérience a eu pour objectif de déterminer pour chacune des conditions comportant des nanoparticules, les concentrations en argent total et en argent dissous après 24h et 72h d'exposition en conservant les protocoles classiques de contamination décrits plus haut. Cette fois-ci deux tailles de nanoparticules sphériques : 10 et 60nm ont été testées aux concentrations de 0,5 et 5µg.L^{-1} dans de l'eau de la Méholle filtrée. Les échantillons d'argent dissous ont été obtenus en utilisant des tubes de centrifugation Amicon®(Dutscher, France) possédant une membrane de 3KDa capable de séparer la fraction dissoute d'une solution de nanoparticule d'argent après une centrifugation de 5000g pendant 1h (selon les conseils du fournisseur). L'argent dissous présent dans le filtrat a ensuite été acidifié à 1% (HNO_3) et dosé en spectrométrie d'absorption atomique SAA.

Les résultats de l'expérience visant à évaluer le pourcentage d'argent dissous issu d'une contamination en nanoparticules d'argent d'un milieu ne contenant ni feuilles, ni gammares, sont exposés dans le tableau 6. Une dissolution des nanoparticules a été détectée uniquement pour la plus forte concentration d'exposition (5 µg L^{-1}) et la plus faible taille de nanoparticule (10 nm de diamètre). Une baisse significative (test-T, p-value =0.003) a été observée entre les deux temps de prélèvement. Pour les autres conditions, les quantités en argent dissous mesurées étaient inférieures aux limites de détection du SAA (0.1 µg L^{-1}).

Tableau 6 : *Moyennes des concentrations (± écart-types) mesurées en argent total et dissous (n=3) dans l'eau (sans organisme ni feuille) après 24h et 72h d'une exposition aux nAg (10 nm et 60 nm de diamètre). LD : limite de détection de l'instrument (0.1 µg.L^{-1}).*

Taille des nanoparticules		Témoin	nAg 60nm		nAg 10nm	
[Ag] appliquée		0 µg L-1	0,5 µg L-1	5 µg L-1	0,5 µg L-1	5 µg L-1
[Ag] après 24h	total (µg L-1)	<LD	0,25 ± 0,01	2,4 ± 0,2	0,2 ± 0,02	3 ± 0,06
	dissous (µg L-1)	<LD	<LD	<LD	<LD	0,5 ± 0,07
	dissolution (%)	<LD	0	0	0	15,8
[Ag] après 72h	total (µg L-1)	<LD	0,13 ± 0,01	2 ± 0,06	0,11 ± 0,01	1,1 ± 0,1
	dissous (µg L-1)	<LD	<LD	<LD	<LD	0,1 ± 0,07
	dissolution (%)	<LD	0	0	0	10

Les plus petites tailles de nAg leur confèrent des relations surface/volume plus importantes permettant un relargage plus rapide d'ions Ag^+ (Hoheisel et al., 2012). C'est le cas dans cette étude où seule la plus petite taille de nanoparticule entraine un relargage d'argent dissous. Même si différents paramètres (température, pH et matière organique) peuvent influer sur la vitesse de dissolution, ce processus reste toutefois assez lent, et la forme nanoparticulaire de l'argent peut alors persister suffisamment longtemps dans le milieu aquatique et devenir biodisponible pour les organismes aquatiques (Liu et al., 2014). La dissolution des nAg peut toutefois expliquer une certaine part de la toxicité (Griffitt et al., 2008). Les résultats de ce test peuvent suggérer que des effets dus à une concentration de 5µg.L^{-1} en nAg de 10nm de diamètre pourraient être dus à cette dissolution (Cf. tableau 4 : 10 % de dissolution pour 5 µg.L^{-1} de nAg 10nm) uniquement s'ils sont statistiquement similaires à ceux observés pour 0.5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$.

III.2. Bilan d'optimisation de la contamination en microcosme

Le tableau 7 représente le bilan des différents paramètres fixés et testés pour maîtriser au mieux le comportement des nanoparticules dans les dispositifs expérimentaux. Ils ont permis d'assurer une pression de contamination reproductible entre les différentes études en microcosmes.

<u>Tableau 7:</u> Bilan des paramètres fixés et testés dans les diverses études d'optimisation de la contamination en contamination.

	Paramètres	Protocole standard appliqué dans les microcosmes
Paramètres fixés	**Température d'exposition**	de 12 à 16°C
	Volume de milieu	de 100 mL à 400 mL
	Temps d'exposition	de 24h à 72h sans renouvellement
	Photopériode	16h de jour/ 8h de nuit
Paramètres testés	**Dispositifs de contamination**	Barquettes en polypropylène
	Protocole de saturation	48h de saturation des dispositifs et de la verrerie
	Luminosité	Lumière indirecte (39,1 ± 2,6 Lux)
	Type d'eau	Eau naturelle pouvant biaiser les mesures SAA, sonication inutile
	Dissolution des nanoparticules	A vérifier à chaque étude

IV. Expositions des organismes

Différentes expérimentations impliquant l'exposition de gammares ont été effectuées pour répondre à nos objectifs. Les expositions se sont déroulées dans des pièces thermostatées (de 12 à 16°C), sous une luminosité contrôlée et à une photopériode. Les milieux de contamination ont été préparés par dilution des solutions stocks de nanoparticules en suspension (achetées chez des distributeurs ou synthétisées par des laboratoires partenaires). Les milieux de contamination étaient soit de l'eau issue de la rivière La Méholle, soit de l'eau de Volvic (mésocosmes) et leurs concentrations en nanoparticules préalablement définies se sont échelonnées entre 0,5 $\mu g.L^{-1}$ et entre 1 $mg.L^{-1}$.

Pour les expositions en microcosmes seulement, une saturation de 48h des dispositifs et de la verrerie aux conditions de contamination voulues ont été appliquées. Enfin après les phases d'acclimatation et de conditionnement décrits dans le chapitre I.3., les gammares et les feuilles ont été exposés de 72 h à 3 semaines. Pour la grande majorité des études, les pressions de contamination du milieu d'exposition et les concentrations retrouvées dans les gammares et les feuilles ont été mesurées en AAS ou ICP-MS. A la fin des expérimentations et en fonction des paramètres mesurés, les gammares et les feuilles étaient directement utilisés pour les analyses ou congelés au -80°C. L'ensemble des paramètres mesurés et les récapitulatifs des expériences effectuées en microcosmes et en mésocosmes sont regroupés dans les tableaux 8 et 9.

*Tableau 8 : Bilan des expériences effectuées et des marqueurs mesurés en contamination simples en microcosmes, **V** signifie que le paramètre a été mesuré alors que **X** signifie que le marqueur n'a pas été étudié.*

Types de contamination		**Contaminations en microcosmes (Chapitre 3)**			
Numéro d'expérience		**Expérience 1 (A)**	**Expérience 1 (B)**	**Expérience 2**	**Expérience 3**
Titre de l'étude		**Effets des nAg sur le genre *Gammarus* (Amphipoda) du niveau cellulaire au niveau fonctionnel**	**Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda).**	**Effet des nanoparticules d'argent sur 3 populations de gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli***	**Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology of Gammarus roeseli**
Sites de prélèvement	**Eau**	rivière : La Méholle	rivière : La Méholle	rivière : La Méholle	rivière : La Méholle
	Gammares (espèce)	*G. fossarum, G. pulex, G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*
	Feuilles (essence)	*Alnus glutinosa* (Vosges)	*Alnus glutinosa* (Vosges)	*Alnus glutinosa* (Vosges)	*Alnus glutinosa* (Toulouse)
Préparation avant expérimentations	**Eau**	Filtration 1,2 µm (filtre en microfibre de verre)	Filtration 1,2 µm (filtre en microfibre de verre)	Filtration 1,2 µm (filtre en microfibre de verre)	Filtration 1,2 µm (filtre en microfibre de verre)
	Gammares	Acclimatation (10 jours)	Acclimatation (10 jours)	Acclimatation (7 jours)	Acclimatation (9 jours)
	Feuilles	Conditionnement dans la Méholle (10jours)	Conditionnement dans la Méholle (10jours)	Conditionnement dans la Méholle (9jours)	Conditionnement dans la Méholle (12jours)
Design expérimental	**Types de nanoparticules**	nAg sphériques, enrobées citrate (Sigma-Aldrich)	nAg sphériques, enrobées citrate (Sigma-Aldrich)	nAg sphériques, enrobées citrate (Sigma-Aldrich)	nAg sphériques, enrobées citrate (Nanocomposix)
	Tailles	10 et 60 nm	10 et 60 nm	10 et 60 nm	10, 20, 40, 60 et 100 nm
	Contrôle positif	$AgNO_3$	$AgNO_3$	$AgNO_3$	Non
	Concentration d'exposition	0 ; 0,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$	0 ; 0,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$	0 ; 0,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$	0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$
	Temps d'exposition	72h	72h	72h	72h
	Volume d'exposition	400 mL	400 mL	400 mL	300 mL
	Quantité de feuilles	8 disques de 16 mm	8 disques de 16 mm	8 disques de 16 mm	4 disques de 16 mm

	Quantité de gammares	20 mâles	20 mâles	16 indifférenciés	10 mâles
	Nombre de réplicats	3	3	3	4
Caractérisation des nanoparticules	**Distribution de taille**	V	V	V	V
	Mesure de dissolution	test en amont	test en amont	V	V
Control de la pression de contamination	**Mesures des concentrations des S.mères**	V	V	V *(non dosé)*	V
	Mesures des concentrations en cours/ en fin d'expérience	V	V	V *(non dosé)*	V
	Concentration dans/sur les feuilles	V	V	V *(non dosé)*	V
	Concentration dans/sur les gammares	V	V	V *(non dosé)*	V
Marqueurs mesurés dans les feuilles	**Décomposition de la litière par les micro-organismes**	V	V	V	X
	Production de FPOM	V	V	V	X
Marqueurs mesurés dans les gammares	**Mortalité**	V	V	V	V
	Batterie de biomarqueurs	X	X	V	V *(energétique)*
	MXR	V	V	X	X
	Osmolalité	V	V	X	X
	Consommation d'oxygène	X	X	X	V
	Ventilation	V	V	X	V
	Locomotion	V	V	X	V
	Consommation de feuilles	V	V	V	V
	Production de FPOM	V	V	V	V

*Tableau 9 : Bilan des expériences effectuées et des marqueurs mesurés en contamination simples en microcosmes, **V** signifie que le paramètre a été mesuré alors que **X** signifie que le marqueur n'a pas été étudié.*

Types de contamination		**Contaminations en test plurispécifique et en mésocosmes (Chapitre 4)**			
Numéro d'expérience		**Expérience 4**	**Expérience 5**	**Expérience 6**	**Expérience 7**
Titre de l'étude		**Etude des effets des nTiO2 sur les gammares (*G. roeseli*) en fonction de leur hétéroagrégation dans deux types d'eau du Rhône naturellement chargées en matières organiques**	**Effets de deux types de nAg (plate et sphérique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli***	**Effets de deux types de $nTiO_2$ (anatase bâtonnet et anatase cubique) sur l'espèce *G. roeseli***	**Effets de deux types de NTC (avec ou sans matière organique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli***
Sites de prélèvement	**Eau**	rivières Rhône, sites Jons et Arles	Volvic	Volvic	Volvic
	Gammares (espèce)	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*
	Feuilles (essence)	-	*Alnus glutinosa* (Vosges)	*Alnus glutinosa* (Vosges)	*Alnus glutinosa* (Toulouse)
Préparation avant expérimentations	**Eau**	Filtration	Supplémentée (6.8 $mg.L^{-1}$ of CaCl2 2H2O)	Supplémentée (6.8 $mg.L^{-1}$ of CaCl2 2H2O)	Supplémentée (6.8 $mg.L^{-1}$ of CaCl2 2H2O)
	Gammares	Acclimatation (1 jours)	Acclimatation (6 jours)	Acclimatation (6 jours)	Acclimatation (6 jours)
	Feuilles	-	Conditionnement dans les mésocosmes (2 jours)	Conditionnement dans les mésocosmes (2jours)	Conditionnement dans les mésocosmes (2jours)
Design expérimental	**Types de nanoparticules**	$nTiO_2$ anatase	nAg sphérique et plate	$nTiO_2$ cubique et en bâtonnet	NTC
	Tailles	5-30nm	20-26nm	20 à 25 nm - 10 et 200nm	-
	Contrôle positif	-	-	-	-
	Concentration d'exposition	0 ; 0,1 et 1 $mg.L^{-1}$	50 $\mu g.L^{-1}$ en fin d'expérience	1 $mg.L^{-1}$ en fin d'expérience	1 $mg.L^{-1}$ en fin d'expérience
	Temps d'exposition	24 et 96 h	7, 14 et 21 jours	7, 14 et 21 jours	7, 14 et 21 jours
	Volume d'exposition	1,5 L	56 L	57 L	58 L
	Quantité de feuilles	-	6 g de feuilles entières sans pétioles	6 g de feuilles entières sans pétioles	6 g de feuilles entières sans pétioles

	Quantité de gammares	60 indifférenciés	150 (50 par temps)	150 (50 par temps)	150 (50 par temps)
	Nombre de réplicats	3 pseudo-réplicats	3	3	3
Caractérisation des nanoparticules	Distribution de taille	dans Labille et al., 2015	V	-	-
	Mesure de dissolution	X	V	V	V
Control de la pression de contamination	Mesures des concentrations des S.mères	X	X	X	X
	Mesures des concentrations en cours/ en fin d'expérience	V	V	V	V
	Concentration dans/sur les feuilles	X	V	V (non dosé)	V (non dosé)
	Concentrationdans/sur les gammares	V (non dosé)	V	V (non dosé)	V (non dosé)
Marqueurs mesurés dans les feuilles	Décomposition de la litière par les micro-organismes	X	X	X	X
	Production de FPOM	X	X	X	X
Marqueurs mesurés dans les gammares	Mortalité	V	V	V	V
	Batterie de biomarqueurs	V	V	V	V
	MXR	X	V	V	V
	Osmolalité	X	V	V	V
	Consommation d'oxygène	X	X	X	X
	Ventilation	X	V	V	V
	Locomotion	X	V	V	V
	Consommation de feuilles	X	V	V	V
	Production de FPOM	X	X	X	X

V. Concentrations en argent dans les feuilles et les gammares

Au terme de chaque expérience de contamination, des pools de 3 à 5 gammares et de 1 à 5 disques de feuilles ont été prélevés puis rapidement séchés sur du papier absorbant avant d'être congelés à -80°C. Avant chaque mesure de concentration, les échantillons ont été séchés au froid par lyophilisation ou par passage à l'étuve à 105°C pendant 48h afin de peser leurs masses sèches. Certains échantillons ont été minéralisés entiers ou après un broyage de 2 x 30 secondes dans un broyeur à bille. Dans un premier temps, de l'acide nitrique (HNO_3, LGC Standards) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, Fisher scientific) ont été ajoutés aux échantillons pour permettre leur digestion. Puis la minéralisation a été effectuée avec un système de micro-onde (Anton Paar Multiwave Pro) programmant différents cycles de chauffe (200 et 110°C). Les minéralisats ont par la suite été dosés par ICP-MS (ICP-MS, PerkinElmer Elan DRCe) et les concentrations ont été exprimées en $\mu g.g^{-1}$. Dans certains cas, les teneurs ont été calculées en multipliant ces concentrations par les masses sèches des gammares ou feuilles.

VI. Mesures des biomarqueurs chez les gammares

VI.1. Mortalité

Tout au long des expériences, les organismes vivants ont été comptés et les morts retirés des dispositifs de contamination. Pour les expériences en mésocosmes, les organismes vivants ont été comptés seulement au moment de l'arrêt de manipulation ou lors des différentes dates de prélèvements. Les pourcentages de mortalité ont pu ainsi être évalués ainsi que les biomasses de gammares présentes dans les milieux. En effet pour chaque expérimentation, l'établissement d'une relation masse fraiche - masse sèche sur la base des valeurs obtenues pour 100 à 200 individus a été effectué. Pour cela, les masses fraiches puis sèches de pools de 100 à 200 organismes avaient été pesées.

VI.2. Biomarqueurs (sub)cellulaires

Les mesures des biomarqueurs ont été effectuées selon différentes méthodes et protocoles. Une grande majorité des résultats obtenus a été acquis grâce à des méthodes d'analyses colorimétriques effectuées à l'aide d'un automate Konelab 20-XTi (Thermo Scientific). Cet automate permet une approche multimarqueurs sur un même échantillon, en l'occurrence dans nos études, la mesure de 13

biomarqueurs sur un même pool de 3 à 5 gammares. Des protocoles pour les gammares ont été adaptés selon ceux déjà pré-établis par Garaud et al., 2015. Pour cela la préparation d'un homogénat s'avérait nécessaire.

VI.2.1. Préparation des homogénats

Des pools de 3 à 5 gammares entiers ont été lentement décongelés dans de la glace et séchés sur du papier absorbant. Leur masse fraiche a ensuite été pesée. Avant d'effectuer les analyses avec le Konelab, les gammares ont préalablement été broyés dans un tampon d'homogénéisation comme décrit dans les études de Garaud et al (2015) et Sroda and Cossu-Leguille (2010). Ce tampon d'homogénéisation était composé de 98% de tampon phosphate 50 mM à pH 7,6 supplémenté par 1% de Phenylmethylsulfonyl fluoride à 1mM (PMSF) et d'1% d'un mélange L-sérine borate à 1mM pour permettre d'inhiber les protéases (Garaud et al., 2015). Pour chaque échantillon, les volumes de ce tampon d'homogénéisation ont été adaptés aux masses fraiches des pools de gammares mesurées, soit 2 mL de tampon ajouté pour 500 mg d'organisme. Les organismes ont donc été broyés dans leur volume spécifique de tampon d'homogénéisation selon deux méthodes : manuelle ou par broyeur à bille. Pour la grande majorité des expérimentations, c'est la méthode manuelle qui a été employée. Pour cela, les organismes et le tampon ont été disposés dans un broyeur en verre. A l'aide du Potter en verre adapté, les organismes ont été broyés par pression entre les deux structures en verre et la totalité de l'homogénat récupéré à l'aide pipette Pasteur et placé dans un tube eppendorf.

Pour l'expérimentation n° 3, nous avons employé la méthode avec broyeur à bille. Les volumes de tampon d'homogénéisation associés à chaque échantillon ont été disposés directement dans les tubes eppendorf contenant les gammares. Deux billes préalablement nettoyées à l'éthanol y ont été rajoutées. Ces tubes ont été disposés à l'horizontal dans un broyeur à bille (Beadbeater, Retsch MM301). Cette machine permet le déplacement rapide des tubes de la gauche vers la droite, ce qui permet un broyage très rapide des échantillons par friction entre les deux billes d'acier. Un protocole de broyage testé en amont nous avait assuré que ce type de broyage était comparable à celui effectué manuellement. Pour cela, deux rounds de 30 secondes de broyage (fréquence de 30 coups/seconde) étaient intercalés par 30 secondes de repos dans la glace pour éviter une dégradation des échantillons causée par une surchauffe.

Ces homogénats ont par la suite été soumis à une centrifugation de 5 minutes à 500xg et à 4°C pour permettre une sédimentation de la cuticule difficilement broyable, puis 120 µL du surnageant de ce broyat ont été récupérés pour effectuer des mesures. Le broyat restant a été ensuite centrifugé durant 20 minutes à 4°C et 1000xg et le surnageant récupéré puis immédiatement re-centrifugé à 20 000xg

pendant 50 minutes à 4°C. Le surnageant finalement prélevé correspond à la fraction cytosolique utilisée pour effectuer les mesures des activités enzymatiques (Garaud et al., 2015).

VI.2.2. Biomarqueurs de défenses antioxydantes et antitoxiques

Les mesures des activités de la **Glutathion Péroxydase totale (GPxtot)**, **la Catalase (CAT)**, la **Glutathion-S-Transférase (GST)** et l'évaluation de la **Capacité Totale Antioxydante (TAC)** ont été effectuées sur les fractions cytosoliques alors que l'activité de la **Phosphatase Acide (ACP)** a été évaluée sur les broyats de gammares. La totalité de ces protocoles a été établi par Garaud et al. (2015) et décrits en détails dans son manuscrit et sont disponibles en annexe 3.

La mesure de **l'activité de transport MXR** des branchies des gammares a été effectuée à l'aide d'une méthode d'accumulation. L'accumulation d'un substrat, la Calcéine-AM hydrolysée en Calcéine fluorescente une fois internalisée dans la cellule a été mesurée en présence et en absence d'inhibiteurs des protéines MXR. Ces inhibiteurs empêchent le bon fonctionnement des transporteurs MXR et dans le cas présent, le rejet de la Calcéine hydrolysée et donc fluorescente à l'extérieur de la cellule. Par comparaison entre les mesures réalisées avec ou sans inhibiteurs, on peut ainsi estimer la part des échanges membranaires impliquant les transporteurs MXR (Luckenbach and Epel, 2008). Pour cela, pour chaque réplicat, 4 organismes vivants ont été incubés dans une solution de Calcein-AM 5µM (contenant 0.3% de Dimethyl Sulfoxide, DMSO) tandis que 4 autres ont été immergés dans la même solution mais contenant un mélange de deux inhibiteurs : la Reversin 205 à 5 µM ($C_{41}H_{58}N_4O_{12}$, Sigma-Aldrich) et des sels de sodium hydratés MK-571 à 15 µM ($C_{26}H_{26}ClN_2NaO_3S_2\cdot$, Sigma-Aldrich). Pour chaque condition, 4 gammares ont été plongés dans un milieu contrôle contenant 0.3% de DMSO. Après 2h d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les organismes (4/réplicat/milieu d'incubation) ont été disséqués sous une loupe binoculaire (Leica, Figure 33), afin de prélever les 5 paires de branchies antérieures (la 6ème paire postérieure n'est pas prélevée en raison de sa trop petite taille). Les 10 branchies prélevées sur les 4 individus du réplicat ont été poolés et congelées à -80°C dans 200 µl d'eau Cristalline. L'étape suivante a consisté à décongeler et broyer les branchies pendant 1 minute à l'aide d'un broyeur pour tube Eppendorf. Après une minute de sonication et 5 minutes de centrifugation à 5000g à 4°C, 100µl de surnageant ont été prélevés et disposés sur une plaque 96 puits à fond noir afin d'en mesurer la fluorescence (Excitation 495nm, Emission 515nm ; Spectrophotofluorimètre SAFAS Monaco Xenius). Ces mesures ont été rapportées aux concentrations en protéines mesurées dans ces mêmes surnageants (20 µl) au spectrophotomètre en utilisant la méthode Bradford (1976 ; Kit Biorad). Enfin, l'activité de transport MXR a été calculée pour chaque traitement comme la moyenne de toutes les différences des

résultats obtenus pour l'accumulation de calceine en présence et en absence des inhibiteurs. Ainsi pour 3 réplicats, 9 valeurs était générées puis moyennées.

Figure 33 : Dissection des branchies de gammares (A : loupe binoculaire ; B : branchies). Sources : J. Andreï.

Les **métallothionéines (MT)** sont des protéines qui ont un rôle de séquestration des métaux (Hamer, 1986). Elles sont par ailleurs synthétisées en surnombre lors d'une contamination métallique et c'est pour cela qu'elles sont couramment étudiées comme biomarqueurs en écotoxicologie (Amiard et al., 2006). Pour la plupart des expérimentations menées impliquant des gammares, des pools de 3 organismes ont été prélevés puis immédiatement congelés à -80°C pour pouvoir par la suite effectuer des mesures de quantité de ces MTs. Ces échantillons seront traités ultérieurement dans un laboratoire partenaire.

VI.2.3. Biomarqueurs de dommage cellulaire

Les mesures de concentration des **hydropéroxydes lipidiques (LOOH)** ont été effectuées via l'automate Konelab sur le broyat de gammares d'après la méthode de Garaud et al. (2015) adaptée de celle de Arab and Steghens (2004). L'activité de l'**enzyme caspase (CSP-3)** a été mesurée quant à elle sur la fraction cytosolique (Garaud et al., 2015).

VI.2.4. Biomarqueurs de réserves énergétiques

Les quantifications des **protéines**, **triglycérides** et **cholestérol** ont été réalisées sur les broyats des organismes grâce à des réactifs élaborés spécifiquement par Thermo Scientific pour des analyses au Konelab (Garaud et al., 2015). Les mesures d'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) ont également été effectuées à partir de réactifs fournis par Thermo scientific sur la fraction cytosolique. L'activité mitochondriale du **système de transport d'électrons (ETS**) a quant à elle été mesurée sur les broyats, selon le protocole de Garaud et al. (2015) adapté à partir de ceux de De Coen and Janssen, 1997; Owens and King, 1975) et sont disponible en annexe 3.

VI.3. Biomarqueurs physiologiques

VI.3.1. Mesure de l'osmolalité

Selon la méthode décrite par Felten et al. (2008), une goutte de quelques nanolitres d'hémolymphe (20 nl) est récupérée à l'aide d'un microcapillaire de 5 µl modifié (étendu à chaud) après avoir percé, à l'aide d'une aiguille, la cuticule du gammare au niveau du peiriomère en face dorsale. Cette goutte d'hémolymphe est rapidement transférée dans un des 6 puits du nano-osmomètre (Otago Osmometers Ltd, Dunedin, New Zeala) qui contient de l'huile minérale à haute viscosité permettant d'éviter l'évaporation de l'hémolymphe. Une fois les 6 puits remplis, dont un avec de l'eau ultrapure (0 $mOsm.Kg^{-1}$) et un autre avec un standard à 290 $mOsm.Kg^{-1}$ permettant l'étalonnage de l'appareil, l'osmolalité de l'hémolymphe de l'organisme testé est évaluée. L'osmolalité représente schématiquement la quantité de substances osmotiquement actives (Na^+, Cl^-, AA, …), donc qui ont la capacité de retenir/attirer l'eau. La mesure s'effectue après avoir congelé la goutte d'hémolymphe *via* un système à effet pelletier. La température de décongélation de l'hémolymphe, identifié visuellement sous loupe binoculaire, permettra *via* l'étalonnage préalable d'en déduire l'osmolalité.

VI.3.2. Mesures de la consommation d'oxygène (dosages effectués par J. Bouquerel)

Des mesures de consommation d'oxygène par les organismes ont été effectuées pour la seule expérimentation n° 3. Pour cela, nous avons utilisé le *Microrespiration System* d'Unisens (Unisense A/S, Aarhus, Denmark) qui permet une mesure précise de l'O_2 dans des microvolumes. A l'issue de l'exposition, les gammares ont été doucement prélevés à l'aide d'un carré de tissu fine maille (500 µm) puis délicatement disposés dans une enceinte respirométrique spécifique de 2mL (Figure 34) remplie d'eau de la Méholle non contaminée et préalablement saturée en oxygène. La mesure de consommation

d'O_2 a été effectuée simultanément durant 20 minutes sur deux microcuves équipées chacune d'une microélectrode et contenant chacune 1 organisme. L'enregistrement en continu des données s'effectue via une interface informatique qui permet également de visualiser en direct les courbes de consommation (Figure 34). Les taux de consommation d'O_2 sont ensuite calculés à partir de régressions linéaires effectuées sur des portions de courbe régulière.

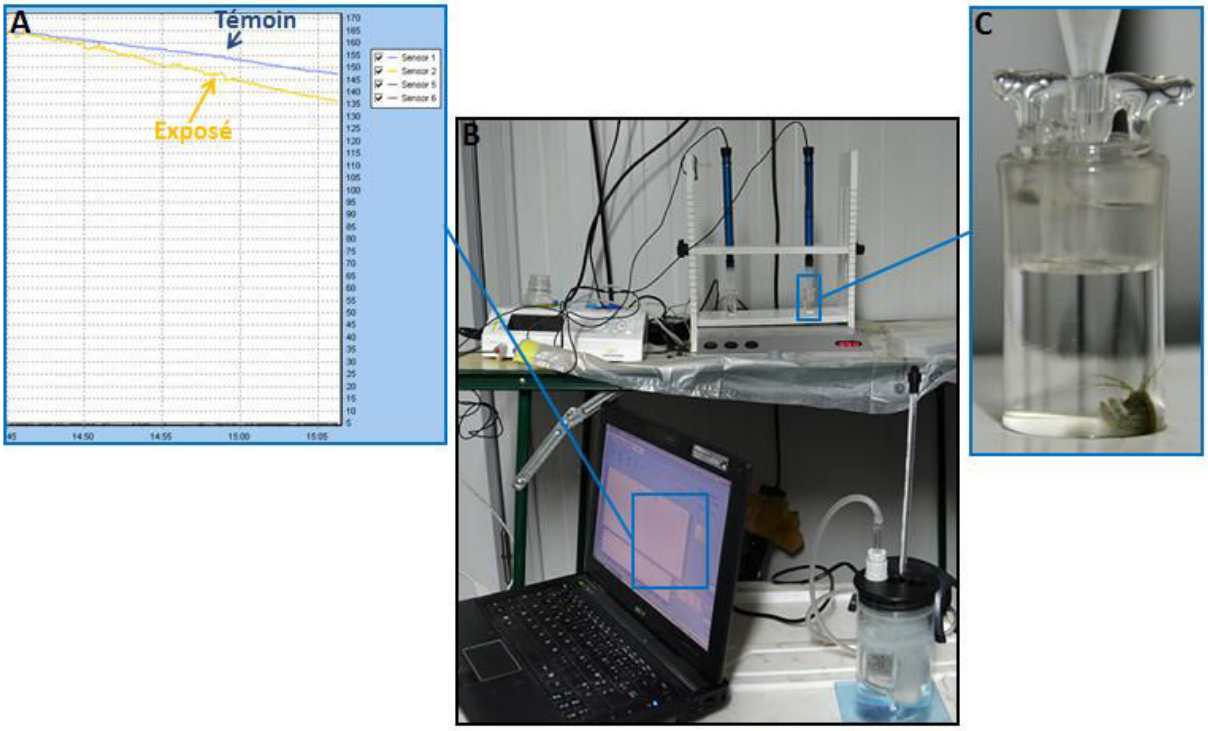


Figure 34 : Photos des mesures de consommation d'oxygène montrant le graphique en direct de perte d'oxygène du milieu (A) ; le système général du respiromètre (B) enceinte dans laquelle la mesure d'oxygène s'effectue (C). Sources : J. Andreï

VI.4. Biomarqueurs comportementaux (dosages partiellement effectués par V. Felten)

VI.4.1. Ventilation

La mesure de la ventilation se base sur la fréquence de battement des pléopodes du gammare d'après la méthode de Felten et al. (2008) adaptée de celle de Hervant et al. (1997). Les gammares (auparavant utilisés pour des mesures de locomotion, paragraphe VI.8.2) ont été transférés dans un puit de 2ml d'une microplaque de 24 puits (Figure 35). Après 30 secondes d'acclimatation, les battements des

pléopodes ont été comptés visuellement pendant 10 secondes quand l'organisme restait statique. Pour chaque organisme, la mesure a été répétée trois fois. Au sein de chaque expérience, les mesures ont été effectuées exactement au même endroit et dans les mêmes conditions de luminosité. La ventilation a été mesurée selon le même protocole mais les données ont été acquises de deux façons différentes. Ce comptage a soit été effectué directement lors de l'arrêt de manipulation, soit effectué *a posteriori* via des vidéos enregistrées à la fin de l'expérience.

VI.4.2. Locomotion

Après exposition, 8 à 10 gammares ont été prélevés à l'aide d'un morceau de tissu fine maille (500 µm) dans les différents réplicats d'une même condition. Ils ont été disposés dans un bécher contenant un carré de fine maille ainsi que 250 mL du milieu d'exposition contaminé ou non. L'activité de locomotion a été évaluée visuellement en comptant toutes les 2 secondes le nombre de gammares en mouvement et en répétant cette opération une quarantaine de fois. Ces mesures ont été effectuées après 5 minutes d'acclimatation. Au sein de chaque expérience, les mesures se sont déroulées exactement au même endroit et dans les mêmes conditions de luminosité. L'activité de locomotion a elle aussi été mesurée à chaque fois selon le même protocole mais les données ont été acquises de deux façons différentes. Ce comptage a été effectué directement lors de l'arrêt de manip ou *a posteriori* via des vidéos enregistrées à la fin de l'expérience

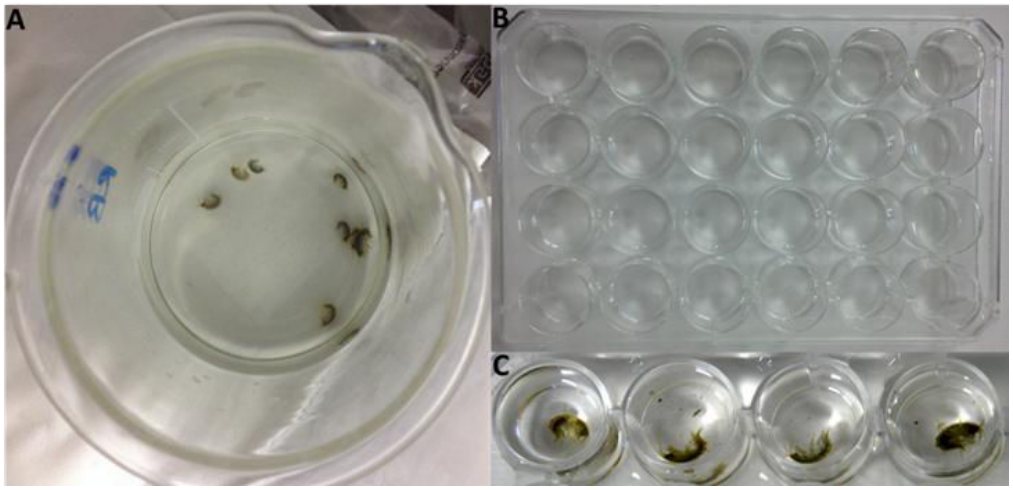


Figure 35 : Photos des dispositifs de mesure de locomotion (A) et de ventilation des gammares (B). Sources : J. Andreï

VI.5. Mesures des marqueurs fonctionnels chez le gammare

VI.5.1. Mesure de la consommation des gammares

Après chaque exposition, les disques de feuilles (microcosmes) ou les feuilles entières (mésocosmes) ont été récupérés, partiellement séchés par un contact rapide sur du papier absorbant puis congelés à -80°C. Par la suite, ils ont été séchés soit au froid par lyophilisation soit à l'étuve (105°C, 48h). Leurs masses sèches ont ensuite immédiatement été pesées. La quantité de feuille consommée par les gammares, exprimée en µg de masse sèche de feuille consommée/mg de masse sèche de gammare/jour, a ensuite été calculée via l'équation 1.

Equation 1 :

$$\text{Consommation des gammares} = \frac{MS_{feuille,\ initiale} - MS_{feuille,\ final} - (\%MP \times MS_{feuille,\ initiale})}{MS_{gammares} \times t}$$

$MS_{feuille,\ initiale}$ correspondant à la masse sèche des feuilles pesée avant le début de l'expérimentation ; $MS_{feuille,\ final}$ correspondant à la masse sèche des feuilles pesée après plusieurs jours d'exposition aux gammares ; %MP correspondant au pourcentage de masse sèche perdue par lessivage dans l'eau et due à l'activité des micro-organismes ; $MS_{gammares}$ correspondant à la masse sèche des gammares moyennée sur toute la durée de l'expérimentation en tenant compte des taux de mortalité et t correspondant au temps d'exposition.

VI.5.2. Production de FPOM par les gammares

A l'issue de l'expérimentation l'eau des milieux d'exposition, vides d'organismes et de feuilles a été filtrée sous vide soit au travers d'un filtre en nitrate de cellulose (47 mm de diamètre , 0.45 µm de porosité, Sartorious, Labomoderne) soit au travers d'un filtre en fibre de verre lorsque des mesures de carbone organique dissous étaient prévues (47 mm de diamètre, 0.7 µm de porosité, Labomoderne ou Whatman™). Avant chaque filtration, les différents types de filtres ont été rincés à l'eau ultrapure puis séchés 24h à 85°C et pesés. Après filtration les filtres chargés ont été remis à sécher durant 24h à 85°C. La production de FPOM par les gammares a ensuite été calculée selon l'équation 2 et exprimée en µg de masse sèche de FPOM produite/mg de masse sèche de gammare/jour.

Equation 2 :

$$\text{Production de FPOM par les gammares} = \frac{MS_{filtre,final} - DM_{filtre,initiale} - (\%FPOM_{micro\text{-}organismes} \times MS_{feuille,initiale})}{MS_{gammares} \times t}$$

$MS_{filtre,\ final}$ correspondant à la masse sèche des filtres chargés pesés après filtration ; $MS_{filtre,\ initiale}$ correspondant à la masse sèche des filtres rincés pesés avant la filtration ; $\%FPOM_{micro\text{-}organismes}$ correspondant au pourcentage de FPOM induit par le lessivage ou produit par l'activité des micro-organismes ; $MS_{feuille,\ initiale}$ correspondant à la masse sèche des feuilles pesée avant le début de l'expérimentation ; $MS_{gammares}$ correspondant à la masse sèche des gammares moyennée sur toute la durée de l'expérimentation en tenant compte des taux de mortalité et t correspondant au temps d'exposition.

VI.5.3. Différence entre consommation des gammares et production de FPOM

Les différences entre les masses sèches de feuilles consommées et les masses sèches de FPOM produites par les organismes ont été calculées pour chaque réplicat et exprimé en µg de masse sèche/ mg de masse sèche de gammare/ jour.

VII. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R 3.1.0 (R Development Core Team, 2014). Pour chaque expérimentation les tests statistiques ont brièvement été cités dans un encart du rappel du plan expérimental, puis ces derniers ont été rappelé lors de l'étude de chaque graphique. Cependant, une démarche statistique plus spécifique a été développée notamment pour effectuer des analyses discriminantes. Elle est donc développé ici.

Les expérimentations en microcosmes et mésocosmes se sont attachées à mettre en évidence des effets sur les gammares d'une exposition à différentes nanoparticules. Le design expérimental combinait ainsi une composante relative aux conditions d'exposition (des conditions témoins et contaminées). Les paramètres biologiques ont été mesurés sur plusieurs tailles de nAg (microcosme) ou à trois pas de temps (mésocosmes : 7, 14 et 21 jours). Pour les études en mésocosmes, cet effet temps se superpose à un effet dose, puisque les nanoparticules ont été injectées régulièrement tout au long de l'expérimentation. Il s'agissait donc dans un premier temps d'évaluer la contribution de l'effet "nanoparticules" et de l'effet "temps et/taille" sur les réponses biologiques.

Dans toutes les études, ces réponses biologiques étaient elles-mêmes d'une grande diversité, avec la plupart du temps plus d'une dizaine de paramètres mesurés. Les changements biologiques conséquents à l'exposition aux nanoparticules sont ténus, et un paramètre considéré isolément ne peut que rarement être suffisant pour comprendre et évaluer le risque écotoxicologique. C'est pourquoi les batteries de biomarqueurs doivent être considérées comme un tout, une réponse biologique multivariée dont il faut intégrer toute la diversité et toute la complexité à l'étape de l'analyse de données. Chaque paramètre biologique peut alors être considéré comme une ligne d'évidence de l'écotoxicité des nanoparticules, la combinaison de ces lignes d'évidence permettant d'établir un diagnostic.

Le problème peut donc se poser en ces termes : évaluer les conséquences de plusieurs pressions (variables explicatives) sur un ensemble de réponses biologiques (réponse multivariée). De ce fait, deux étapes d'analyse sont nécessaires.

- Identification des réponses biologiques les plus structurantes

L'outil statistique vers lequel nous nous sommes tournés pour identifier les réponses biologiques qui différaient entre les conditions d'exposition (témoin et contaminés), avec une matrice quantitative et une variable indépendante qualitative, est l'analyse discriminante linéaire (LDA pour Linear Discriminant Analysis). Cette méthode est une extension du modèle linéaire. La contrainte imposée au modèle est

l'appartenance a priori des échantillons à l'une des conditions, et la LDA construit des fonctions linéaires à l'aide des réponses biologiques permettant le meilleur classement des individus.

Le premier modèle construit inclus toutes les variables mesurées, et abouti en général à un très faible taux d'erreur de classement. Toutefois, l'objectif est ici de définir la batterie minimale de paramètre à mesurer pour parvenir à identifier une exposition aux nanoparticules. Une deuxième étape consiste donc en l'élimination pas à pas de variables, cette élimination obéissant à deux règles : (i) le taux d'erreur doit rester proche du taux d'erreur du modèle initial et (ii) le nombre final de variables doit être inférieur ou égal au nombre d'individus par groupe.

Une fois le modèle final établi, des tests de conformité aux conditions d'application de la LDA sont réalisés (distribution multinormale et homogénéité des variances multivariées). La significativité du modèle (c'est-à-dire la capacité des biomarqueurs à opérer une discrimination efficace des conditions d'exposition) est évaluée à l'aide d'un test MANOVA (Multivariate Analyse of Variance). Une fois l'ensemble de ces conditions validées, le modèle peut être analysé, en s'intéressant notamment aux coefficients standardisés des variables biologiques, qui permettent de hiérarchiser leur poids dans le pouvoir discriminant du modèle (plus la valeur absolue du coefficient standardisé est élevé, plus la variable à un poids important), et donc de mieux comprendre les modifications biologiques induites par l'exposition aux nanoparticules. Enfin, les différences entre les groupes considérés 2 à 2 peuvent être étudiées à l'aide du test T^2 de Hotelling (extension du test t pour une réponse multivariée). Cela peut être particulièrement intéressant dans le cas où les LDA n'aboutissent pas à des modèles significatifs, pour explorer plus finement les différences entre groupes.

- Recherche des facteurs structurants, et des interactions temps x nano

Comme nous l'avons écrit plus haut, le design expérimental combine des effets exposition et temps. Il est donc important, sur le modèle final produit par la LDA, de tester ces deux effets et leur interaction. Concrètement, il s'agit ici de partitionner la variance de la matrice de réponses biologiques sélectionnées par la LDA en réalisant une analyse des redondances (Redundancy Analysis) uniquement pour les mésocosmes.

La figure 36 permet de schématiser le principe de la méthode : la part « a » correspond à l'effet de l'exposition aux nanoparticules, sachant qu'il existe un effet temps. La part « b » est l'effet temps, sachant qu'il y a un effet nanoparticules, et la part « c » est l'interaction entre les 2 variables explicatives.

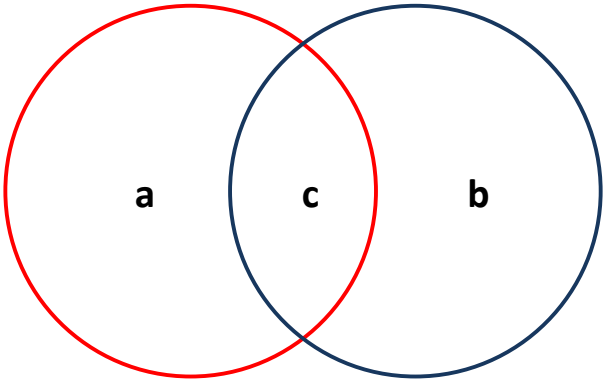


Figure 36 : Principe de partitionnement de la variance par une analyse des redondances.

Les parts a+c et b+c représentent donc la totalité de la variance expliquée par l'une ou l'autre variable explicative. L'enjeu ici, à la suite de la LDA qui se focalise sur l'effet "exposition" est de vérifier que la variable "temps" n'intervient pas de manière significative dans la variance de la matrice de réponses biologiques. Les variances a, b, a+c et b+c sont testées à l'aide d'une ANOVA.

S'il s'avère que le facteur temps ne peut être négligé, la LDA doit être reconstruite, en y incorporant de manière explicite cette information. Cette analyse n'est pas réalisée a priori (sur la matrice de réponses biologiques initiale) car notre objectif est bien d'essayer de mettre prioritairement en évidence l'effet des nanoparticules.

CHAPITRE 3

Effets des nAg sur le genre *Gammarus* (Amphipoda) du niveau cellulaire au niveau fonctionnel

Tout au long de leur cycle de vie, les nanoparticules peuvent être rejetées dans l'environnement et se retrouver dans les écosystèmes d'eau douce (chapitre 1). Les études décrites dans ce chapitre ont donc été élaborées avec l'objectif de se rapprocher au mieux de conditions réalistes sur le plan environnemental. Pour cela et comme décrit dans le chapitre 2, l'eau a directement été prélevée dans la rivière La Méholle, dans laquelle des feuilles d'aulne ont également été placées afin de permettre leur conditionnement, c'est-à-dire leur colonisation par des microorganismes. En effet dans toutes les études présentées ici, et toujours dans un souci de réalisme, les gammares ont été nourris et maintenus à des températures de 12°C sous une luminosité indirecte soumise à une photopériode.

Lors de la mise en place de ces premières expérimentations, la littérature était inexistante concernant les effets des nanoparticules sur les gammares. Des expériences portant sur les effets de l'argent sur les gammares de l'espèce *G. fossarum* avaient déjà été menées au sein de notre laboratoire (Arce Funck, 2014), c'est pourquoi il nous a semblé intéressant de commencer par une étude ciblée sur les nAg. Toujours dans le souci de s'approcher de conditions réalistes, de très faibles concentrations d'exposition ont été choisies en anticipant et respectant les limites de détection imposées par les appareils de mesure. Dans ces études les concentrations étudiées se sont situées entre 0,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$.

Les études se sont intéressées à des variabilités inter et intraspécifiques et ont d'étudié ces effets à différents niveaux : cellulaires, individuels et fonctionnels afin d'observer un pattern plus complet de réponses. Ce genre d'étude reste rare chez les gammares qui possèdent pourtant un rôle fonctionnel important dans les écosystèmes d'eau douce.

I. Effets des nanoparticules d'argent sur 3 espèces de gammares : *G. fossarum*, *G. pulex*, *G. roeseli* des niveaux cellulaire à fonctionnel – *Expérience 1(A)*

Contexte

Concernant les nAg, les estimations de PEC les plus récentes établissent des concentrations prédictibles dans les eaux de surface de l'ordre du ng.L^{-1} (Sun et al., 2014), mais il n'est pas exclu que ces concentrations soient revues à la hausse dans les années à venir étant donnée l'utilisation croissante des nanomatériaux à base de nAg. L'étude de l'évaluation des effets des nAg sur les gammares semble alors primordiale puisqu'ils occupent une place clé dans le fonctionnement et l'équilibre des écosystèmes d'eau douce. De plus, comme pour beaucoup d'invertébrés aquatiques, le métal argent est très toxique pour les gammares. Il peut notamment affecter leur physiologie et leur comportement, même à de très faibles concentrations (Arce Funck et al., 2013).

L'objectif de cette expérience a été d'étudier indépendamment différents biomarqueurs situés à plusieurs niveaux d'organisation (cellulaire, physiologique, individuel) afin d'obtenir une première image des effets potentiels des nAg. Le niveau fonctionnel, a aussi été appréhendé afin d'adopter une approche plus écologique qui permet d'avoir une vision plus globale des risques que peuvent induire les nAg sur les écosystèmes d'eau douce.

Comme plusieurs espèces appartenant au genre *Gammarus sp.* peuplent les rivières et sont plus ou moins sensibles aux contaminants, un second objectif était également d'étudier et d'évaluer une variabilité interspécifiques face à une contamination au nAg qui pourrait suggérer des risques plus ou moins préoccupant pour l'écosystème en fonctions de l'espèce contaminée.

Mots clé : nanoparticules d'argent - *Gammarus sp.* - biomarqueurs - rôle fonctionnel - variabilité interspécifique

Rappels du plan expérimental

Dispositif expérimental : Trois espèces de gammares acclimatés à l'eau de la Méholle ont été exposées pendant 72h à deux concentrations (0,5 et 5 µg.L^{-1}) de deux formes d'argent (argent dissous issu du $AgNO_3$ et nAg sphériques de 60 nm enrobées au citrate). Des conditions témoins non contaminées (0 µg.L^{-1}) ont été étudiées pour chacune des espèces (Figure 37). Chaque microcosme était composé de 20 gammares mâles et de 8 disques de feuilles d'aulne conditionnées immergés dans 400 mL d'eau de la Méholle. En parallèle et pour les mêmes conditions de contamination et d'expérimentation, des dispositifs contenant uniquement des feuilles ont servi de témoins pour les mesures de performance fonctionnelle.

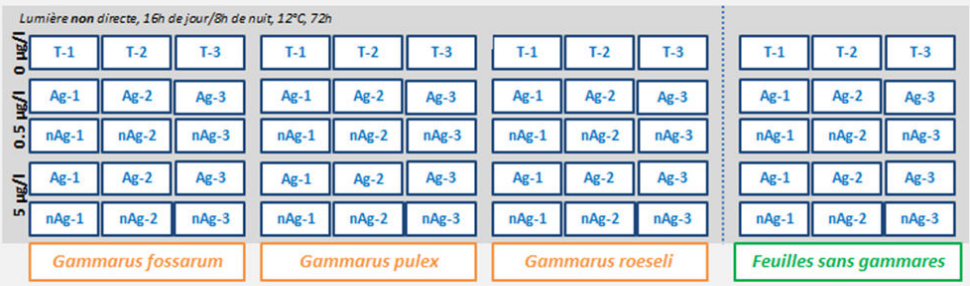


Figure 37 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 2 (Cf. Chapitre 2, tableau 8)

Mesures : Après avoir vérifié le diamètre des nAg (Cf. Chapitre 2, II.) ainsi qu'une absence de dissolution détectable des nAg dans l'eau de la Méholle dans les conditions d'expérimentation (Cf. Chapitre 2, III.1.5.), les concentrations en argent total ont été mesurées dans les solutions mères puis dans le milieu après 24h et 72h (SAA) ainsi que dans les feuilles et les gammares en fin d'expérience (ICP-MS). Des biomarqueurs ont été étudiés à plusieurs niveaux d'organisation : le niveau cellulaire avec l'activité de transport des protéines MXR dans les branchies, la physiologie des organismes via les mesures d'osmolalité de l'hémolymphe, le niveau individuel par l'étude de la ventilation et de la locomotion des organismes et enfin, le niveau fonctionnel avec leur activité de consommation et de production de FPOM.

Traitements statistiques : Pour les figures (39,40, 43, 44) étudiant les effets de l'exposition sur les 3 espèces de gammares, une anova à deux facteurs a été effectuée et suivie de tests post-hoc TukeyHSD (lettres en majuscule). Puis, pour les 3 conditions témoins, une anova à un facteur et un test TukeyHSD ont permis de comparer les niveaux de bases entre les 3 espèces. Enfin, pour pouvoir étudier plus en détail les effets des 5 conditions d'exposition dans chaque espèce, 3 anovas à un facteur (une par espèce) ont été effectuées suivi de tests post-hoc TukeyHSD afin de comparer deux à deux chacune des conditions (lettrines en minuscule). Ce traitement statistique permettait aussi une meilleur lisibilité des

figures. Lorsque cela s'est avéré nécessaire (Figures 41,42), une anova non paramétrique Kruskall-Wallis a été effectuée suivie de tests *post-hoc* de comparaisons multiples selon le même protocole.

I.1. Résultats

II.1.1. Concentrations en argent dans l'eau, les feuilles et les gammares

Le tableau 10 présente les concentrations en argent total mesurées dans les solutions d'exposition avant le lancement du test (S.mère) et après 24h et 72h. L'eau de la Méholle n'est pas naturellement chargée en argent puisque les témoins se situent en dessous des limites de détection de l'appareil.

Tableau 10 : Moyennes (± écart-types) des concentrations en argent total mesurées dans les solutions mères avant le lancement des tests et après 24h et 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. (<LD : sous la limite de détection de l'instrument : 0.1µg.L^{-1}).

		[Ag] µg.L^{-1}		
Concentrations	**Conditions**	**S.mère**	**24h**	**72h**
0 µg.L^{-1}	**Témoin**	< LD	< LD	< LD
0,5 µg.L^{-1}	**Ag ($AgNO_3$)**	0,17 ± 0,11	0,12 ± 0,06	0,14 ± 0,07
	nAg 60nm	0,21 ± 0,07	0,19 ± 0,11	0,20 ± 0,06
5 µg.L^{-1}	**Ag ($AgNO_3$)**	4,86 ± 0,20	1,32 ± 0,59	2,01 ± 0,61
	nAg 60nm	4,77 ± 0,20	4,55 ± 0,31	4,06 ± 0,37

Les concentrations en argent total mesurées dans les feuilles d'aulne en présence ou absence de gammares après 72h d'exposition sont présentées dans la figure 38. Les résultats de l'anova à deux facteurs n'ont pas mis en évidence d'interaction entre la présence de gammares et la contamination des feuilles en argent (Tableau 11A). Par contre les tests post-hoc TukeyHSD ont montré des concentrations en argent plus élevées par rapport aux conditions témoins uniquement pour les feuilles exposées à 5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ en présence et en absence de gammares ainsi que celles exposées à 5 µg.L^{-1} de nAg 60 nm sans gammare. A cette même concentration d'exposition de 5 µg.L^{-1}, les feuilles en présence et absence de gammares exposées à l'$AgNO_3$ étaient significativement plus contaminées que leurs homologues exposées aux nAg 60 nm.

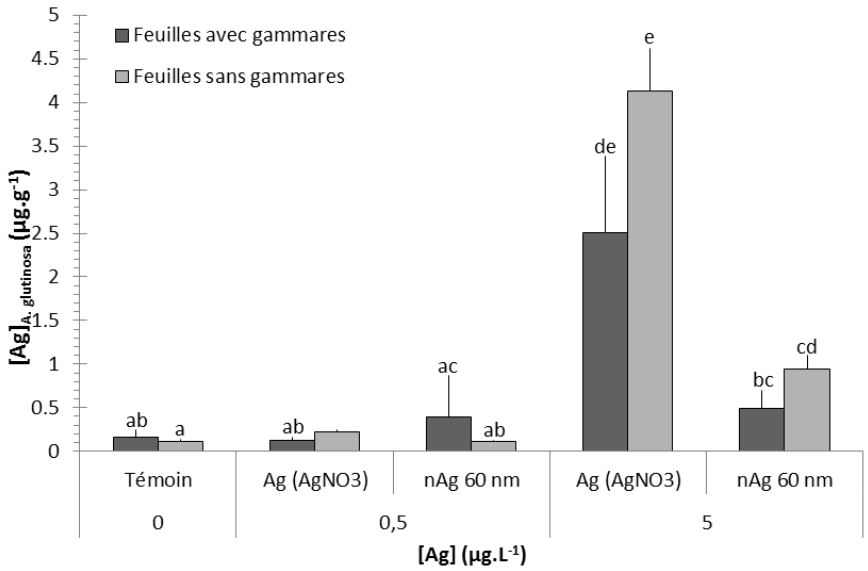


Figure 38 : *Moyennes (+ écart-types) des concentrations en argent total mesurées dans les feuilles d'aulne après 72h d'une exposition à l'$AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}, en présence ou en absence de gammares. Les groupes avec les mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents (test post-hoc TukeyHSD, n=3).*

Tableau 11 : Résultats des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl signifie degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives (p<0,05).

Mesures	Anova à 2 facteurs	Ddl	F-value	P-value
A Concentration en argent des feuilles	Contamination	4	43,85	**<0,001 *****
	Présence de gammares	1	0,85	0,367
	Contamination x Présence de gammares	4	2,47	0,077
B Concentration en argent des gammares	Contamination	4	234,87	**<0,001 *****
	Espece	2	105,05	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	4,5	**0,001 ****
C Mortalité	Contamination	4	1,43	0,246
	Espece	2	3,12	0,058
	Contamination x Espèce	8	0,46	0,873
D Activité MXR	Contamination	4	1,12	0,347
	Espece	2	22,11	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	1,63	0,121
E Locomotion	Contamination	4	96,78	**<0,001 *****
	Espece	2	242,16	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	14,66	**<0,001 *****
F Consommation	Contamination	4	0,2	0,934
	Espece	2	26,89	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	0,36	0,932
G Production de FPOM	Contamination	4	1,07	0,389
	Espece	2	49,8	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	0,99	0,46
H Différence : Consommation - Production de FPOM	Contamination	4	4,05	**0,010 ***
	Espece	2	11,93	**<0,001 *****
	Contamination x Espèce	8	2,1	0,07

L'anova à deux facteurs effectuée sur l'ensemble des valeurs a révélé la présence d'une interaction significative entre les espèces exposées et les contaminations appliquées (Tableau 11B). Pour les concentrations en argent total des gammares mesurées après 72h d'exposition (Figure 39), les résultats obtenus montrent que les niveaux de contamination en argent des gammares témoins sont statistiquement plus faibles chez G. roeseli que chez *G. fossarum* et *G. pulex* (ces statistiques ne sont pas représentées par des lettrines dans la figure). Puis, au sein de chacune des 3 espèces, les 5 conditions d'exposition ont entrainé des contaminations statistiquement différentes (témoin, Ag ($AgNO_3$) à 0,5 µg.L^{-1}, nAg 60nm à 0,5 µg.L^{-1}, Ag ($AgNO_3$) à 5 µg.L^{-1} et nAg 60nm à 5 µg.L^{-1}).

Chez *G. fossarum*, les organismes exposés à 5 µg.L^{-1} étaient significativement plus contaminés par la forme $AgNO_3$ que nAg et les deux possédaient des concentrations en argent statistiquement plus élevées que celles observées dans les autres conditions et notamment par rapport aux témoins avec des concentrations 11 et 2 fois plus fortes respectivement. Chez *G. pulex* le même pattern de contamination a été observé, avec des concentrations multipliées par 8 pour l'$AgNO_3$ et par 2 pour les nAg chez les organismes exposés à 5 µg.L^{-1}. Chez *G. roeseli*, l' exposition à 0,5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$, à 5µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ et à 5µg.L^{-1} de nAg a entrainé une contamination significativement plus forte que chez les témoins, avec un effet plus important de l'$AgNO_3$ à 5 µg.L^{-1} par rapport à 0,5 µg.L^{-1} ainsi que par rapport à la forme nAg à 5 µg.L^{-1}.

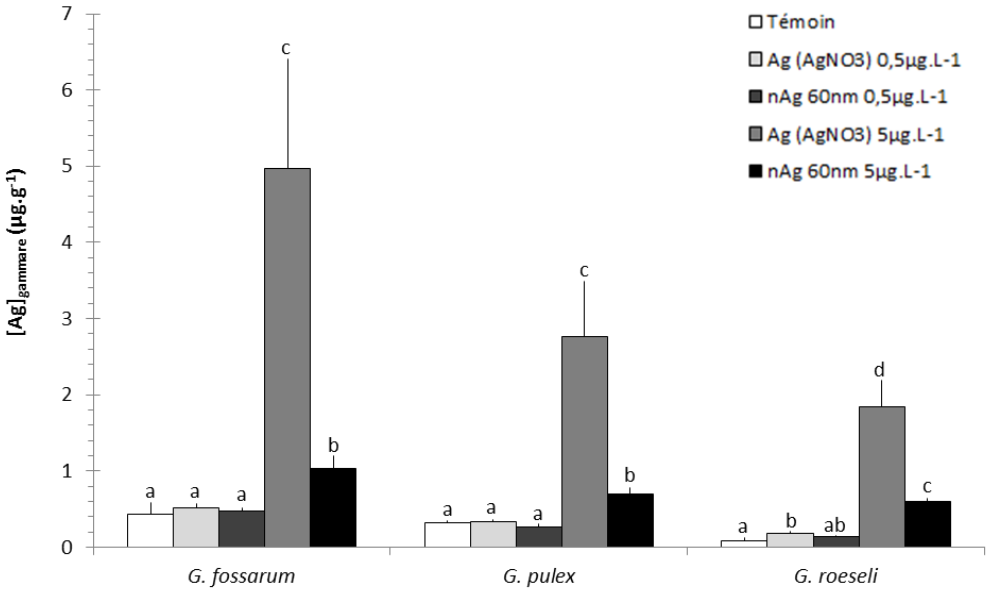


Figure 39 : Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Au sein de chaque espèce, les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

I.1.2. Réponse biologique des organismes

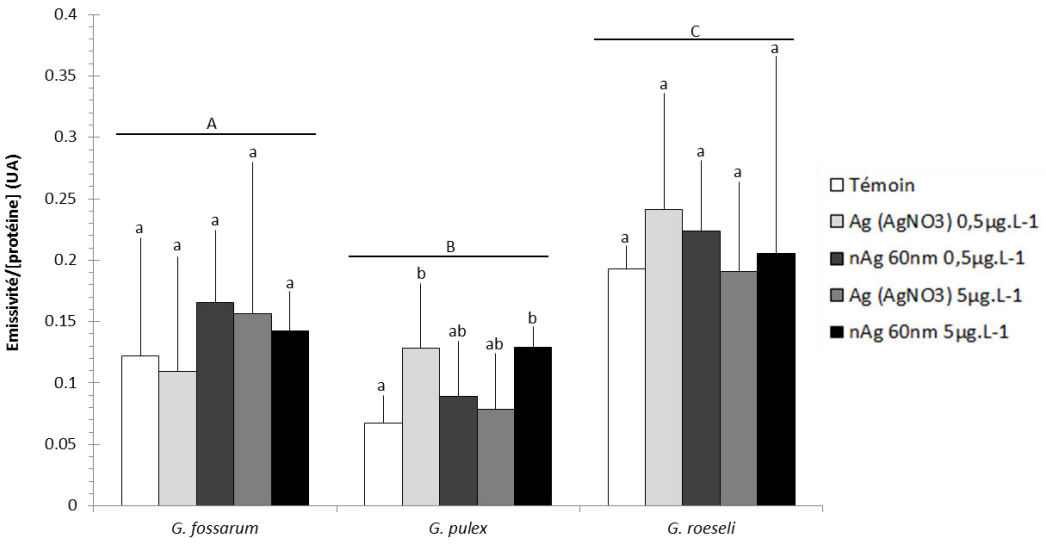
I.1.2.1. Mortalité

Après 72 h d'exposition, les pourcentages de mortalité se sont échelonnés de 2 à 15% en moyenne, et l'exposition à l'argent n'a pas engendré de mortalité statistiquement différente de celle enregistrée dans les conditions témoins (Tableau 11).

I.1.2.2. Niveau cellulaire : l'activité de transport MXR

Pour l'activité MXR (Figure 40), comme le montre le tableau 11, l'anova à deux facteurs n'a pas montré d'interaction entre les deux variables mais a fait ressortir des différences significatives entre les espèces indépendamment de la contamination en argent. Les mesures d'activité observées entre les 3 espèces ainsi que leurs niveaux de base mesurés chez les témoins, cohérents avec ceux obtenus chez les organismes au temps T0, ont montré des activités significativement plus faibles pour les *G. pulex*, intermédiaires pour les *G. fossarum* et plus élevées pour les *G. roeseli*.

Pour *G. fossarum* et *G. roeseli,* les anovas à 1 facteurs effectuées entre les 5 conditions de contamination n'ont pas montré de différences significatives contrairement à *G. pulex* (Anova à un facteur, ddl= 2, F-value=25,1 et p-value<0,001). En effet, les *G. pulex* exposés à 0,5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ et à 5 µg.L^{-1} de nAg présentaient des activités MXR statistiquement supérieures aux organismes des autres conditions.

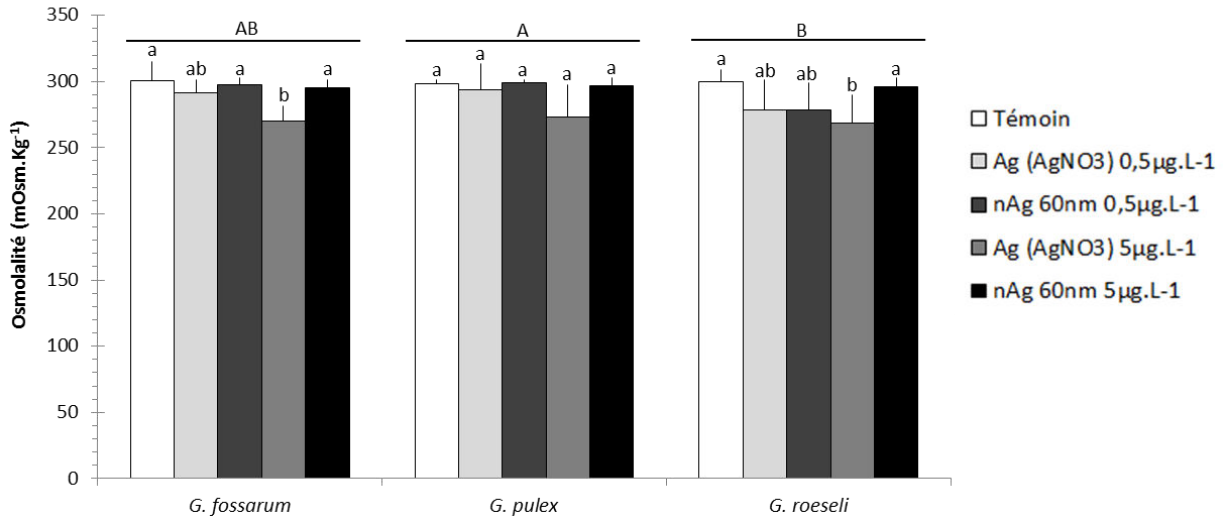


<u>Figure 40 :</u> Moyennes (+ écart-types) des activités de transport MXR (n=9, émissivité en unité arbitraire) mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations :

0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

I.1.2.3. Niveau physiologique : l'osmolalité

Pour les mesures de l'osmolalité (Figure 41), une anova non paramétrique de Kruskall-Wallis (ddl= 14, p-value<0,001) suivie de tests post-hoc de comparaisons multiples ont montré des différences significatives entre les conditions de contamination et entre les espèces *G. pulex* et G. *roeseli*. Alors que pour *G .pulex* les conditions de contamination ne sont pas différentes entres elles, pour *G. fossarum* et *G. roeseli* une exposition des gammares à 5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ a significativement diminué les valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe.

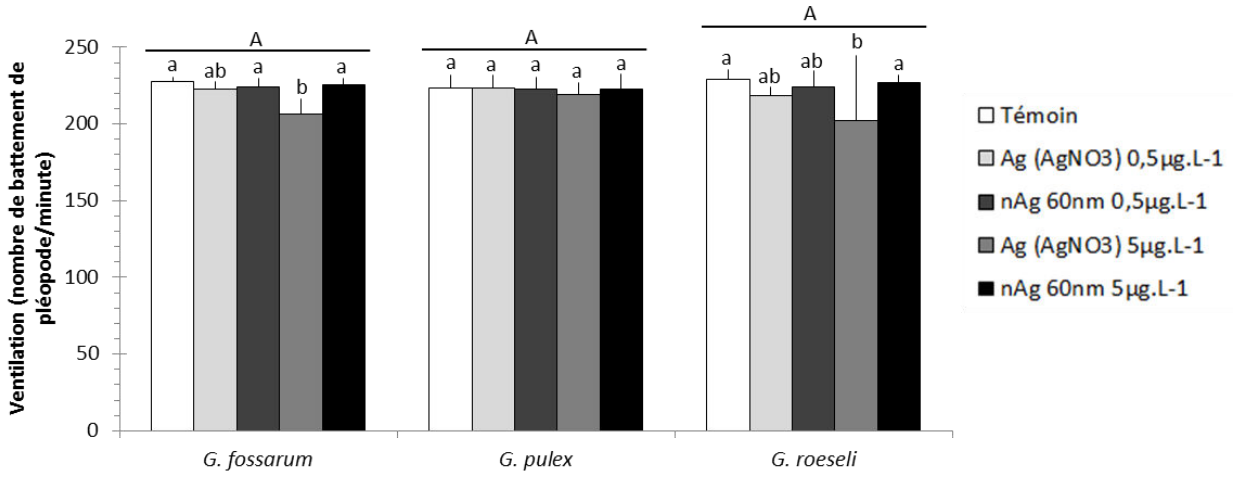


<u>Figure 41 :</u> Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

I.1.2.4. Les biomarqueurs de comportement

I.1.2.4.1. La ventilation

Les résultats des mesures de ventilation sont présentés dans la figure 42. Aucune différence statistique n'a été observée entre les 3 espèces (anova de Kruskall-wallis, ddl=2, p-value=0,955). En revanche, l'exposition a engendré des modifications de ventilation chez deux des trois espèces étudiées (anova de Kruskall-wallis, ddl=4, p-value<0,001). En effet, chez *G. fossarum* et *G. roeseli* l'exposition à 5 µg.L-1 d'$AgNO_3$ a induit une baisse significative des battements de pléopodes des gammares alors qu'aucune modification n'a été détectée chez *G. pulex*.



<u>Figure 42 :</u> Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

I.1.2.4.2. La locomotion

Une anova à 2 facteurs effectuée sur les valeurs de locomotion (Figure 43) a montré une interaction significative entre les variables de contamination et d'espèce (Tableau 11E) et une anova à un facteur a montré une homogénéité entre les 3 conditions témoins (Anova, ddl=2, F-value=1,45, p-value=0,238). Au sein des espèces *G. fossarum* et *G. pulex,* seule la plus forte concentration de 5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ a entrainé une baisse significative de la locomotion des gammares d'environ 20% par rapport aux témoins et aux autres conditions. Au contraire, pour l'espèce *G. roeseli* toutes les conditions de contamination en argent ont induit des baisses de locomotion. A 0,5 µg.L^{-1}, les deux formes d'argent ($AgNO_3$ et nAg) n'induisent pas de différence sur les valeurs de locomotion. Au contraire, ces locomotions deviennent différentes entre elles à 5 µg.L^{-1}.

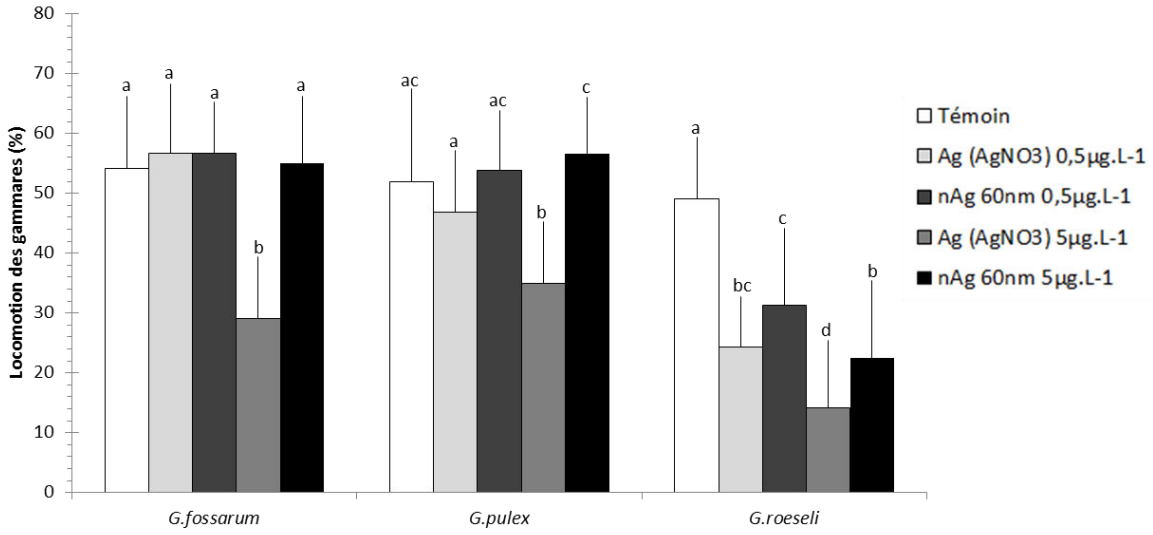


Figure 43 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Au sein de chaque espèce, les groupes de mêmes lettrines en minuscule ne sont pas statistiquement différents.

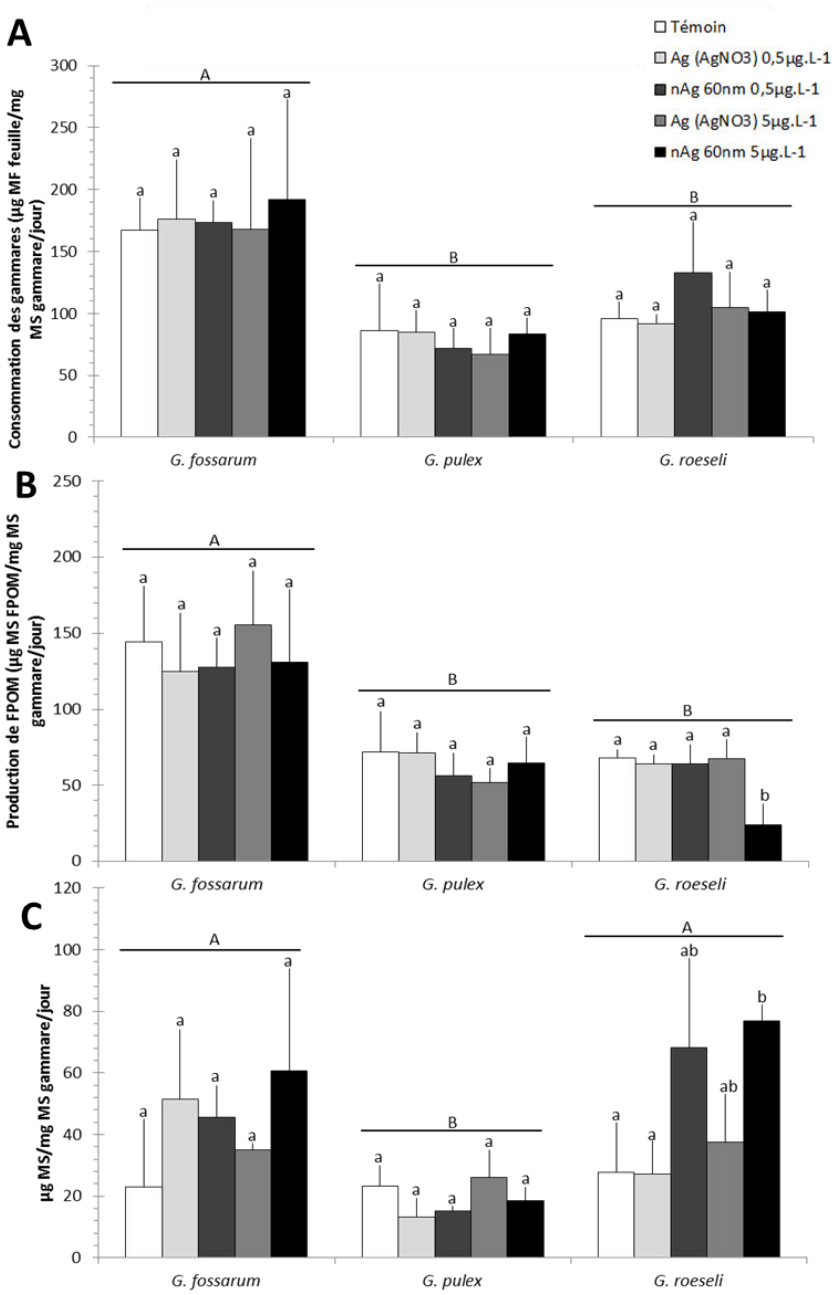
I.1.3. Réponses fonctionnelles

En focalisant dans un premier temps sur les résultats obtenus dans les lots témoins, on constate que l'activité de consommation des feuilles est sensiblement la même chez *G. pulex* et *G. roeseli*, alors qu'elle est presque deux fois plus élevée chez *G. fossarum* (Tableau 11). En revanche, quelle que soit l'espèce, cette activité de consommation des feuilles n'a pas été modifiée de manière significative suite à l'exposition aux deux formes d'argent.

Comme attendu, la production de FPOM est plus élevée chez *G. fossarum* que chez *G. pulex* et *G. roeseli* (Figure 44B). Alors que l'exposition à l'argent n'a engendré aucune modification significative chez *G. fossarum* et *G. pulex*, la production de FPOM chez G. roeseli a été significativement réduite à 5 µg.L^{-1} de nAg.

Les différences calculées entre les mesures de consommation des feuilles et de production de FPOM sont présentées dans la figure 44C. Bien que les valeurs de consommation et de production de FPOM dans les témoins uniquement soient différentes entre *G. fossarum* et le groupe *G. pulex* / *G. roeseli*, la différence entre ces deux activités donne une toute autre image puisque cette grandeur calculée est finalement similaire chez les trois espèces (Anova à un facteur, ddl=2, F-value=0,06 et p-value=0,938, résultat non présenté sur la figure).

Chez *G. pulex*, l'exposition n'engendre aucune modification significative de cette différence Consommation-Production de FPOM. Le constat est le même chez *G. fossarum*, même si on peut noter une variabilité plus importante des résultats. Enfin, chez *G. roeseli*, on retrouve l'effet déjà constaté à 5 µg.L^{-1} de nAg pour la production de FPOM, qui se traduit ici par une différence Consommation-Production de FPOM plus élevée.



<u>Figure 44 :</u> Moyennes (+ écart-types) des mesures de A : Consommation des feuilles d'aulne, B : Production de FPOM et C : Différence entre consommation de feuilles et production de FPOM par les 3 espèces de gammares après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg de 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule

informent des différences statistiques entre les 3 espèces, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une espèce. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

I.2. Discussion

I.2.1. Concentrations en argent dans l'eau, les feuilles et les gammares

Les concentrations en argent total mesurées dans l'eau tout au long de l'expérience ont montré un maintien de l'argent dans la colonne d'eau. Un test effectué en amont de cette expérience et dont les résultats sont présentés dans la section « Chapitre 2.III.1.5. Dissolution des nanoparticules » avait montré une absence de dissolution des nAg de 60 nm après 72h dans les mêmes conditions d'expérimentation. En effet, une température assez basse de 12°C, un pH de 8 ou encore la présence de matière organique dans l'eau d'expérimentation non oxygénée pendant le test, sont des conditions qui ont tendance à limiter la dissolution des nAg (Liu and Hurt, 2010). Si les autres phénomènes de transformation et dégradation des nAg n'ont pu être identifiés dans cette étude, les concentrations en argent total mesurées dans la colonne d'eau peuvent toutefois suggérer un taux de sédimentation assez faible.

L'exposition aux nAg à 5 $\mu g.L^{-1}$, engendre une augmentation des concentrations dans les feuilles et les gammares par rapport aux témoins respectifs. La concentration de départ dans l'eau est sensiblement la même pour l'$AgNO_3$ et les nAg, aux deux doses testées. Par contre la chute d'argent dans l'eau est beaucoup plus importante pour l'$AgNO_3$ que pour les nAg, ce qui est cohérent avec une contamination plus importante des feuilles et des gammares puisque l'$AgNO_3$ a systématiquement induit des concentrations plus élevées dans ces 2 composantes biologiques. Les phénomènes d'adsorption et/ou d'absorption des nAg semblent donc être différents de ceux de leur contrôle positif à l'$AgNO_3$.

L'étude comparative de la contamination des feuilles par l'argent sous forme nitrate ou nanoparticulaire, en présence ou non de gammares, montre une tendance à l'augmentation de la contamination des feuilles en absence de gammares pour la concentration d'exposition la plus forte. Même si elle n'est pas significative, cette tendance suggère que la présence de gammares puisse réduire la contamination des feuilles soit en offrant une surface d'adsorption/absorption supplémentaire, soit en limitant la contamination des feuilles par broutage du biofilm colonisant leur surface. Même si à l'heure actuelle les interactions fines liant le milieu d'exposition et les deux compartiments biologiques ne sont pas entièrement comprises, ces travaux ont permis de s'assurer que la contamination argentique

apportée sous forme nanoparticulaire restait accessible dans la colonne d'eau et se transférait sur les feuilles, rendant possible l'étude d'une contamination par voie directe, ainsi que par voie trophique.

Dans la littérature, même si certaines études se sont déjà intéressées à la contamination et à l'accumulation de d'argent dans différentes espèces de gammares telles que *G. fossarum* (Arce Funck et al., 2013) et *G. pulex* (Baudin and Garnier-Laplace, 1994), aucun travaux n'a encore été publié sur les gammares et les nAg. D'autres espèces ont toutefois déjà été étudiées et il a été montré par exemple que l'argent issu des nAg pouvait être accumulé dans les branchies, le foie et la vésicule biliaire de poissons (Gaiser et al., 2012; Griffitt et al., 2012), dans les branchies et glandes digestives de bivalves (Gomes et al., 2014) ou encore sous la carapace de daphnies (Asghari et al., 2012). De récentes études basées sur l'imagerie ont visualisé la présence de nAg à l'intérieur de cellules branchiales de poisson (Farkas et al., 2011a) ainsi que la présence de nAg dans la lumière intestinale des daphnies qui sembleraient passer à travers la barrière épithéliale (Georgantzopoulou et al., 2013). Le présent travail n'a pas cherché à déterminer la localisation de l'argent (bioaccumulé ou adsorbé) ni la forme sous laquelle il est en interaction avec les gammares (ionique ou nanoparticulaire). Les travaux cités précédemment laissent toutefois imaginer qu'une réelle contamination sous forme nanoparticulaire puisse être envisagée.

I.2.2. Réponses biologiques

I.2.2.1. Mortalité

Pour de faibles concentrations pouvant être jugées comme étant environnementalement réalistes, l'$AgNO_3$ et les nAg de 60nm de diamètre n'ont pas induit de mortalité des gammares au sein des 3 espèces. Pourtant, pour les mêmes gammes de concentrations en $AgNO_3$, Arce Funck et al. (2013) avaient raporté des $CL50_{72h}$ de 2,2 µg .L^{-1} chez *G. fossarum*. Il est maintenant largement admis que la toxicité de l'argent est hautement dépendante de la forme de l'argent et de la chimie de l'eau (Bury et al., 2002; Ratte, 1999). La forme ionique de l'argent (Ag^+) est très toxique pour les organismes d'eau douce mais sa complexation avec de la matière organique, des ions sulfures (S^{2-}) ou des ions chlorures (Cl^-) peut réduire cette toxicité (Bury et al., 2002; Hogstrand and Wood, 1998). Dans cette étude, une concentration non négligeable de l'agent complexant Cl^- dans l'eau de la Méholle pourrait expliquer la survie des organismes soumis à 5 µg.L^{-1} d'$AgNO_3$ ainsi que la différence de viabilité observée entre les gammares *G. fossarum* de notre étude et ceux de l'étude de Arce Funck et al. (2013) dans laquelle l'eau présentait des [Cl^-] cinq fois plus basses.

I.2.2.2. Niveau cellulaire : l'activité des transporteurs MXR

Les transporteurs MXR sont des pompes membranaires qui ont en charge l'expulsion des xénobiotiques à l'extérieur des cellules et appartiennent à la première ligne de défense contre les contaminants (Bard, 2000; Epel, 1998).

Les niveaux d'activité constitutive des transporteurs MXR peuvent varier selon les espèces et les populations qui sont, en fonction de la qualité des milieux dans lesquels elles vivent, soumises à plus ou moins de stress (Pain and Parant, 2003). Les organismes provenant de sites plus contaminés présentent alors un niveau basal d'activité MXR plus élevé que ceux provenant de sites dits plus propres (Smital et al., 2000). Ce postulat a pu être observé dans cette étude. En effet, même si les gammares des 3 espèces ont été acclimatés dans une même eau, une empreinte de leur condition de vie antérieure a pu être observable. Chez les organismes prélevés avant le test (résultats T0 non présenté) et chez les témoins, les niveaux de base de ces MXR étaient significativement différents entre les 3 espèces. Les espèces *G. fossarum* et *G. pulex* prélevés respectivement dans une rivière de tête de bassin de bonne qualité et une rivière de référence ont présenté des niveaux d'activité constitutifs, certes différents, mais entre 1,5 à 2,8 fois plus faibles que les activités mesurées pour les *G. roeseli,* prélevés quant à eux dans la Nied qui présente une eau d'une qualité passable. *G. pulex*, qui possède les niveaux d'activités les plus bas, est la seule espèce à répondre à la contamination métallique par une augmentation de son activité de défense antitoxique suite à l'exposition à l'$AgNO_3$ à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ ainsi qu'à 5 $\mu g.L^{-1}$ de nAg. L'induction de l'activité de transport MXR montre la détection par l'organisme de l'exposition à un xénobiotique et souligne la mise en place d'un processus de détoxication. Une induction de l'activité MXR a déjà plusieurs fois été rapportée dans la littérature suite à une contamination métallique chez des bivalves (Achard et al., 2004; Legeay et al., 2005). Concernant le contrôle positif $AgNO_3$, la réponse antitoxique présente seulement à la plus faible concentration est cohérente avec l'étude de Achard et al. (2004) qui ont rapporté l'existence de relation inverse entre dose d'exposition métallique (cadmium) et l'induction de protéines MXR chez *Corbicula fluminea* en expliquant une baisse d'activité du métabolisme de synthèse protéique aux plus fortes concentrations. L'utilisation de l'activité MXR, déjà considérée comme un biomarqueur efficace de pollution métallique chez les bivalves, pourrait également permettre l'étude de l'exposition aux nanoparticules métalliques. En revanche, des travaux complémentaires seront à mener afin de déterminer leur interaction possible avec le système de transport MXR. En effet, les seuls travaux ayant abordé ce point ont été réalisés chez des larves d'oursins (Anselmo et al., 2012) et chez le bivalve marin *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al., 2014) et ces travaux présentent des résultats contradictoires, les

premiers montrant une inhibition du transport MXR et les seconds rapportant au contraire une induction.

I.2.2.3. Niveau physiologique : l'osmolalité

L'osmolalité de l'hémolymphe est un biomarqueur physiologique permettant de révéler un état de stress chez les organismes, et notamment chez les crustacés, suite à une contamination du milieu (Issartel et al., 2010). Les valeurs de base mesurées dans cette étude pour les conditions témoins sont cohérentes avec la littérature qui avait déjà montré des valeurs homogènes (autour de 300 mOsmol) entre les différentes espèces de gammares utilisées dans le présent travail (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b; Issartel et al., 2010; Vellinger et al., 2012). L'exposition aux nAg n'a pas impacté l'osmolalité de l'hémolymphe alors que le control positif $AgNO_3$ à 5 $\mu g.L^{-1}$ a engendré une réduction significative chez *G. roeseli* et *G. fossarum*. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Arce Funck et al. (2013) et Mehennaoui et al. (*en préparation*) qui ont tous les deux évalué des baisses d'osmolalité chez *G. fossarum* exposés au $AgNO_3$ pour de très faibles concentrations de 0,5 $\mu g.L^{-1}$ après 96h et 1 $\mu g.L^{-1}$ après 72h d'expositions respectivement. De plus, Mehennaoui et al. (*en préparation)* a aussi mesuré une baisse suite à une contamination aux nAg de 23 nm à 3 $\mu g.L^{-1}$. Toutefois ces conditions d'exposition avaient également entrainé une dissolution des nanoparticules d'environ 30% pouvant laisser supposer que cet effet pourrait être dû à l'argent dissous plutôt qu'aux nAg. L'osmolalité est un indicateur physiologique pertinent permettant de détecter des modifications de régulation osmotique. En revanche, pour détecter des modifications plus subtiles, il serait intéressant de compléter par le dosage des ions Na^+ et Cl^- hémolymphatiques, qui sont connus pour réguler à 90% les valeurs d'osmolalité, masquant ainsi des variations plus subtiles de la régulation osmotique (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b).

I.2.2.4. Les biomarqueurs de comportement

I.2.2.4.1. La ventilation

L'activité de ventilation des organismes appartenant aux 3 espèces n'a pas été perturbée par l'exposition aux nAg à des concentrations environnementalement réalistes. Pourtant, et comme le montrent les niveaux d'activité de *G. fossarum* et *G. roeseli* à 5 µg.L-1, des baisses d'activité de ventilation suite à une contamination au $AgNO_3$ existent et ont d'ailleurs déjà été rapporté dans la littérature (Arce Funck et al., 2013). Certaines études ont déjà montré des effets des nAg entrainant l'épaississement des branchies de poissons ainsi qu'une réduction du transport de l'oxygène et donc un

effet potentiel sur la respiration des organismes (Bilberg et al., 2010; Griffitt et al., 2012). Des mesures complémentaires comme par exemple les taux de consommation en oxygène des gammares pourraient par exemple apporter plus d'informations.

I.2.2.4.2. La locomotion

Au niveau comportemental, il est largement admis que les métaux et notamment l'argent entrainent des perturbations sur l'activité de locomotion des gammares (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b; Gerhardt, 1996; Kunz et al., 2010; Vellinger et al., 2013). Dans cette étude, les trois espèces ont vu leur activité locomotrice réduite par une forte concentration en argent dissous, mais seule *G. roeseli* s'est avérée sensible aux nanoparticules, et ce dès 0,5 $\mu g.L^{-1}$. La baisse d'activité mesurée chez *G. roeseli* suite à l'exposition aux nAg est cohérente avec l'étude de Asghari et al. (2012) qui a montré des comportements de nage anormaux chez *Daphnia magna* suite à une exposition à 2 $\mu g.L^{-1}$ de nAg de 5 à 25 nm de diamètre. La réduction de l'activité locomotrice est un phénomène pouvant présenter des conséquences non négligeables, via l'augmentation de la dérive des organismes au gré des courants, qui les rend plus vulnérables à la prédation (Hughes, 1970; MacNeil et al., 1999; E. J. Taylor et al., 1994).
Au niveau comportemental, l'étude des biomarqueurs comme les activités de ventilation et de locomotion apporte une réponse rapide, non destructive et pour de très faibles niveaux de contamination (V. Felten et al., 2008b; Gerhardt, 1996).

I.2.3. Réponses fonctionnelles

L'activité de consommation des gammares et notamment l'activité de déchiquetage et de fragmentation de la matière organique entrainant une production de FPOM est un processus fonctionnel majeur dans les écosystèmes d'eau douce puisqu'il participe à l'incorporation de la matière organique dans le réseau trophique (Dangles and Guérold, 2001; Wallace and Webster, 1996).

Les résultats présentés ici ont montré des activités de consommation et de production de FPOM variables en fonction de l'espèce considérée. En revanche, aucun effet de l'exposition n'a été détecté en ce qui concerne la consommation, alors qu'une réduction de la production de FPOM a été enregistrée à 5 $\mu g.L^{-1}$ de nAg uniquement chez *G. roeseli*. En conséquence, la différence Consommation-Production de FPOM calculée s'est vue augmenter significativement par rapport au témoin. Un résultat du même ordre a déjà été observé par Zubrod et al. (2011) qui ont établi qu'une diminution de production de fèces sans baisse de consommation en amont pourrait être le résultat d'une plus forte assimilation par *G. fossarum* contaminé par un fongicide. Une perturbation des fonctions digestives entraînant cette baisse de

production de FPOM pourrait être une seconde explication puisque des études ont déjà fait état d'une altération de l'activité des enzymes digestives des gammares suite à une contamination métallique (Dedourge-Geffard et al., 2013, 2009). Quelle qu'en soit la raison, les mesures au niveau fonctionnel réalisées permettent d'entrevoir des effets dus à de faibles concentrations de nAg sur les performances fonctionnelles de *G. roeseli*. Ces organismes ont un rôle clé dans le bon fonctionnement des écosystèmes d'eau douce et une contamination aux nAg pourrait entrainer des effets indirects sur l'équilibre de l'écosystème.

I.2.4. Variabilité interspécifiques face à la contamination

Un objectif de cette étude était d'évaluer si les trois espèces de gammares répondaient de façon similaire à la contamination afin d'appréhender les effets engendrés par le relargage de nAg sur un écosystème aquatique en fonction de l'espèce présente dans la rivière.

D'un point de vue génétique, l'espèce *G. pulex* est plus proche de *G. fossarum* que de *G. roeseli* (Meyran et al., 1997). De plus, ces 3 espèces évoluent dans des milieux de qualités différentes ce qui pourrait suggérer que les organismes provenant des sites plus contaminés présentent des mécanismes de défense plus développés et une tolérance plus importante que ceux provenant de site de bonne qualité (Naylor et al., 1990). Pour l'activité MXR cela a déjà été démontré chez les invertébrés marins par Smital et al. (2000). C'est aussi ce qui a été observé dans cette étude où des représentants de l'espèce *G. roeseli* prélevés dans la rivière possédant la plus mauvaise qualité ont présenté les plus fortes activités MXR constitutives.

D'autres travaux se sont déjà intéressés à cette variabilité interspécifique pour le genre *Gammarus sp* en termes de sensibilité suite à une contamination. Adam et al. (2010) ont par exemple montré que des organismes adultes de l'espèce *G. fossarum* étaient environ deux fois plus sensibles à un insecticide (la deltaméthrine) que *G. pulex*. Boets et al. (2012) ont quant à eux montré que pour des contaminations au cadmium, les $CL50_{72h}$ respectives des *G. fossarum*, *G. pulex* et *G. roeseli* étaient de 51,7 $\mu g.L^{-1}$, 50,2 $\mu g.L^{-1}$ et 29,0 $\mu g.L^{-1}$. Ils expliquent que ce sont les espèces de gammares possédant les individus les plus grands qui sont les plus sensibles au cadmium. Dans notre étude, et en prenant en compte l'ensemble des marqueurs étudiés, aucune différence de réponse n'a été mise en évidence suite à la contamination à l'argent sous forme nitrate. En revanche, suite à l'exposition à l'argent sous forme nanoparticulaire, seuls les représentants de l'espèce *G. roeseli* ont été affectés sur le plan de l'activité locomotrice et des performances fonctionnelles étudiées. Comme l'avaient déjà souligné Boets et al. (2012), nos résultats

confirment que les individus les plus grands ont montré une sensibilité plus importante (masses sèches moyennes : *G. roeseli* : 9 ± 2 mg ; *G. pulex* : 7 ± 2 mg, *G. fossarum* : 4 ± 1 mg).

Conclusion

Pour de faibles concentrations, les nAg ont contaminé les disques de feuilles ainsi que les gammares des trois espèces par voie directe et/ou trophique, seulement pour la plus forte concentration testée de 5 $\mu g.L^{-1}$. Pour les biomarqueurs étudiés au niveau cellulaire (activité de transport MXR), physiologique (osmolalité de l'hémolymphe) et pour le biomarqueur comportemental de ventilation, les nAg n'ont pas engendré d'effet probant sur les 3 espèces de gammares malgré des niveaux d'activité de base parfois différents (activité de transport MXR). Au contraire la locomotion ainsi que la production de FPOM a montré l'existence d'effets dus à la contamination de l'argent sous forme nanoparticulaire et a également montré que ces effets n'étaient observables que pour l'espèce *G. roeseli* qui apparait alors comme étant la plus sensible face aux nAg. La perturbation de leurs performances fonctionnelles pourrait entraîner des modifications du fonctionnement du cycle de la matière organique dans les écosystèmes d'eau douce. Des études plus poussées sur cette espèce ont donc été envisagées pour pouvoir appréhender plus précisément les effets des nAg.

II. Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) – *Expérience 1(B)* – *Publication acceptée, Environmental Pollution*

Contexte

Une partie des résultats présentés précédemment pour *G.roeseli* a été sélectionnée et a fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, accepté dans le journal Environmental Pollution.

Lors des travaux visant à comparer les réponses chez les trois espèces de gammares, des expositions complémentaires à des nanoparticules d'argent de 10 nm ont été mises en place, uniquement dans le cas de *G. roeseli*. Ces résultats, associés à ceux obtenus pour la même espèce et présentés dans la partie I, sont décrits dans l'article. Le protocole et les mesures sont donc identiques à ceux déjà présentés.

Mots clé : *Gammarus roeseli* – nanoparticules d'argent - rôle fonctionnel - comportement

Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda).

Jennifer Andreï[1], Sandrine Pain-Devin[1], Vincent Felten[1], Simon Devin[1], Laure Giambérini[1,3], Kahina Mehennaoui[1,2], Sebastien Cambier[2], Arno C. Gutleb[2] and François Guérold[1].

[1] Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) - Université de Lorraine, UMR 7360 CNRS, UFR SciFA, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

[2] Environmental Research and Innovation (ERIN) Department, Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) – 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

[3] International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology (iCEINT), Aix en Provence, France.

E-mail contact: jennifer.andrei@univ-lorraine.fr

Abstract

Silver nanoparticles (nAg) are widely used in consumer products and the risk associated with their potential release into freshwater ecosystems needs to be addressed using environmentally realistic exposure concentrations. Here, the effects of low concentrations (0.5 to 5 µg L^{-1}) of two different sized nAg (10 and 60 nm) and a silver nitrate positive control were evaluated in *Gammarus roeseli* following exposure for 72 h. Cellular, individual and functional endpoints were independently studied and the most striking results were reported for functional endpoints. Indeed, without a change in their feeding activity, the gammarids produced significantly fewer fine particles of organic matter when exposed to nAg, even at 0.5 µg L-1 of 10 nm nAg. These functional endpoints seem to be efficient markers for detecting the early effects of nAg on *G. roeseli*.

Capsule: Environmentally realistic concentration of nAg altered the locomotor activity of gammarids and their functional response by decreasing the production of fine particulate organic matter.

Keywords: *Gammarus roeseli* - silver - nanoparticles – functional role – behavior

1. Introduction

Nanotechnologies are currently used in a wide range of consumer products. Engineered metallic nanoparticles have amazing properties which are different from non-nanoscale material due to a high surface to volume ratio (Bernhardt et al., 2010; Christian et al., 2008). The properties of engineered nanoparticles are advantageously used in several sectors (Nowack and Bucheli, 2007) such as gold nanoconjugates in medicine which are used as therapeutic agents (Giljohann et al., 2010), or TiO_2 and ZnO nanoparticles in cosmetics as UV filters (Nohynek et al., 2008). Silver nanoparticles (nAg) are commonly used as effective biocides against bacteria, fungi and viruses (Marambio-Jones and Hoek, 2010). For example, in the textile industry, silver nanoparticles (nAg) are incorporated into hospital clothes in order to prevent pathogenic bacterial infection such as *Staphylococcus aureus* infection (Durán et al., 2007), but are also used in clothes such as socks to avoid unpleasant odours caused by microorganisms (Perera et al., 2013). Benn and Westerhoff (2008) showed that these types of socks can release nAg and ionic silver in the washing water. Farkas et al. (2011) studied the amount of silver in the effluent from a commercial silver nanowashing machine and they measured an average release of 11 µg L^{-1} of silver partly in the nanoparticulate form. Similarly, Kaegi et al. (2010) reported direct leaching into the environment of a composite colloid of nAg from a white paint facade (30% of nAg released after one year).

To date, the techniques available and the lack of practical approaches do not allow for large scale and routine quantification of nanoparticle emissions and concentrations in the environment, making mathematical modelling the preferred tool for predicting environmental concentrations (Gottschalk and Nowack, 2011). Gottschalk et al. (2009) calculated that the predicted environmental concentration (PEC) for nAg in surface water was in the range of ng L^{-1}. Even if, for aquatic organisms, the risk quotients based on the PECs and calculated by the authors was low for the nAg, further investigations are still needed because the growing production and use of silver nanomaterials may lead to an increase of their environmental concentrations. For nAg, the environmental risk may be associated with the nanoparticulate form of silver, and to the release of dissolved silver, which strongly depends on the physico-chemical characteristics of water (Lee et al., 2012; Liu and Hurt, 2010). Silver is recognized as a toxic metal, especially for small aquatic invertebrates (Bianchini et al., 2005; Luoma, 2008; Ratte, 1999; Wood et al., 1999). Recently, Arce Funck et al. (2013) calculated $LC50_{96h}$ of 2.2 µg L^{-1} of $AgNO_3$ in the freshwater Crustacea *Gammarus fossarum.* Nevertheless they also demonstrated toxicity even for environmentally realistic concentrations (0.5 µg L^{-1}). For example, the authors observed significant

effects on the physiology (decrease of haemolymph osmolality) and behavior (decrease of locomotor and ventilatory activities) and they highlighted the need to perform integrated studies from individual to ecosystem.

Among the freshwater Amphipoda, *Gammarus roeseli* (Gervais, 1835) is widely distributed throughout the northern hemisphere (Grabowski et al., 2007; Karaman and Pinkster, 1977). The species often reaches an important biomass and represents a major food resource for fish, birds and amphibians in freshwater ecosystems (Baudin and Garnier-Laplace, 1994; MacNeil et al., 1997). This detritivore feed by shredding organic detritus but can also feed by scraping materials such as biofilms (Kelly et al., 2002; Wallace and Webster, 1996). Fine particulate organic matter (FPOM: 0.45 µm < particle diameter < 1 mm) is thereby released by *G. roeseli* (feces and pseudofeces) and can in turn be transported along the stream and incorporated into the aquatic food chain (Cushing et al., 1993; Wallace and Webster, 1996). However, this major detritus processing may be impaired by exposure to harmful chemicals. Some studies have shown that this process was indirectly altered by decreasing the feeding activity of gammarids exposed to metallic compounds (Dedourge-Geffard et al., 2009; Felten et al., 2008).

The present study provides a realistic scenario of contamination in a freshwater ecosystem. Gammarids were exposed to very low silver concentrations in natural water retrieved from a stream and supplemented with food. Biological endpoints were independently investigated at different levels of organization to define the response of interest to study the effects of nanoparticles and to assess potential direct or indirect effects of two sizes of nAg. At the cellular level, cellular protection was studied by measuring the transport activity of multixenobiotic resistance (MXR) in the cell membrane of gills. MXR involves a complex of membrane proteins dedicated to pumping out chemicals from the cells, then conferring protection against putative toxic compounds (Epel et al., 2008). MXR is widely used as a biomarker of exposure to a broad range of organic chemicals (Bard, 2000) but also to metallic compounds (Achard et al., 2004). More recently the ability of MXR to reflect exposure to nanoparticles was addressed by two studies, one showing that P-85® nanoparticles inhibit the protective effects of MXR in echinoid larvae (Anselmo et al., 2012) and the other reporting an increase of MXR activity in mussels gills following exposure to titanium dioxide nanoparticles (Canesi et al., 2014). At the individual level, the locomotor activity of exposed gammarids was monitored. This may provide indirect information on the exposure's potential effect on ecologically important behaviors such as feeding and escape responses. Because locomotor activity and feeding are closely linked, the consumption of leaves by gammarids and the resulting FPOM production were also assessed to reveal potential dysfunction of

the organism itself. Indeed, decreased feeding activity could reflect either avoidance or physiological impairment reducing the ability of the animal to move and feed. Thus, reduced feeding may alter energy provision and increased feeding may reveal an enhanced need for energy. In addition, a modification of FPOM production may result in changes in organic matter transfer at the ecosystem scale.

The present study aims to investigate the effects of nAg on fed gammarids exposed in natural water to very low nAg concentrations: 0.5 and 5 µg L^{-1}, in order to provide a realistic scenario of contamination. The assessment of the effects at different levels of biological organization should help to better understand the consequences of nAg exposure at both the organism and the ecosystem level.

2. Materials and methods

2.1. Silver nanoparticle characterization

Two sizes of spherical nAg (10 and 60 nm) both suspended in a citrate buffer stabilizer capping agent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The stock solutions, with a silver concentration of 0.02 mg mL^{-1} ± 5% were stored in the dark at 4°C. The measured hydrodynamic diameters of the nAg were 14 nm±1.3 nm and 58 nm±1.0 nm (NanoSight 500, Malvern Instrument Ltd, UK), which is consistent with the manufacturer's information. Silver nitrate from Sigma-Aldrich ($AgNO_3$; >99%) was used as a silver positive control.

The nAg size distribution was also characterized in the natural water from La Meholle used for the exposure (see section 2.2.). Characterisation of nAg were performed in La Meholle water using the NanoSight 500. Those measurements were performed with the two nAg (10 and 60 nm) at 5 µg L^{-1}. In addition, the 2 sizes were also characterised at a higher optimal concentration of 100 µg L^{-1}.

Before the experiment, another test in the water of exposure (see section 2.2.) was performed to assess the amount of Ag dissolved from nanoparticles after 72h at 0.5 and 5 µg L^{-1} of nAg 10 and 60 nm. Negative (0 µg L^{-1}) controls were used. Detailed procedures for exposure are described in section 2.3. For each condition, 2 samples of 10 mL were removed in 3 replicates to evaluate the concentrations of total and dissolved silver. Dissolved Ag was separated from the nanoparticulate form using Amicon® ultra-15 centrifugal filter devices (porosity 3 kDa, centrifuged for 1 h at 5,000 x g). Concentrations were measured using Atomic Absorption Spectroscopy (AAS SpectrAA 300, Detection Limit: 0.1 µg L^{-1}) analysis after 1% HNO_3 acidification. The percentage of dissolution was then calculated as the ratio of dissolved [Ag] to total [Ag].

2.2. Biological material collection and maintenance

The water used during the experiment and during the previously described tests was sampled in June 2013 in a reference stream La Méholle (Void-Vacon, N-E France). The water was filtered using glass microfibre filters (90 mm diameter, pore size 1.2 µm, Whatman®) to remove suspended particles and stored at 12°C in the dark (48 h before the start of the experiment).

Gammarus roeseli (Crustacea, Amphipoda) were collected from the river La Nied (Remilly, N-E France). To avoid possible sex differences, only males in precopula and without parasites were selected (Sornom et al., 2010). Gammarids from La Nied were acclimated for 3 days by gradual replacement of their water of origin by the test water (La Méholle). Then, they were kept in La Méholle water for 7 days before being used. During the entire acclimation period, they were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) with a 16:8 h light:dark cycle.

During the experiment, the gammarids were fed with senescent dried alder leaves. Leaf-disks of 16 mm diameter were cut, placed in nylon bags (mesh-size 500 µm) and immersed in the La Méholle stream to allow them to be conditioned by microorganisms. After 10 days of conditioning, the disks were retrieved, stored at -20°C before being freeze-dried. Pools of 8 leaf discs were weighed to obtain the leaf dried mass before use and exposure.

2.3. Exposure design

All exposures were performed under controlled parameters [12.3 ± 0.5°C; 39.1 ± 2.6 Lux; 16:8 h light: dark cycles]. Test solutions were prepared by diluting the nAg stock suspension (0.02 mg mL^{-1}) or the $AgNO_3$ solution prepared using deionized water (0.025 mg $mL^{-}1$) with filtered La Méholle water to obtain nominal concentrations of 0, 0.5 and 5 µg $L^{-1.}$ Before being used, the initial concentration of prepared test solutions was checked by sampling 10 mL that were processed for AAS as described before. For the 7 treatments (Control, $AgNO_3$ at 0.5 and 5 µg L^{-1}, nAg 10 nm at 0.5 and 5 µg L^{-1} and nAg 60 nm at 0.5 and 5 µg L^{-1}), a 48 h silver saturation of polypropylene microcosms was applied with the relevant exposure concentrations (3 replicates/condition). Then, the preconditioning solution was replaced by 400 mL of exposure solutions per microcosm (each containing 8 alder discs). Twenty gammarids per replicate sample were then exposed for 72 h. Concurrent control microcosms with leaves, but without gammarids were also prepared with the same method for all the conditions (7 treatments and 3 replicates). They permitted the evaluation of the microbial activity associated with conditioned leaves. In each microcosm

(n= 42), water samples of 10 mL were removed after 72 h to determine the final $[Ag]_{total}$ using AAS as described before. Samples were taken from middle of the water column taking care not to remove the particles that had settled at the bottom. At the end of the experiment, gammarids and leaves were retrieved, used for analyses or stored at -80°C before treatment. The volume of remaining water was filtered for FPOM measurement.

2.4. Biological endpoints

2.4.1. Survival

Every 24 h, the number of living *G. roeseli* was counted and the dead organisms were removed.

2.4.2. Silver concentrations in biological material

After 72 h of exposure, a pool of 5 organisms and 1 leaf disk per replicate were collected, dried on filter paper, frozen at -80°C, freeze-dried and weighed. The samples were mineralized in nitric acid (HNO_3, LGC Standards) and hydrogen peroxide (H_2O_2, Fisher Scientific) with a microwave reaction system (Anton Paar Multiwave Pro) before the silver was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS, PerkinElmer Elan DRCe). For gammarids and leaves, the measured silver concentration was expressed as µg g^{-1} of dry mass.

In order to better describe the distribution of Ag in the studied compartments of our experimental media, the Ag mass balance was calculated as followed. From the concentrations of Ag measured in 5 gammarids per replicate sample (µg/g dry weight), we extrapolated and calculated the total mass of Ag in the whole gammarids compartment for each microcosm, taking into account (1) that dead organisms was eliminated from the experiment and (2) that we previously established a relationship between dry and fresh weight in the studied population of gammarids. From the concentration of silver measured in 1 leaf disk per replicate sample (µg/g dry weight), we estimated the total mass of Ag in the whole compartment (8 leaf-disks). From the concentration of silver measured in 1 sample (10 mL) of water per replicate sample, we calculated the total mass of silver in the water compartment (400mL). The total recovered silver (41 to 88% of the nominal mass of silver introduced in the water) was calculated as the sum of the previously described silver contents and related to 100%.

2.4.3. MultiXenobiotic Resistance activity

The MXR transport activity was assessed by a dye accumulation (calcein) assay and obtained by the difference between calcein accumulation in gills in the presence or absence of MXR inhibitors (Luckenbach and Epel, 2008).

For the dye assay, 8 gammarids per replicate sample were individually incubated for 2 h in 2 mL of Calcein-AM 5 µM ($C_{46}H_{46}N_2O_{23}$, Sigma-Aldrich) in DMSO 0.3% (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich). For 4 of these gammarids a mix of MXR inhibitors was added: Reversin 205 5 µM ($C_{41}H_{58}N_4O_{12}$, Sigma-Aldrich) and MK-571 15 µM sodium salt hydrate ($C_{26}H_{26}ClN_2NaO_3S_2\cdot$, Sigma-Aldrich). Negative controls were tested in DMSO 0.3%. Following incubation, the gills of gammarids from each of the two groups (one with, and one without the mix of inhibitors) were excised, pooled in water (200 µL) and frozen at -80°C until further analysis. The gills were then ground, sonicated (1 min), centrifuged (5000 x g, 4°C, 5 min) and the fluorescence of calcein in the supernatant was measured (100 µL in a 96-well microplate; SAFAS Monaco Xenius, excitation and emission wavelength: 495 and 515 nm, respectively). The fluorescence of samples was expressed as fluorescence units/mg of proteins assessed using the Quick start™ Bradford Bio-Rad kit (Bradford, 1976). The MXR activity was finally calculated for each treatment as the mean of all the differences between the results obtained from calcein accumulation in the presence of inhibitors and those from calcein accumulation without inhibitors.

2.4.4. Locomotor activity

At the end of the experiment and for each treatment, 3 organisms per replicate were removed and pooled in a 250 mL tank containing their respective exposure medium contamination condition. The locomotor activity was monitored by counting the number of moving animals (9 individuals in total) (Arce Funck et al., 2013; Issartel et al., 2005). Each count of moving *G. roeseli* was conducted every 2 seconds and repeated 40 times. Measurements were performed, after 5 min of acclimation, to avoid perturbation due to sampling, at the same period of the day, with similar light conditions, and without noise.

2.5. Functional responses

2.5.1. Consumption and FPOM production

After a 72 h exposure, leaf disks (pool of 8 including the one used for silver concentration measurement) were removed, dried with absorbent paper, frozen at -80°C, freeze-dried and weighed following the same method as before exposure. Following this protocol, the leaf mass loss induced by leaching and microbial activity was assessed using the control conditions with leaves only. The amount of leaves only consumed by gammarids after 3 days of exposure was calculated according to equation (1). The consumption rate was expressed as µg of leaf consumed/mg of gammarid/day (dry mass).

$$\text{Gammarid consumption} = \frac{DM_{leaf,initial} - DM_{leaf,final} - (\%LM \times DM_{leaf,initial})}{DM_{gammarids} \times d} \quad (1)$$

Where $DM_{leaf, initial}$: leaf dried mass before exposure, $DM_{leaf, final}$: leaf dried mass after exposure, LM: lost mass induced by leaching and microbial activity, $DM_{gammarids}$: gammarids dried mass and d: the exposure time.

To collect FPOM produced, the water was filtered (with vacuum) using nitrate cellulose filters (47 mm diameter, 0.45 µm porosity, Sartorious, Labomoderne) previously rinsed with nanopure water, dried (24 h, 80°C) and weighed. After filtration, the filters were dried (24 h, 80°C) and weighed again to measure the quantity of FPOM produced. Following this protocol, FPOM production induced by leaching and microbial activity was assessed using the control conditions with leaves only. The gammarids production of FPOM was calculated using equation (2). The FPOM production was expressed as µg FPOM produced/mg of gammarid/day (dry mass).

$$\text{Gammarid FPOM production} = \frac{DM_{filter,final} - DM_{filter,initial} - (\%FPOM_{microbial} \times DM_{leaf,initial})}{DM_{gammarids} \times d} \quad (2)$$

Where $DM_{filter, final}$: filter dried mass after filtration, $DM_{filter, initial}$: filter dried mass before filtration, $\%FPOM_{microbial}$: dried mass percentage induced by leaching and microbial activity, $DM_{leaf, initial}$: leaf dried mass before exposure, $DM_{gammarids}$: gammarids dried mass and d: the exposure time.

The difference between consumption and FPOM production was calculated and expressed as µg dry mass/mg of gammarids dry mass/ day.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.1.0 (R Development Core Team, 2014). The distribution of silver within the studied compartments of the exposure system was assessed by a chi-square test on the mass. For locomotor activity and survival, where count data were produced, we built models based on the binomial family. We choose a generalized linear model for survival data, and a generalized linear mixed-effects model (glmm) of the binomial family, to take into account repeated measures of locomotion on the same set of individuals within each experimental condition. In order to compare silver concentration in leaves exposed with or without gammarids, we performed a two-way anova, with exposure condition and gammarid presence as factors. For other datasets (silver concentration in gammarids; MXR transport activity; consumption, FPOMs production and their difference), a one-way anova was conducted. All anovas were followed by the Tukey HSD test for multiple comparisons. Parametric conditions were verified before each anova.

3. Results

3.1. Silver nanoparticle characterization

The particle size distribution in the samples of La Meholle spiked with 5 µg L^{-1} of nAg (10 and 60 nm) were similar to particle size distribution curve of the La Meholle river without any nAg indicating that we were under the limit of detection. However, the nanoparticle characterization at 100 µg L-1 of nAg 10 and 60 nm in La Meholle water showed particles with hydrodynamic diameters of 56 ± 3.1 and 69 ± 6.1 nm, respectively, indicating an effect of La Meholle water on the nAg size distribution.

The experiment without biological material (i.e. water only) showed that dissolved forms of Ag were detected only for the 10 nm size at 5 µg L^{-1} (dissolution percentage: 9.7% of total silver).

3.2. Concentrations of silver in water and in biological material

At the start of the experiment, the initial concentrations of silver measured in the test solutions were checked for the 0, 0.5 and 5 µg L^{-1}: <DL, 0,26 and 4,84 for $AgNO_3$; <DL, 0,29 and 5,66 for nAg 10 nm; and <DL, 0,29 and 4,73 for nAg 60 nm respectively. After 72 h, the silver concentrations measured (mean ± S.D.) in the water for the control conditions (0 µg L^{-1}) were below the detection limit. In the 0.5 and 5 µg L^{-1} conditions, silver concentrations were 0.16 ± 0.05 and 2.19 ± 0.67 µg L^{-1} for $AgNO_3$; 0.21 ± 0.02 and 3.4 ± 0.72 µg L^{-1} for nAg 10 nm, and were 0.24 ± 0.04 and 3.97 ± 0.42 µg L^{-1} for nAg 60 nm, respectively.
For concentrations measured in gammarids, a significant difference was detected between the conditions (Fig. 1, one way ANOVA, F=99.02, 6 df, $p<0.001$). At 5 µg L^{-1} of nAg 60 nm, the accumulation was 4 times higher compared to the control. Organisms exposed to nAg 10 nm and $AgNO_3$ at 5 µg L^{-1} showed a concentration of silver 20 times higher compared to the control and 10 times higher compared to exposure at 0.5 µg L^{-1}.

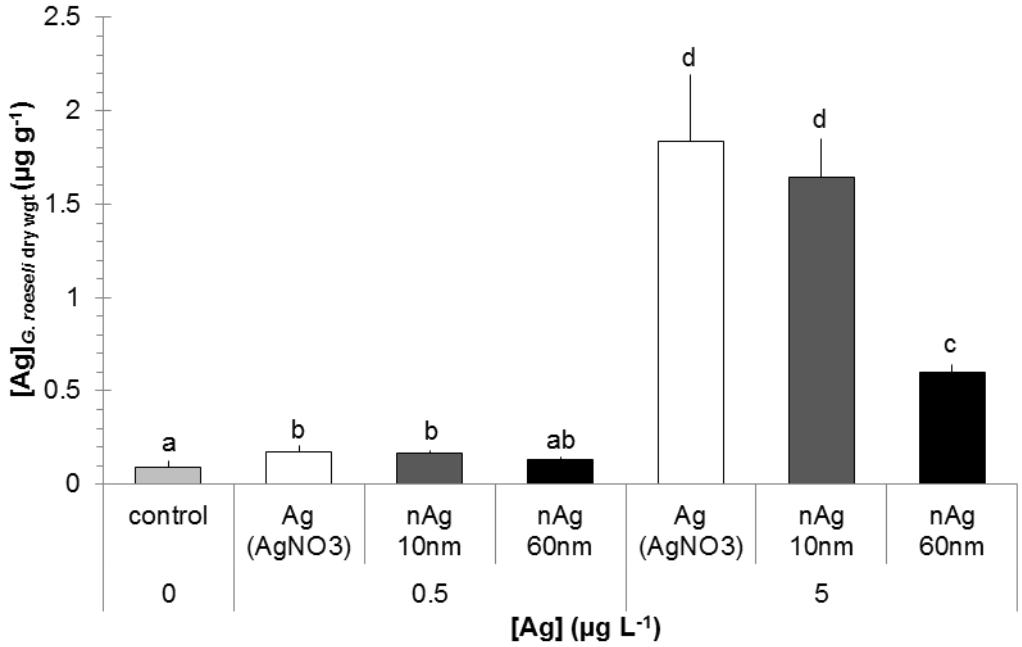


Figure 1: Mean (+ S.D.) silver concentration in gammarids exposed to three concentrations of silver nitrate and nAg (60 and 10 nm). Groups with the same letters are not significantly different (one-way anova; Tukey HSD; n=3).

The silver concentrations measured in leaves after 72 h of exposure to silver in microcosms with or without gammarids are shown in Figure 2. The two-way anova evidences an effect of the interaction between exposure condition and gammarid presence on silver concentration in leaves ($F=7.35$ on 6 and 28 df, $p<0.001$). Indeed, the gammarid presence induced a lower silver concentration in leaves at 5µg L^{-1} of $AgNO_3$ and nAg 10nm. Moreover, concentrations of silver in leaves exposed with or without gammarids at 5µg L^{-1} of $AgNO_3$ and nAg 10nm were significantly different from their respective control.

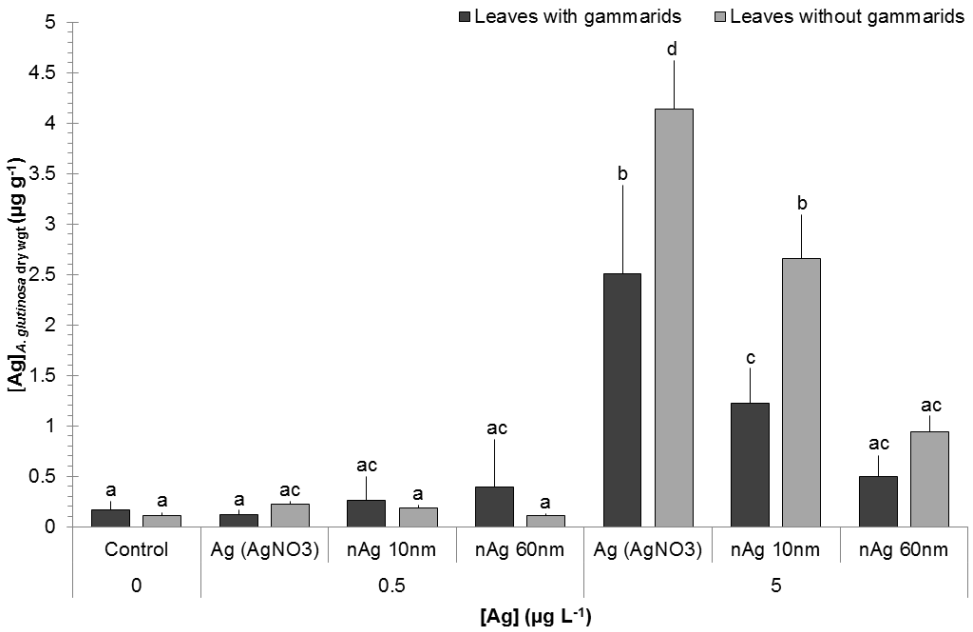


Figure 2: Mean (+ S.D.) silver concentration in leaves exposed with or without gammarids to three concentrations of $AgNO_3$ and nAg (10 and 60 nm). Groups with the same letters are not significantly different (two-way anova; Tukey; n=3).

At the end of the experiment, the distribution of Ag among the compartments differed according to the exposure condition (Fig 3; Chi-square test, χ^2=1518, df=34, p<0.001). Depending on the Ag exposure conditions, the recovered silver mainly remained in the water (60% to 94%), and only 6% to 35% and 1% to 10% was found in the gammarids and leaves, respectively (Fig. 3). At each concentration, we observed a higher percentage of silver in the water and a lower percentage of silver in gammarids for the nAg 60 nm exposure than for the nAg 10 nm one.

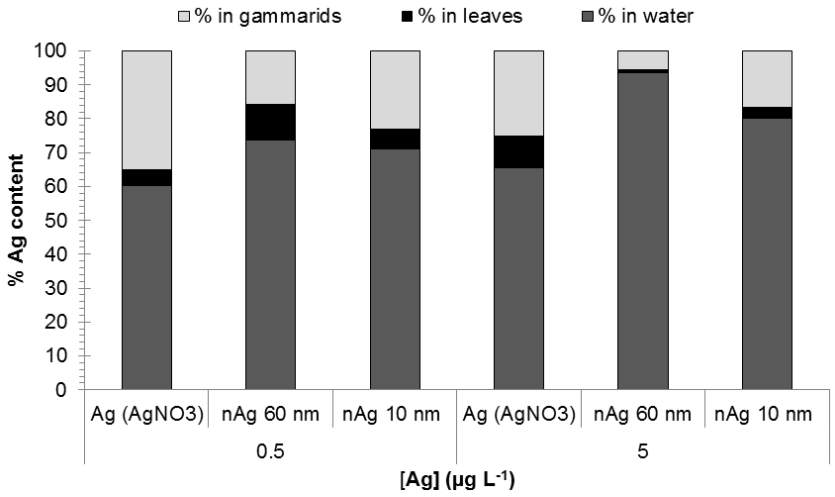


Figure 3: Mean percentage (n=3) of recovered silver in water, leaves and gammarids after 72 h of exposure to $AgNO_3$, nAg 60 nm and nAg 10 nm.

3.3. Survival

With survival percentages ranging from 83% and 97%, exposure concentrations of nAg and $AgNO_3$ did not induce significant gammarid mortality compared to the control condition (glm, analysis of deviance, p=0.22).

3.4. MultiXenobiotic Resistance activity

Although the anova detected a significant difference (Fig. 4; one-way ANOVA; F= 2.22, 6 df, $p< 0.05$), the Tukey HSD test revealed that the pair-wise difference driving this effect was an irrelevant comparison (i.e., $AgNO_3$ 0,5 µg L^{-1} versus nAg 10 nm 5 µg L^{-1}).The results showed that exposure to silver did not induce significant modifications in MXR transport activities compared to the control.

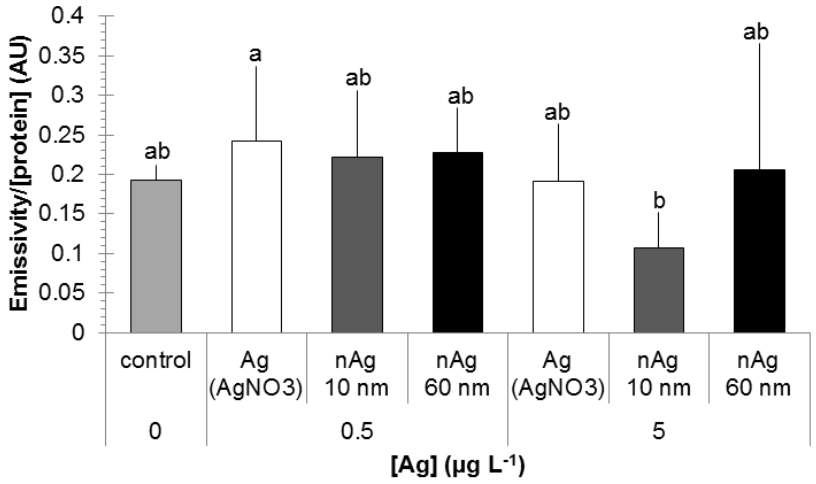


Figure 4: Mean (+ S.D.) MXR transport activity (emissivity: arbitrary unit) after 72 h of exposure to $AgNO_3$, nAg 60 nm and nAg 10 nm. Groups with the same letters are not significantly different (one-way anova, Tukey HSD; n=9).

3.5 Locomotor activity

Organisms exposed to $AgNO_3$ and to nAg, showed significantly reduced locomotor activity compared to the control. At 0.5 µg L^{-1}, a significant difference was observed between nAg10 nm and nAg 60 nm. Indeed, the locomotor activity of organisms exposed to nAg 10 nm was impacted most, with a decrease of 59% compared with the control. At 5 µg L^{-1}, locomotion remained the same as that at 0.5 µg L^{-1} for

both nanoparticle sizes, but was significantly reduced by 21% with $AgNO_3$ (Tukey's HSD test performed on the glm, p=0.007). We also observed a significantly lower activity of these gammarids compared to those exposed to nAg 60 nm at the same concentration (p=0.047).

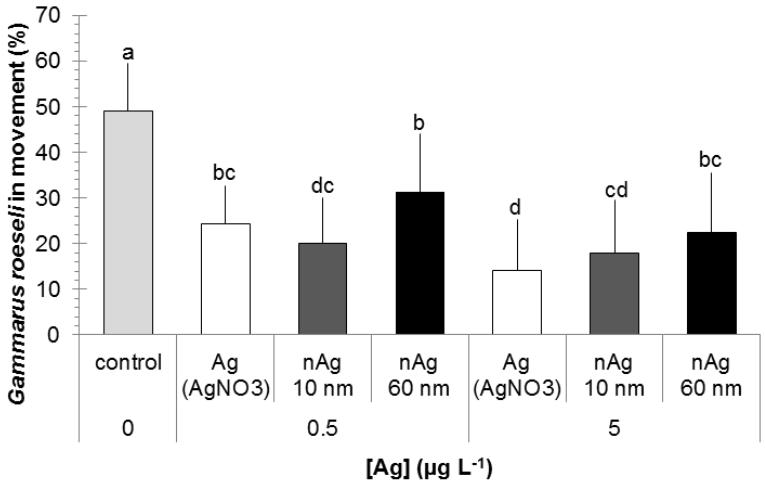


Figure 5: Mean (+S.D.) locomotor activity (n=40 measurements over time of the same samples of 9 individuals) of gammarids exposed to 3 concentrations of $AgNO_3$, nAg 60 nm and nAg 10 nm. Groups with the same letters are not significantly different (p<0.005).

3.6. Consumption and FPOM production

The feeding activity of gammarids is presented in Figure 6A. No changes in leaf-litter consumption were observed for the different treatments.

In contrast, organisms exposed to 0.5 µg L^{-1} of nAg 10 nm and 5 µg L^{-1} of nAg 10 nm and nAg 60 nm produced significantly less FPOM than control organisms as well as organisms exposed to $AgNO_3$ (Fig. 6B). At 5 µg L^{-1}, the decrease which was 60% did not differ according to nanoparticle size.

Figure 6C shows the difference between the quantity of organic matter consumed and the quantity of FPOM produced for each exposure condition. A one-way ANOVA showed significant differences between the different conditions (F=5.56, 6 df, p=0.004). Indeed, the gammarids exposed to nAg 10 nm at 0.5 µg L^{-1} retained significantly more organic matter than the control or $AgNO_3$ exposed gammarids. The other treatments were not different from the control condition.

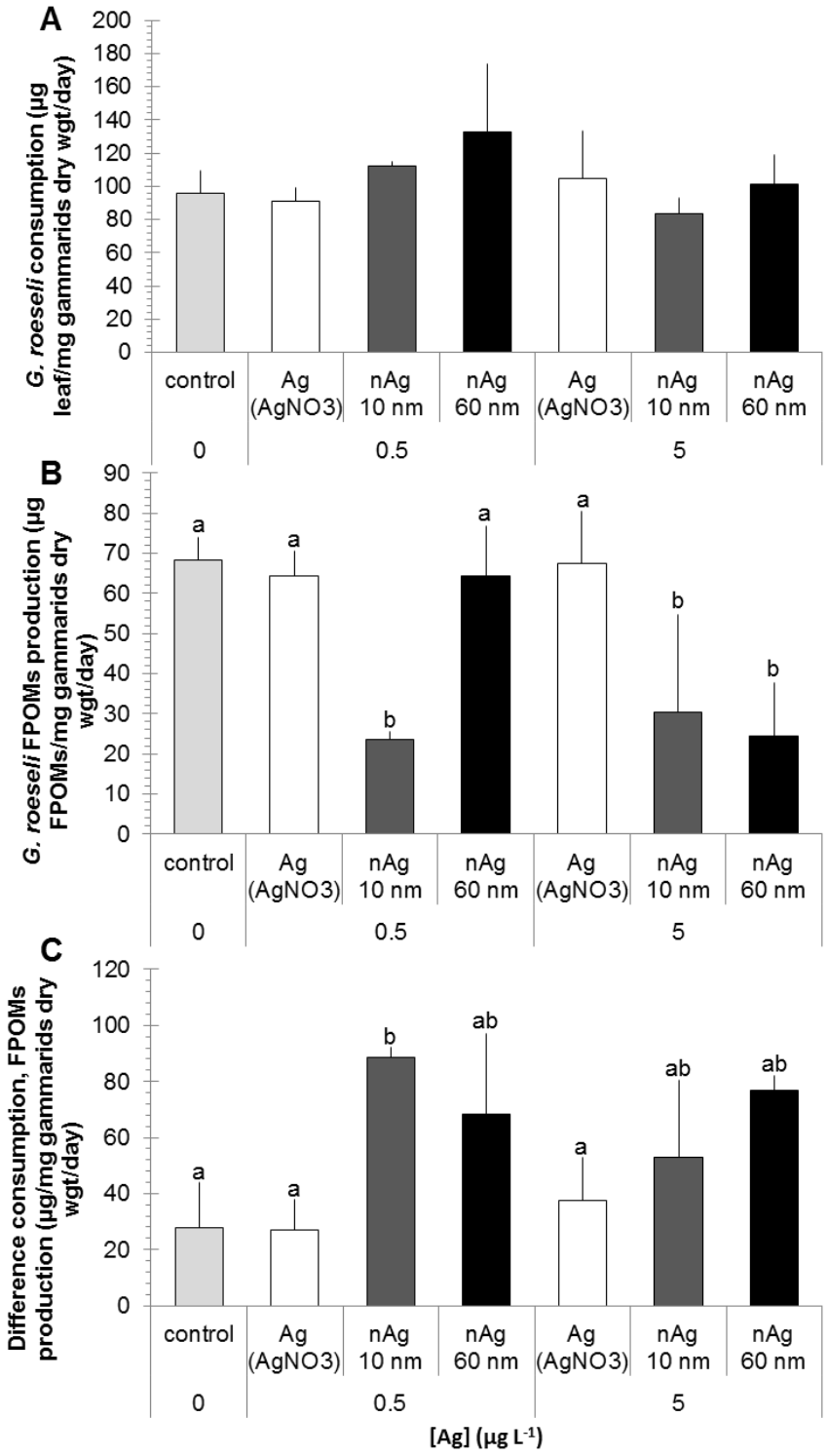


Figure 6: A) Mean (+ S.D.) gammarids leaf consumption (n=3, no significant differences), B) FPOM production and C) difference between leaf consumption and FPOM production (n=3). Groups with the same letters are not significantly different (one-way anova; Tukey HSD).

4. Discussion

Gammaridae are currently used in aquatic ecotoxicology (Alonso et al., 2010; Felten et al., 2008; Rinderhagen et al., 2000; Vellinger et al., 2012). As detritivores, their role in the functioning of streams has been well documented (Dangles and Guérold, 2001; Felten et al., 2008). Here we present, for the first time, data obtained at the cellular, individual and functional levels following exposure to nAg.

4.1. Exposure conditions : silver characterizations and concentrations

The exposure conditions and especially the very low nAg concentrations tested in the present study did not allow us to determine the size distribution of particles in our experimental media because of the detection limit of the particle tracker Nanosight (10^8 particles mL^{-1}). In order to investigate the effect of La Méholle water on the particle distribution in our experimental water, the tracking analysis was performed at very high concentration of 100 µg L^{-1}, which is environmentally unrealistic but brings insight about their behavior in this particular media. The nAg hydrodynamic diameters measured in the complex matrix of La Méholle water were larger than pristine nAg showing a probable complexation and agglomeration of the nAg linked to the water physicochemical properties. Gao et al. (2009) showed that the water chemistry (e.g: dissolved organic carbon, ionic strength and pH) might affect the nanoparticle dispersion and size distribution. For example, pristine nAg of 20 to 30 nm displayed diameters of approximately 100 nm when placed in deionized water and of approximately 400 nm in the Suwannee river water. Natural water also contains natural organic matter like fulvic and humic acids that are known to play a key role in nanoparticle sorption and could mitigate their bioavailability (Bernhardt et al., 2010; Maurer-Jones et al., 2013). So regarding our results and those of previously published works, even if the measurements were not done at the same exposure concentrations as we used for gammarids, we could nevertheless assume that the effects observed on gammarids might be due to complexed or aggregated nanoparticles.

However, silver nanoparticles can also release ionic silver by oxidative dissolution (Liu and Hurt, 2010) and there is a general agreement that toxicity is mainly due to the slow release of ionic silver from nAg (Behra et al., 2013; Kittler et al., 2010). The dissolution rate depends on the nanoparticle itself (size, coating, surface functionalization), but also on the water chemistry (temperature, pH, presence of Ag^+ ligands, ionic strength) (Auffan et al., 2009; Behra et al., 2013; Liu and Hurt, 2010; Peretyazhko et al., 2014). Depending on the experimental conditions tested, studies reported either total or partial dissolution of nAg with steady states reached after several hours. In our study, we were able to detect

soluble forms of Ag after 72 h, but only for the smallest nAg size (10 nm) at the highest concentration (5 µg L^{-1}). As our experiments were conducted by immersing nanoparticles in natural river water, it is suggested that physico-chemical conditions did not favor nAg dissolution: low temperature (12°C), natural river pH (8.1) and the presence of natural organic matter may explain the slow dissolution process (Liu and Hurt, 2010).

The measurement of Ag concentrations in *G. roeseli* showed that silver was present in exposed gammarids, whatever the form, and that its levels were increased in the highest tested concentration. Whereas other studies have already documented uptake/accumulation of Ag in *Gammarus* species exposed to ionic forms (Arce Funck et al., 2013; Baudin and Garnier-Laplace, 1994), our study reveals that Ag could also be found in gammarids after exposure to nanoparticulate forms. Whether it could result in bioaccumulation and whether the form is nanoparticulate were not investigated in the present work and remains to be determined. Asghari et al., 2012 could demonstrate uptake of nanoparticulate forms of Ag in daphnids (accumulation under the carapace, aggregates attached to the external body surface and appendages and accumulation in the gut) that were accounted for certain signs of toxicity and associated with a risk of bioaccumulation. In aquatic snails, the bioaccumulation dynamics of nAg was investigated and the results pointed out accumulation from both waterborne or dietary exposure routes (Croteau et al., 2011). Additionnaly, works conducted in fish showed that Ag could accumulate in different organ tissues after nAg exposure (Gaiser et al., 2012 ; Griffitt et al., 2012). Together these results highlighted that exposure to nAg could result in accumulation of Ag in tissues and then could be responsible for toxicity at the organism level and for trophic transfer at the ecosystem level. Gammarids being a major food resource for predators, they could become a potential vector of contamination in the food web (MacNeil et al., 1999).

Moreover, we observed significant contamination of leaf-disks exposed to 5 µg L^{-1} of $AgNO_3$ or nAg 10 and 60 nm indicating that organisms feeding on leaf-disks could be contaminated through the consumption of trophic resources. It should be noted that leaf disks exposed to 5 µg L^{-1} with gammarids were less contaminated than in the absence of gammarids for the $AgNO_3$ and nAg 10 nm exposures. This could be the result of the activity of gammarids which are able to feed by grazing the biofilm on the surface of substrata. Unfortunately, the uptake of Ag or nAg by gammarids from food (i.e., leaf discs and associated microoganisms) cannot be concluded based on the present study due to the lack of no food control treatment.

The percentage of silver contents measured in the water, gammarids and leaves at the end of the experiment aimed to better describe the Ag distribution among the studied compartments of our experimental media. Similar trends were observed for each concentration, with most of the silver remaining stable in the water suggesting an unexpectedly low sedimentation rate. At the highest concentration, we observed a lower silver content with increasing nAg size in leaves and in organisms. It is interesting to note that nanoparticle size-dependent distribution in the three main compartments may be due to their adsorption properties. Indeed, Auffan et al. (2009) found size-dependent interfacial properties and reactivity of nanoparticles which enhanced adsorption for nanoparticles of 30 nm or less.

4.2. Biological responses to exposure

4.2.1. Survival

Environmentally realistic concentrations of nAg and $AgNO_3$ did not induce gammarid mortality during the 72 h exposure period. Nevertheless, for the same range of $AgNO_3$ concentrations, Arce Funck et al., (2013) reported a *G. fossarum* $LC50_{72h}$ of 2.2 µg L^{-1}, thus showing that sensitivity can vary between gammarid species and/or between different exposure conditions (e.g. composition of water used).

4.2.2. MultiXenobiotic Resistance activity

The MXR proteins are membrane pumps which can expel xenobiotics out of the cells and act as a first line of defense against contaminants (Bard, 2000; Epel, 1998). MXR has mainly been studied in mollusc species (Luedeking and Koehler, 2004; Pain and Parant, 2003), and studies on MXR in gammarids are scarce (Horion et al., 2015; Timofeyev et al., 2007). Whereas these studies are based on the dye accumulation assay performed in the whole organisms, our results were obtained by studying gills only, then focusing on one of the most relevant target organ of pollution due to the barrier role they play between the organism and its environment. Our results showed that the silver exposures did not modify the MXR efflux activity even at the highest concentration of 5 µg L^{-1}. These results need to be confirmed in further studies, because other works demonstrating that nanoparticles were able to reduce and then inhibit the activity of MXR pumps (Echninoid larvae, Anselmo et al., 2012; human alveolar epithelial cells, Salomon and Ehrhardt, 2011). In the latter, latex bead nanoparticles were shown to reduce the efflux mediated by one of the proteins responsible for MXR functioning (the multidrug resistance,MDR, P-glycoprotein) in A549 cells, and this inhibition was explained by a direct interaction between the membrane and nanoparticles. If nanoparticles can reduce MXR efflux activity, organisms may

accumulate other harmful compounds or may be unable to eliminate toxic metabolites. Indirectly, could enhance the exposure of organisms to other contaminants (Smital et al., 2004).

4.2.3. Locomotor activity

The present study showed that the locomotor activity was strongly impacted when gammarids were exposed to environmentally realistic concentrations of $AgNO_3$ or nAg. The decrease observed in gammarids exposed to $AgNO_3$ is consistent with the study by Arce Funck et al. (2013). The effect of nAg on the locomotor activity of *G. roeseli* corroborates the results of Asghari et al. (2012), which showed abnormal swimming behavior in *Daphnia magna* exposed to 2 µg L^{-1} of spherical silver nanoparticles between 5 and 25 nm in diameter. In natural conditions, a decrease in locomotor activity is crucial for gammarids since it has been shown that a decrease in organisms activity could enhance the risk of drift along water currents (Hughes, 1970, Taylor et al., 1994). Although the drift may move the individual away from exposure, on the other side it could increase the predation risk. In the present study, the smallest nAg (10 nm) exerted an effect on locomotion as strong as that of the $AgNO_3$ positive control. Moreover, the 10 nm nAg induced a more pronounced decrease in locomotor activity than the 60 nm nAg. Many studies have also reported increasing toxicity with decreasing nanoparticle size (Carlson et al., 2008; Hoheisel et al., 2012; Marambio-Jones and Hoek, 2010). Behavioral activities such as locomotor activity are interesting biomarkers as they often respond when organisms are exposed to very low xenobiotic levels (Felten et al., 2008; Gerhardt, 1996).

4.2.4. Functional responses

The feeding habits of *Gammarus* species play a key role in the fragmentation and transformation of allochtonous organic matter in ecosystems and its incorporation in the trophic web (Wallace and Webster, 1996). In the present study, exposure to $AgNO_3$ or nAg did not affect the consumption of organic matter by gammarids. However, a significant decrease in FPOM production by *G. roeseli* exposed to 0.5 µg L^{-1} of nAg10nm and to 5 µg L^{-1} of both types of nanoparticles was observed, whereas exposure to $AgNO_3$ had no effect. This demonstrated the clear impact of nanoparticles especially for the smallest nanoparticles at low concentration. Indeed, the size-dependent crystalline structure of nanoparticles can influence their reactivity suggesting a possible size dependence in toxicity (Auffan et al., 2009). Lower production of feces can be the result of higher assimilation of food as proposed by Zubrod et al. (2011) for *G. fossarum* exposed to a fungicide. However, another explanation could be that lower feces production may be the result of a disturbance in digestive function. Indeed, sublethal metal concentrations can disturb the digestive enzyme activity and finally the efficiency of the digestion

process in crustaceans (De Coen and Janssen, 1997; Dedourge-Geffard et al., 2009). Whatever the mechanisms underlying the observed decrease in feces production, this may have a strong impact on energy transfer as feces represent an important high quality food resource for collector organisms.

5. Conclusion

The present study demonstrated that for environmentally realistic exposure conditions (low nAg concentrations in a natural water sampled in a river), silver was measured in the water, in *G. roeseli* and in leaves after 72h of nAg exposure. We showed that at low concentrations, nAg induced biological effects on gammarids. The most significant results were observed for organisms exposed to the smallest size of nanoparticle (i.e 10 nm). Direct effects of silver have been observed on *G. roeseli* behavior with a drastic decrease of the locomotor activity. These effects may reflect dysfunction of the ecologically important behaviors of the organism, but also of the closely linked functional activities. Indeed, the most striking result highlighted functional impacts through the disturbance of FPOM production without any impact on consumption suggesting that low nAg concentrations may induce a change in gammarid energy provision. Further experiments are needed to determine the mechanisms underlying these results and whether an assimilation modification or a digestion disturbance is involved. Nevertheless, this work brings new insights to the understanding of potential environmental impact associated with the release of nAg in natural ecosystems, by providing evidences of indirect effects on the aquatic organic matter cycle.

Acknowledgements:

Financial supports were provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-NANO-0006/MESONNET project), the Laboratory of Excellence Resources 21 "Strategic metals in the 21st century" (ANR-10-LABX-21-01) and the CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). The UE COST Action ES1205 ENTER (Engineered nanomaterials from wastewater treatment & stormwater to rivers) and the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology are acknowledged for providing financial support to J. Andreï for attending meetings and training schools. The contribution of Kahina Mehennaoui was in part possible within NanoGAM (AFP-PhD-9229040, Fonds National de la Recherche Luxembourg). The contributions of Sebastien Cambier and Arno Gutleb were in part made possible within NANION (FNR/12/SR/4009651-Fonds National de la Recherche Luxembourg). The authors wish to thank Philippe Rousselle for the AAS analyses and two anonymous reviewers for their valuable help in improving the manuscript.

References

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam Corbicula fluminea after heavy metals exposure. Aquatic toxicology 67, 347–357.

Alonso, Á., De Lange, H.J., Peeters, E.T., 2010. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods Gammarus pulex and G. fossarum. Ecotoxicology 19, 133–140.

Anselmo, H.M.R., van den Berg, J.H.J., Rietjens, I.M.C.M., Murk, A.J., 2012. Inhibition of cellular efflux pumps involved in multi xenobiotic resistance (MXR) in echinoid larvae as a possible mode of action for increased ecotoxicological risk of mixtures. Ecotoxicology 21, 2276–2287. doi:10.1007/s10646-012-0984-2

Arce Funck, J., Danger, M., Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., Guérold, F., Felten, V., 2013. Behavioural and physiological responses of Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. Aquatic Toxicology 142-143, 73–84.

Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J., 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna. Journal of nanobiotechnology 10, 14.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nature Nanotechnology 4, 634–641. doi:10.1038/nnano.2009.242

Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 48, 357–389.

Baudin, J.P., Garnier-Laplace, J., 1994. Accumulation, release, and tissue distribution of 110mAg from natural food (Gammarus pulex) by the common carp, Cyprinus carpio L. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 27, 459–465.

Behra, R., Sigg, L., Clift, M.J.D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. Journal of The Royal Society Interface 10, 20130396–20130396. doi:10.1098/rsif.2013.0396

Benn, T.M., Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environmental science & technology 42, 4133–4139.

Bernhardt, E.S., Colman, B.P., Hochella, M.F., Cardinale, B.J., Nisbet, R.M., Richardson, C.J., Yin, L., 2010. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. Journal of environmental quality 39, 1954–1965.

Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2005. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. Aquatic toxicology 72, 67–82.

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

Canesi, L., Frenzilli, G., Balbi, T., Bernardeschi, M., Ciacci, C., Corsolini, S., Torre, C. Della, Fabbri, R., Faleri, C., Focardi, S., others, 2014. Interactive effects of nTiO2 and 2, 3, 7, 8-TCDD on the marine bivalve Mytilus galloprovincialis. Aquatic Toxicology 153. 53-65.

Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. The Journal of Physical Chemistry B 112, 13608–13619.

Christian, P., Kammer, F. Von der, Baalousha, M., Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology 17, 326–343.

Cushing, C.E., Minshall, G.W., Newbold, J.D., 1993. Transport dynamics of fine particulate organic matter in two Idaho streams. Limnology and Oceanography 38, 1101–1101.

Dangles, O., Guérold, F., 2001. Linking shredders and leaf litter processing: insights from an acidic stream study. International Review of Hydrobiology 86, 395–406.

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing, II. Digestive enzyme activity in Daphnia magna exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. Chemosphere 35, 1053–1067.

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in Gammarus fossarum: An in situ experiment. Chemosphere 77, 1569–1576.

Durán, N., Marcato, P.D., De Souza, G.I., Alves, O.L., Esposito, E., 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. Journal of Biomedical Nanotechnology 3, 203–208.

Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 120, 23–28.

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. Environmental Science & Technology 42, 3914–3920.

Farkas, J., Peter, H., Christian, P., Gallego Urrea, J.A., Hassellöv, M., Tuoriniemi, J., Gustafsson, S., Olsson, E., Hylland, K., Thomas, K.V., 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. Environment international 37, 1057–1062.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquatic Toxicology 86, 413–425.

Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llaneza, V.L., Wang, Y., Bitton, G., Bonzongo, J.-C.J., 2009. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. Environmental Science & Technology 43, 3322–3328. doi:10.1021/es803315v

Gerhardt, A., 1996. Behavioural early warning responses to polluted water. Environmental Science and Pollution Research 3, 63–70.

Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, P.C., Mirkin, C.A., 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. Angewandte Chemie International Edition 49, 3280–3294.

Gottschalk, F., Nowack, B., 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. Journal of Environmental Monitoring 13, 1145–1155.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environmental Science & Technology 43, 9216–9222.

Grabowski, M., Bacela, K., Konopacka, A., 2007. How to be an invasive gammarid (Amphipoda: Gammaroidea)–comparison of life history traits. Hydrobiologia 590, 75–84.

Hoheisel, S.M., Diamond, S., Mount, D., 2012. Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in Daphnia magna and Pimephales promelas. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2557–2563.

Horion, S., Thomé, J.-P., Gismondi, É., 2015. Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod Gammarus pulex exposed to BDE-47 and BDE-99. Ecotoxicology 24, 959–966. doi:10.1007/s10646-015-1438-4

Hughes, D.A., 1970. Some Factors Affecting Drift and Upstream Movements of Gammarus Pulex. Ecology 51, 301–305.

Issartel, J., Hervant, F., Voituron, Y., Renault, D., Vernon, P., 2005. Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 141, 1–7.

Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. Environmental Pollution 158, 2900–2905.

Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Commissie voor de artis bibliotheek.

Kelly, D.W., Dick, J.T., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of Gammarus (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia 485, 199–203.

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Koller, M., Epple, M., 2010. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. Chemistry of Materials 22, 4548–4554.

Lee, Y.-J., Kim, J., Oh, J., Bae, S., Lee, S., Hong, I.S., Kim, S.-H., 2012. Ion-release kinetics and ecotoxicityeffects of silver nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 155–159.

Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environmental science & technology 44, 2169–2175.

Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB-and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 294, R1919–R1929.

Luedeking, A., Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel Mytilus edulis. Aquatic toxicology 69, 1–10.

Luoma, S.N., 2008. Silver nanotechnologies and the environment. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Washington, DC, USA 72.

MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1999. The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 74, 375–395.

MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater Gammarus spp.(Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 72, 349–364.

Marambio-Jones, C., Hoek, E.M., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research 12, 1531–1551.

Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. Analytical Chemistry 85, 3036–3049. doi:10.1021/ac303636s

Nohynek, G.J., Dufour, E.K., Roberts, M.S., 2008. Nanotechnology, Cosmetics and the Skin : Is there ahealth risk? Skin Pharmacology and Physiology 21, 136–149.

Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution 150, 5–22.

Pain, S., Parant, M., 2003. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. Comptes Rendus Biologies 326, 659–672.

Perera, S., Bhushan, B., Bandara, R., Rajapakse, G., Rajapakse, S., Bandara, C., 2013. Morphological, antimicrobial, durability, and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 436, 975–989.

Peretyazhko, T.S., Zhang, Q., Colvin, L., 2014. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. Environmental Science & Technology 48, 11954–11961.

Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 89–108.

Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as bioindicators, in: Environmental Research Forum. pp. 161–197.

Salomon, J.J., Ehrhardt, C., 2011. Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77, 392–397.

Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A.M., Vega, R.L., Epel, D., 2004. Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552, 101–117. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.006

Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of Gammarus roeseli. Environmental Pollution 158, 1288–1295.

Taylor, E.J., Rees, E.M., Pascoe, D., 1994. Mortality and a drift-related response of the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.) exposed to natural sediments, acidification and copper. Aquatic Toxicology 29, 83–101.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Bedulina, D.S., Menzel, R., Steinberg, C.E.W., 2007. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods Eulimnogammarus cyaneus and E. verrucosus. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 146, 496–503. doi:10.1016/j.cbpb.2006.11.017

Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., 2012. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (Gammarus pulex). Environmental Pollution 160, 66–73.

Wallace, J.B., Webster, J.R., 1996. The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. Annual review of entomology 41, 115–139.

Wood, C.M., Playle, R.C., Hogstrand, C., 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. Environmental toxicology and chemistry 18, 71–83.

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Feckler, A., Englert, D., Schulz, R., 2011. Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2718–2724.

III. Effets des nanoparticules d'argent sur 3 populations de gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* – *Expérience 2*

Contexte

Parmi les trois espèces de gammares étudiées, *G.roseli* s'est montrée plus sensible à l'exposition aux nanoparticules d'argent testées. Les travaux présentés ici ont visé à étudier une éventuelle variabilité au niveau intraspécifique. En effet, plusieurs populations d'une même espèce peuvent présenter des niveaux de sensibilité/tolérance différents, résultant de l'influence combinée de leur héritage génétique et de l'environnement local (historique de contamination notamment ;Pain-Devin et al., 2014).

Toujours dans le souci d'adopter une approche la plus réaliste possible d'une point de vue environnemental, des pools de gammares de sexes indifférenciés ont été testés. Classiquement, et déjà effectué dans l'étude précédente, seuls les gammares mâles sont étudiés pour éviter toute variation de sensibilité qui serait une conséquence plutôt due au sexe de l'organisme qu'à la contamination appliquée.

Comme les études précedemment effectuées sur les gammares mâles ont principalement montré des effets des nAg sur les performances fonctionnelles, dans cette étude, ce niveau d'organisation a une fois de plus été évalué. Comme les MXR testées dans les expérimentations précédentes n'avaient pas montré d'effets significatifs des nAg au niveau cellulaire, une approche plus large d'étude multibiomarqueurs couplant 14 biomarqueurs a été adoptée afin d'évaluer la mise en place des mécanismes de détoxication, l'existence de dommages cellulaire ou encore des modification des réserves énergétiques.

Mots clé : nanoparticules d'argent – *Gammarus roeseli.* – biomarqueurs - performance fonctionnelle - variabilité intraspécifique

Rappel du plan expérimental

Conception Le plan expérimental est un mélange entre les expériences 2(A) et 2(B). En effet, des gammares (*G. roeseli*) issus de 3 populations (site Rémilly, Oron et Marly) acclimatés à l'eau de la Méholle ont été exposés pendant 72h à deux concentrations (0,5 et 5 µg.L-1) d'$AgNO_3$, de nAg de 10 nm et de nAg de 60 nm. Des conditions témoins non contaminées (0 µg.L^{-1}) ont été étudiées pour chacune des populations (Figure 45).Chaque microcosme comportait 16 gammares des deux sexes et 8 disques de feuilles d'aulne conditionnés immergés dans 400 mL d'eau de la Méholle. En parallèle et pour les mêmes conditions de contamination et d'expérimentation, des dispositifs contenant uniquement des feuilles ont servi de témoins pour les mesures de performance fonctionnelle.

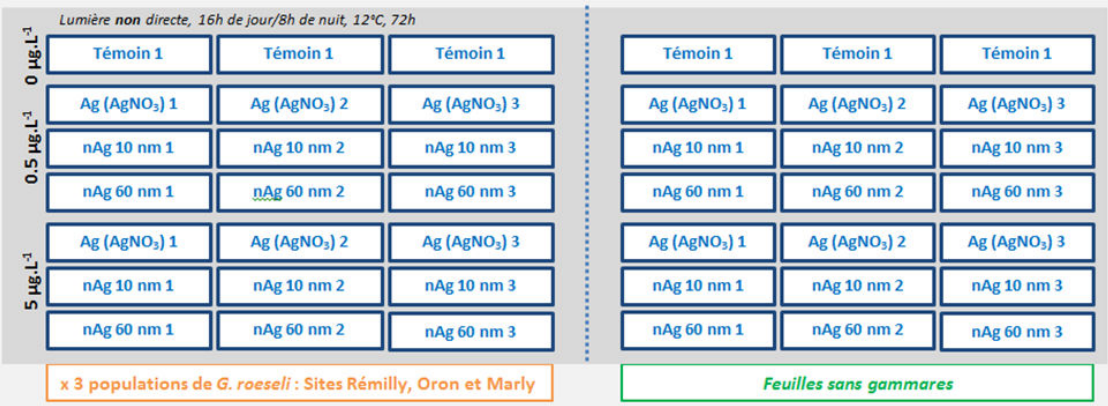


Figure 45 : Plan expérimental simplifié de l'expérience3, Cf.Chapitre 2, tableau 8)

Mesures : En amont de l'expérimentation, les diamètres des deux nanoparticules étudiées ont été vérifiés par des techniques d'imagerie permettant le suivi des mouvements des nanoparticules (Nanosight) (Cf. Chapitre 2,II.). La dissolution des nAg 10 nm et 60 nm a été étudiée et les résultats ont montré des taux respectifs après 72 h de 10% et 0% uniquement pour la concentration de 5 µg.L^{-1} (Cf. Chapitre 2, III.1.5.). Des volumes de 10 ml de milieu dans les solutions mères et dans les microcosmes après 72h ainsi que des pools de gammares et de feuilles ont été prélevés dans le but de doser leurs concentrations en argent total ainsi que l'argent dissous des milieux. Au niveau cellulaire, 14 biomarqueurs combinant des biomarqueurs antioxydants, antitoxiques et de réserve énergétique ont été étudiés sur un même pool de gammares. Au niveau fonctionnel, les activités de consommation et de production de FPOM ont été évaluées.

Traitement statistiques : Pour l'ensemble des résultats, des anovas à deux facteurs (contamination et population) ont été testées. Puis, pour étudier plus en détail les effets des 7 conditions d'exposition sur les gammares, au sein de chaque population et indépendamment les unes des autres, des anovas à un facteur (une par population) ont été effectuées et associées à des tests post-hoc TukeyHSD.

III.1. Résultats

III.1.1. Concentrations en argent dans l'eau, les feuilles et les gammares

Les résultats concernant les concentrations en argent total dans l'eau, les feuilles et les gammares ainsi que les concentrations en argent dissous ne sont pas encore disponibles.

III.1.2. Mortalité

Les concentrations d'exposition en argent n'ont pas induit de mortalités significatives des organismes témoins ainsi qu'entre les 3 populations étudiées (Tableau 13).

III.1.3. Niveau cellulaire : l'approche multibiomarqueurs

Sur les 14 biomarqueurs étudiés, seuls les dosages des métallothionéines n'ont pas encore pu être effectués dans un de nos laboratoires partenaires. Les valeurs des 13 autres biomarqueurs cellulaires (les concentrations en protéines contenues dans le broyat, en protéines de la fraction cytosolique, en cholestérol, en triglycéride, l'activité du système de transport d'électrons (ETS), les concentrations des hydropéroxydes lipidiques (LOOH), l'activité de la phosphatase alcaline (ACP), la capacité totale antioxydante (TAC), l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), l'activité de la glutathion péroxydase totale (Gpx), de la glutathion-s-transférase (GST), de la caspase (CSP) et de la catalase sont présentées dans le tableau 12 et les résultats des tests statistiques d'analyses de variance (anova) à deux facteurs sont réunis dans le tableau 13.

Les analyses statistiques ont montré une absence d'interaction entre les deux variables, ainsi qu'une absence de différences significatives, que ce soit entre les différentes conditions de contamination ou entre les 3 populations.

<u>Tableau 12 :</u> Moyennes (± écart-types) des différents valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur les 3 populations de G. roeseli exposées pendant 72h à 0, 0,5 et 5 µg.L^{-1} d'argent sous forme de $AgNO_3$ et aux nAg de 10 et 60 nm de diamètre.

		Population Site Rémilly			Population Site Oron			Population Site Marly		
		0 µg,L^{-1}	0,5 µg,L^{-1}	5 µg,L^{-1}	0 µg,L^{-1}	0,5 µg,L^{-1}	5 µg,L^{-1}	0 µg,L^{-1}	0,5 µg,L^{-1}	5 µg,L^{-1}
Protéine broyat (mg/gMF)	témoin	25,8 ± 10,5			25,2 ± 6,5			27,1 ± 7,4		
	Ag ($AgNO_3$)		24,5 ± 5,2	25,8 ± 6,9		25,3 ± 5,6	24,1 ± 5,3		25,3 ± 6,9	26,9 ± 3,2
	nAg 10 nm		24,3 ± 4,5	24,8 ± 9,7		24,9 ± 8,2	25,1 ± 5,2		22,3 ± 4,6	23,9 ± 3,6
	nAg 60 nm		21,9 ± 7,1	22,9 ± 10,2		24,4 ± 7,7	26,1 ± 8,4		26,9 ± 3,4	24,4 ± 10,4
Protéine fraction cytosolique (mg/gMF)	témoin	24,8 ± 6,8			23,9 ± 3,7			20,4 ± 7,6		
	Ag ($AgNO_3$)		23,6 ± 1,3	24,3 ± 3,1		23,4 ± 3,5	23,4 ± 1,1		23,1 ± 2,9	24,8 ± 3,1
	nAg 10 nm		23,1 ± 1,5	24,4 ± 3,4		24,2 ± 3,1	23,6 ± 0,8		20,7 ± 1,1	20,2 ± 4,3
	nAg 60 nm		22,1 ± 1,9	21,1 ± 6,8		24 ± 5,1	23,6 ± 3,2		24,8 ± 2,0	18,2 ± 9,0
Cholestérol (mg/gMF)	témoin	0,4 ± 0,1			0,5 ± 0,2			0,5 ± 0,1		
	Ag ($AgNO_3$)		0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0		0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0
	nAg 10 nm		0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1		0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,0		0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	nAg 60 nm		0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1		0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Triglycéride (mg/gMF)	témoin	5,7 ± 1,3			4,5 ± 1,2			5,0 ± 2,1		
	Ag ($AgNO_3$)		3,8 ± 1,1	5,3 ± 0,8		4,9 ± 1,8	3,5 ± 0,7		4,5 ± 0,6	4,7 ± 1,4
	nAg 10 nm		4 ± 0,5	4,5 ± 1,5		4,1 ± 1,3	5,3 ± 1,4		4,7 ± 2,2	5,0 ± 2,2
	nAg 60 nm		4,2 ± 1,1	4 ± 1,8		4,4 ± 1,7	5,6 ± 1,2		3,9 ± 1,0	4,9 ± 1,5
ETS (µmolO2,gMF-1,h-1)	témoin	26,1 ± 0,9			29,8 ± 0,4			27,8 ± 3,5		
	Ag ($AgNO_3$)		27,1 ± 1,7	28,7 ± 1,3		29,1 ± 3,0	26,5 ± 0,9		27,0 ± 1,9	28,3 ± 2,1
	nAg 10 nm		27,7 ± 2,4	28,5 ± 2,5		25,8 ± 2,4	26,7 ± 1,6		27,2 ± 2,9	27,1 ± 3,5
	nAg 60 nm		27,3 ± 2,0	29,5 ± 3,3		29,6 ± 4,7	29 ± 1,5		28,1 ± 1,2	29,0 ± 4,1
LOOH (nmol/gprot)	témoin	457 ± 97			451 ± 52			471 ± 90		
	Ag ($AgNO_3$)		439 ± 71	474 ± 73		458 ± 21	431 ± 24		441 ± 57	411 ± 69
	nAg 10 nm		477 ± 60	499 ± 149		429 ± 63	451 ± 53		483 ± 93	475 ± 70
	nAg 60 nm		466 ± 90	494 ± 142		463 ± 67	447 ± 25		409 ± 42	482 ± 96
ACP (µmol/gprot/h)	témoin	17,1 ± 6,9			17 ± 6,5			15,3 ± 4,3		
	Ag ($AgNO_3$)		16,8 ± 2,2	14,3 ± 2,9		15,3 ± 1,0	15,1 ± 1,0		15,9 ± 0,5	14,5 ± 2,2
	nAg 10 nm		15,6 ± 2,4	13,2 ± 5,2		16,7 ± 2,1	16,1 ± 4,1		18,6 ± 3,9	16,7 ± 2,8
	nAg 60 nm		15,1 ± 5,6	15,2 ± 3,7		14,6 ± 4,9	15,1 ± 2,2		15,3 ± 0,3	16,7 ± 1,9
TAC (µmolTeq/gprot/min)	témoin	34,2 ± 12,5			28,1 ± 3,1			31,6 ± 7,4		
	Ag ($AgNO_3$)		29,1 ± 13,3	31,3 ± 8,1		29,7 ± 7,3	31,5 ± 3,8		35,7 ± 6,4	33,3 ± 4,1
	nAg 10 nm		31,3 ± 1,7	31,4 ± 10,1		25,8 ± 3,9	31,5 ± 2,8		38,7 ± 12,0	39,3 ± 11,9
	nAg 60 nm		30,8 ± 2,5	39,4 ± 9,6		35,8 ± 10,9	33,5 ± 6,4		29,5 ± 2,2	44 ± 17,8
LDH (µmolNADH/gprot/h)	témoin	143,7 ± 14,9			165 ± 86,9			151,2 ± 9,8		
	Ag ($AgNO_3$)		143,5 ± 54,1	242,8 ± 14,7		138,5 ± 6,4	271,2 ± 238,5		158,7 ± 20,7	247,1 ± 205,9
	nAg 10 nm		133 ± 1,2	152,8 ± 62,0		172,8 ± 44,5	228,5 ± 118,1		181,5 ± 71,7	207,4 ± 69,0
	nAg 60 nm		179,7 ± 21,9	167,8 ± 66,9		150,7 ± 13,3	193,5 ± 51,0		93,5 ± 81,2	160,5 ± 22,5
Gpx (µmolNADPH/gprot/min)	témoin	330,5 ± 71,5			299,5 ± 2,5			428 ± 173,9		
	Ag ($AgNO_3$)		344,2 ± 92,7	329,0 ± 49,0		353 ± 47,7	397,1 ± 32,3		367,7 ± 117,3	363,8 ± 109,4
	nAg 10 nm		391,7 ± 28,8	339,2 ± 45,9		356,1 ± 58,6	416,2 ± 44,9		415,4 ± 106,1	414,0 ± 140,4
	nAg 60 nm		346,9 ± 54,0	438,2 ± 54,4		359,1 ± 61,2	376,6 ± 101,8		369 ± 35,0	491,1 ± 208,8
GST (µmolCDNB/gprot/min)	témoin	27,9 ± 10,5			47,3 ± 23,6			40,4 ± 12,6		
	Ag ($AgNO_3$)		30,2 ± 8,8	36,3 ± 3,8		30,7 ± 3,6	33,6 ± 7,7		31,2 ± 5,3	39,1 ± 22,7
	nAg 10 nm		29,9 ± 5,2	28,4 ± 9,9		28,1 ± 1,4	33,3 ± 10,3		30,8 ± 3,0	28,7 ± 3,4
	nAg 60 nm		37,9 ± 4,0	33,4 ± 13,8		28,6 ± 2,3	28,8 ± 0,6		33,2 ± 0,2	55,5 ± 25,5
CSP (µmolpNA/gprot/h)	témoin	1,0 ± 0,4			0,9 ± 0,3			1,1 ± 0,5		
	Ag ($AgNO_3$)		0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,5		1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,1		1,7 ± 0,7	1,2 ± 0,1
	nAg 10 nm		0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1		1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,1		1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,5
	nAg 60 nm		2,4 ± 3,7	1,2 ± 0,5		1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4		1,2 ± 1,2	1,3 ± 0,4
Catalase (mmole H2O2 consommé/gprot/min)	témoin	55,9 ± 61,1			65 ± 20,9			70,6 ± 33,2		
	Ag ($AgNO_3$)		51,6 ± 13,3	53,7 ± 10,0		62,5 ± 17,7	79,7 ± 36,1		76,2 ± 35,2	75,5 ± 40,9
	nAg 10 nm		61,5 ± 11,5	57,9 ± 25,4		83,7 ± 45,2	43,9 ± 28,1		33,3 ± 14,5	48,3 ± 5,6
	nAg 60 nm		51 ± 5,6	27,5 ± 14,1		40,6 ± 32,1	437 ± 60,2		49,2 ± 48,8	94,2 ± 32,5

Tableau 13 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl signifie degré de liberté, la valeur en gras est significative.

	Contamination (ddl=6)		Population (ddl=2)		Interaction (ddl=12)	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
[Protéine]$_{broyat}$	0,1	0,996	0,1	0,897	0,12	1
[Protéine]$_{f.\ cytosolique}$	0,46	0,829	1,5	0,235	0,35	0,972
[Triglycéride]	0,55	0,761	0,07	0,931	0,6	0,824
[Cholestérol]	0,2	0,973	0,05	0,943	0,38	0,962
ETS	0,71	0,639	0,07	0,928	0,722	0,722
LOOH	0,3	0,931	0,58	0,563	0,25	0,994
ACP	0,45	0,84	0,26	0,77	0,27	0,99
TAC	0,83	0,553	2,03	0,144	0,44	0,932
LDH	1,14	0,357	0,26	0,768	0,28	0,987
Gpx	0,87	0,525	1,6	0,213	0,41	0,95
GST	1,13	0,362	1,25	0,296	1,05	0,42
CSP	2,23	0,059	0,95	0,393	1,04	0,432
Catalase	0,4	0,869	1,17	0,321	1,03	0,44
Mortalité	1,93	0,097	0,14	0,864	1,06	0,409
Consommation	0,35	0,905	2,57	0,088	0,85	0,6
Production FPOM	0,83	0,552	3,76	**0,031***	1,27	0,268
Conso.-Production	0,76	0,605	2,63	0,084	1,03	0,442

III.1.4. Niveau fonctionnel

L'activité de consommation des gammares issus des 3 populations est présentée sur la figure 46. Le traitement statistique de l'anova à deux facteurs n'a pas mis en évidence d'effets significatifs de la contamination et de la population étudiée ni même d'interaction entre les deux (Tableau 13). Au sein de chaque population, seuls les gammares prélevés sur le site de Marly et exposés à 5 µg.L^{-1} de nAg de 60 nm ont présenté une activité de consommation des disques de feuille significativement supérieure à celles des organismes témoins.

Concernant la production de FPOM (Figure 47), une différence significative entre les 3 populations (Tableau 13, ddl=2, F-value= 3,76, p-value= 0,031) a été détectée par l'anova. En revanche, les tests post-hoc TukeyHSD qui ont suivi n'ont pas permis d'identifier les différences. En effet, les comparaisons Oron-Marly, Rémilly-Marly et Rémilly-Oron ont respectivement abouti aux p-values 0,998 ; 0,057 ; et 0,055. D'après ces résultats, il semblerait que la population de Rémilly se détache légèrement des deux autres (p-values proches de 0,05). Cette tendance, qui irait dans le sens d'une augmentation de la production de FPOM sur ce site reste néanmoins non significative.

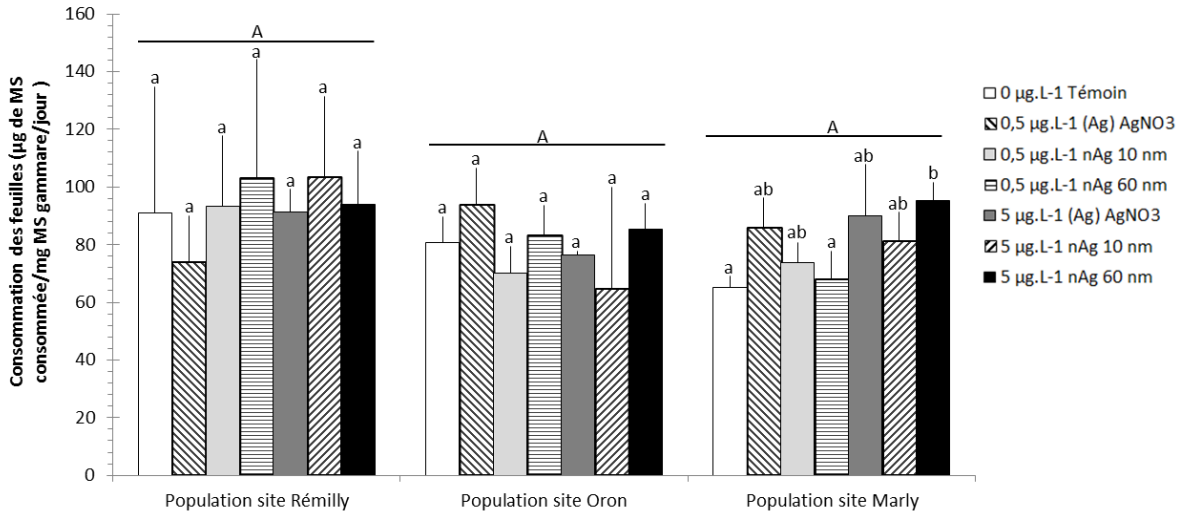


Figure 46 : *Moyennes (+ écart-types) des mesures de consommation des feuilles d'aulne par les 3 populations de G. roeseli après 72h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5µg.L^{-1}. Les lettrines en majuscule informent des différences statistiques entre les 3 populations, toutes conditions de contamination confondues et celles en minuscules informent des différences entre les conditions de contamination au sein d'une population. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.*

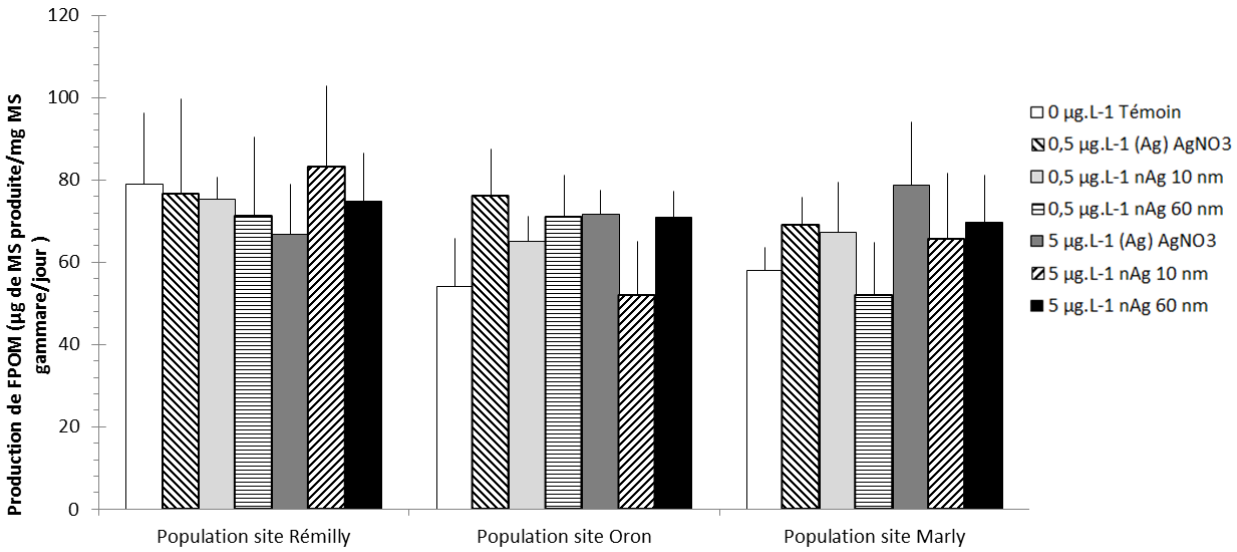


Figure 47 : *Moyennes (+ écart-types) des mesures de production de FPOM par les 3 populations de G. roeseli après 72 h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}.*

Les différences calculées entre les mesures de consommation des feuilles et de production de FPOM présentées sur la figure 48 sont toutes homogènes et ne révèlent aucune information complémentaire.

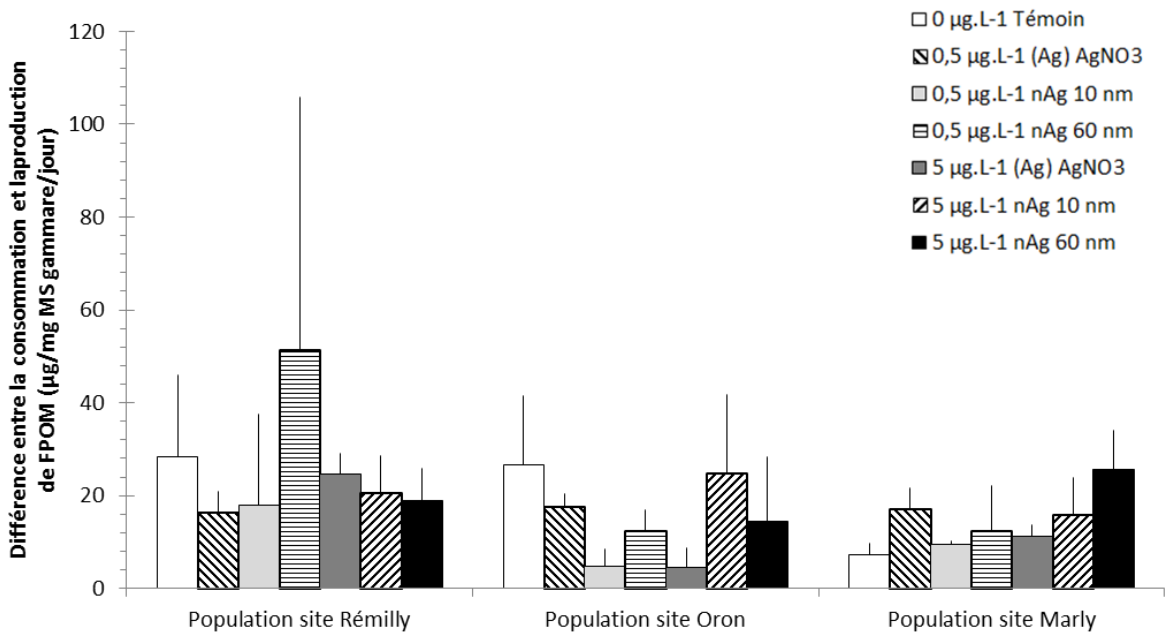


Figure 48 : Moyennes (+ écart-types) des calculs de différences entre la consommation de feuille et la production de FPOM pour les 3 populations de G. roeseli après 72 h d'une exposition au $AgNO_3$ et aux nAg 10 nm et 60 nm pour 3 concentrations : 0 ; 0,5 ; 5 µg.L^{-1}.

III.2. Discussion

Pour des concentrations et des conditions d'expositions environnementalement réalistes, l'ensemble des paramètres étudiés n'a pas révélé de réels effets de l'argent (nanoparticulaire ou dissous) sur les 3 populations de *G. roeseli.*

III.2.1. Niveau cellulaire : l'approche multibiomarqueurs

La littérature relate régulièrement l'intérêt des approches multibiomarqueurs, qui se sont avérées efficaces pour appréhender les effets de différents contaminants dont les métaux (tels que le cadmium ou le cuivre) sur différentes espèces de gammares (Correia et al., 2002; McLoughlin et al., 2000; Sroda and Cossu-Leguille, 2011; Vellinger et al., 2013). Cette approche a également été mise en œuvre afin d'évaluer les effets de l'exposition de gammares aux nanoparticules de dioxyde de cérium (*Gammarus roeseli ;* Garaud et al., 2015) et d'argent (Gammarus fossarum ; nAg 23 et 27 nm, Mehennaoui et al., en

préparation). Dans les deux cas, les auteurs ont conclu à une absence d'effet des nanoparticules sur les réponses antioxydantes, les réponses antitoxiques, les dommages cellulaires ou encore sur les réserves énergétiques des individus exposés. Ces résultats, tous obtenus pour de très faibles concentrations en nanoparticules sont cohérents avec ceux obtenus dans la présente étude et posent la question de savoir si le niveau cellulaire est le mieux adapté pour l'évaluation des effets des nanoparticules sur les gammares.

III.2.2. Niveau fonctionnel

L'ensemble des paramètres mesurés ne semble pas indiquer l'existence d'effets évidents de l'$AgNO_3$ et des nAg de 10 et de 60 nm sur les performances fonctionnelles des gammares issus des 3 populations. En effet, suite à une légère hausse de la consommation en feuilles des gammares issus du site de Marly après une exposition de 5 $\mu g.L^{-1}$ de nAg de 10 nm, aucune conséquence n'est ensuite observable sur leur activité de production de FPOM. Concernant la production de FPOM, malgré une légère tendance suggérant une activité plus importante des organismes prélevés sur le site de Rémilly, aucune conclusion sur des effets de l'argent ne peut être émise.

Pourtant, nos travaux sur *G. roseli* (Chapitre 3.I. et II.) ont montré que même sans modification de la consommation des feuilles, une baisse de la production de FPOM avait été détectée suite à l'exposition aux nAg de 10 nm et de 60 nm. Ces résultats, associés à une baisse de l'activité locomotrice des gammares, avaient suggéré qu'une exposition aux nAg pouvait conduire les organismes à adopter une stratégie de préservation et de stockage d'énergie pour pouvoir répondre aux coûts énergétiques importants mais nécessaires à la mise en place de mécanismes de détoxication.

Deux hypothèses expérimentales peuvent être émises quant à la variation des résultats obtenus entre ces deux expériences très fortement similaires. En effet, dans leur étude effectuée sur des gammares *G. roeseli* également prélevés dans la Nied française, Sroda and Cossu-Leguille, (2010) ont mis en évidence l'existence d'une variabilité de la sensibilité en fonction du sexe mais également en fonction des saisons et des paramètres biotiques et abiotiques associés. En se basant sur une approche multibiomarqueurs, les auteurs ont par exemple montré, à l'aide de nombreux prélèvements mensuels de gammares mâles et femelles effectués sur une année, que les femelles présentaient des concentrations en lipides et en protéines, ainsi qu'une activité de la glutathion peroxydase totale plus élevées suggérant des capacités de défense antioxydantes plus élevées que les mâles. Les auteurs ont également montré une corrélation de ces activités de défense et de ces quantités de réserves énergétiques avec la température et la période de l'année. Pour les deux sexes, les dommages cellulaires

tels que la lipoperoxydation lipidique étaient accentués en été parallèlement à une baisse des concentrations en lipides par rapport aux mois d'automne et d'hiver. Ils ont conclu que face à une contamination, les organismes seraient plus vulnérables en été, saison pendant laquelle leurs réserves énergétiques sont au plus bas. L'étude de Gismondi et al. (2012) a également confirmé cette sensibilité des organismes plus importante en été s'ils doivent faire face à une contamination. Dans les études se basant sur des mesures de biomarqueurs, l'existence de variations saisonnières a de nombreuses fois été observée notamment chez les bivalves en fonction de paramètres abiotiques comme la température ou biotique comme la reproduction (Hagger et al., 2010; Manduzio et al., 2004; Pain et al., 2007; Schmidt et al., 2013; Sheehan and Power, 1999; Vidal et al., 2002).

Les différences de sensibilité des gammares *G. roeseli* obtenus dans cette expérience et dans l'expérience 2 suite à une contamination aux nAg sont cohérentes avec les études de Sroda and Cossu-Leguille, (2010) et Gismondi et al. (2012). En effet, les organismes de l'expérimentation 2 ont été prélevés fin juin, en début d'été et ils devaient alors posséder des réserves énergétiques assez basses (paramètre non mesuré). Au niveau fonctionnel, l'étude a suggéré un important stockage énergétique des gammares pour faire face à la contamination aux nAg. Ce phénomène n'a pourtant pas été observé dans l'étude actuelle sur les mêmes gammares, cette fois-ci prélevés fin avril au printemps. L'étude des variations annuelles de concentrations lipidiques présentée par Sroda and Cossu-Leguille, (2010) a montré des différences significatives entre le mois de Juin et les mois d'Avril/Mai pendant lesquels les contenus lipidiques des gammares mâles et femelles sont 1,3 à 2 fois plus élevés.

Dans cette expérience, les gammares étudiés possédaient alors probablement des réserves énergétiques initiales suffisamment abondantes pour palier à la contamination aux nAg contrairement aux organismes étudiés dans l'expérience 2. De plus, dans cette étude, les pools de gammares étaient composés d'organismes mâles et femelles contrairement à l'expérience 2 n'ayant testé que des mâles. La littérature ayant montré que, chez les gammares, les activités initiales des biomarqueurs étaient plus élevées chez les femelles qui sont alors plus résistantes que les mâles peut expliquer ici l'absence totale d'effets pour de faibles concentrations d'argent.

III.2.3. Variabilité intraspécifique

Pour l'ensemble des paramètres étudiés, malgré la présence d'une différence significative concernant l'activité de production des FPOM, aucune tendance franche n'a été observée entre les 3 populations de *G. roeseli*. Pourtant, plusieurs études ont démontré l'existence de différences génétiques entre

populations de gammares induisant de possible variation de sensibilité (Feckler et al., 2012; Meyran et al., 1998; Westram et al., 2013). Cependant, dans leur étude sur les effets du cadmium sur différentes espèces et populations de gammares, Boets et al. (2012) ont montré que malgré une variabilité interspécifique observée, aucune différence significative n'avait été observée entre les populations de *G. fossarum* provenant de sites pollués ou non pollués. Afin d'évaluer l'existence d'une variabilité interpopulationnelle de réponse à une contamination environnementalement réaliste, les prochaines études devraient s'intéresser à une plus large gamme de populations issues de milieux de différentes qualités. Pour évaluer des variations de sensibilité, il faudrait en amont également établir les périodes de l'année pendant lesquelles cette sensibilité semble être la plus élevée au sein de l'espèce étudiée.

Conclusion

Dans cette étude, les contaminations en argent sous forme d'$AgNO_3$ ou de nanoparticules de 10 et 60 nm de diamètre sur *G. roeseli* n'ont pas entrainé d'effets notables. Des variations saisonnières des réserves énergétiques et activités des biomarqueurs impliqués dans les mécanismes de défense ainsi que des tolérances plus élevées des gammares femelles peuvent en partie expliquer l'absence d'effet des nAg sur ces gammares. Pour les 3 populations, aucune variabilité n'a été observée puisque les organismes témoins ou contaminés ont systématiquement présenté des concentrations ou des niveaux d'activité homogènes pour l'ensemble des paramètres étudiés. Afin de mieux appréhender cette variabilité interpopulationnelle, des travaux à plus large échelle sont nécessaires et doivent prendre en compte des panels plus importants de populations issues de milieux de qualités différentes et beaucoup plus éloignés géographiquement, tout en se positionnant à une période de l'année où les gammares sont les plus sensibles.

IV. Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology of *Gammarus roeseli* – *Expérience 3* *(Publication en preparation)*

Contexte

Suite aux résultats obtenus sur les gammares de l'espèce *G. roeseli* concernant les diminutions de production de FPOM des organismes exposés aux nAg sans effets sur leur consommation (étude II.), une hypothèse d'une mise en réserve de l'énergie avait été émise. Afin d'étudier cette hypothèse plus en détails, l'objectif de cette étude a été de mesurer plusieurs biomarqueurs de réponses énergétiques sur *G. roeseli*.

Toujours dans l'étude présentée en section II., sur la production de FPOM, la plus petite taille de 10 nm de diamètre avait présenté des effets plus précoces à la plus faible concentration de 0,5 $\mu g.L^{-1}$ par rapport aux nAg de 60 nm dont les effets n'avaient été observés qu'à 5 $\mu g.L^{-1}$. Dans cette étude, afin d'évaluer si la taille des nAg est un critère conditionnant leurs effets sur les gammares, des nAg de 10, 20, 40, 60 et 100 nm, toutes sphériques, enrobées de citrate et fournies par Nanocomposix ont été testées pour 4 concentrations de 0, 0,5, 2,5 et 5 $\mu g.L^{-1}$.

En préambule, et afin de mettre en place et d'optimiser la mesure d'un biomarqueur de consommation en oxygène des gammares, un test a été effectué en amont. Il a consisté à exposer durant 72 h quelques gammares nourris à 5 $\mu g.L^{-1}$ de nAg de 10, 20, 60 et 100 nm. Les résultats, plus que concluants et présentés dans la figure 49 ci-dessous avaient montré un effet des petites nAg sur la respiration des gammares et ont justifié l'utilisation de ce biomarqueurs dans cette étude.

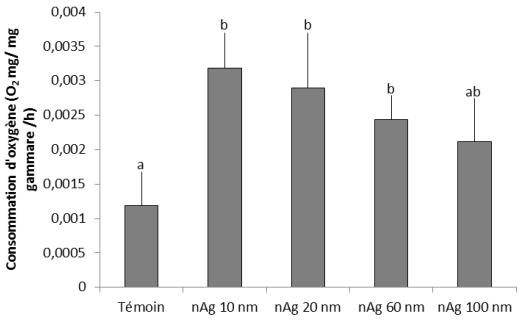


Figure 49 : Consommation d'oxygène de G. roeseli exposés à plusieurs tailles et concentration de nAg (n=4). Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents (anova à 1 facteur, TukeyHSD).

Mots clés : nanoparticules d'argent – *G.roeseli* – biomarqueurs énergétiques – consommation d'oxygène

Rappel du plan expérimental

Dispositif expérimental : Selon les mêmes protocoles que ceux employés dans les études précédentes, des *G. roeseli* ont été acclimatés dans de l'eau issue de la rivière La Méholle avant d'être exposés durant 72 h à 4 concentrations (0, 0,5, 2,5 et 5 µg.L^{-1}) de 5 tailles de nAg sphériques enrobées de citrate (10, 20, 40, 60 et 100 nm) comme décrit dans la figure 50. Chaque microcosme était composé de 10 gammares mâles et de 4 disques de feuilles d'aulne conditionnées immergés dans 300 mL d'eau de la Méholle. En raison d'exigences techniques, l'exposition à chacune des 5 tailles de nAg (4 concentrations x 4 réplicats) a été lancée en différé (décalage de 1 journée).

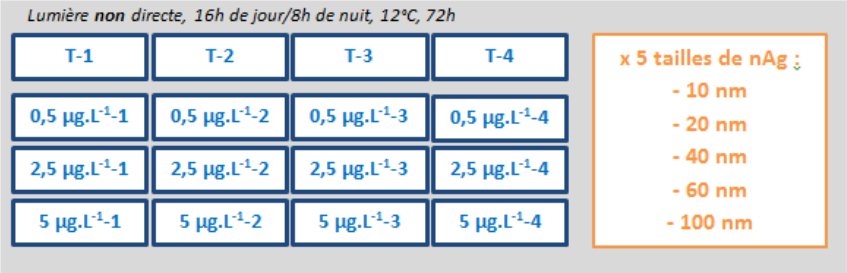


Figure 50 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 3, Cf.Chapitre 2, tableau 8)

Mesures : Les diamètres hydrodynamiques des 5 tailles de nAg ont été vérifiés dans de l'eau déminéralisée puis évalués dans l'eau de la Méholle. Après 72 h d'exposition, les concentrations en argent dissous ont été mesurées dans l'eau ainsi que les concentrations en argent total dans l'eau et les gammares. Concernant les effets des nAg sur les gammares, sur un même organisme et dès son prélèvement du milieu, des mesures de consommation en oxygène suivies de mesures de ventilation ont été effectuées sur l'organisme vivant, puis des mesures de concentrations en triglycérides, protéines, cholestérol et d'activité ETS ont été effectuées sur le broyat après décongélation. En parallèle, des mesures de concentration en argent dans les feuilles, de locomotion et de production de FPOM ont aussi été effectuées ; ces mesures sont présentées dans la section « informations supplémentaires » à la fin de cette partie.

Traitement statistiques : Pour les figures ajoutées en informations, une anova à un facteur a d'abord été effectuée entre les 5 conditions témoins puis 5 anovas à un facteur soit une par taille de nAg ont été testées suivies de TukeyHSD. Pour la figure 53 représentant les consommations en oxygène associées au nombre et à la surface des nAg, des anovas à un facteur ont été réalisées entre les 3 concentrations.

Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology of *Gammarus roeseli*

Jennifer Andreï[1], François Guérold[1], Jonathan Bouquerel[1], Simon Devin[1], Kahina Mehennaoui[1,2], Sebastien Cambier[2], Arno C. Gutleb[2], Laure Giambérini[1,3], and Sandrine Pain-Devin[1]

[1] Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) - Université de Lorraine, UMR 7360 CNRS, UFR SciFA, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

[2] Environmental Research and Innovation (ERIN) Department, Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) – 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

[3] International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology (iCEINT), Aix en Provence, France

1. Introduction

Thanks to impressive properties, the nanotechnologies are widely used in many technical applications and consumer products generating a great economic interest. Silver nanoparticles (nAg) are particles with dimensions less than 100 nm that present a broad spectrum of antimicrobial and optical properties. They are consequently among the most exploited in many applications such as biomedical, food packaging, cosmetics, textiles, coating or paints (Addo Ntim et al., 2015; Durán et al., 2007; Keller et al., 2013; Künniger et al., 2014; Marambio-Jones and Hoek, 2010). Several studies pointed out the risk of potential nAg release in the environment throughout their entire life cycle, suggesting emission during their manufacturing, their incorporation into products, and especially during their use, disposal and recycling (Benn and Westerhoff, 2008; Gottschalk and Nowack, 2011; Kaegi et al., 2010; Keller et al., 2013; Sun et al., 2014). To date, the techniques available and the lack of practical approaches do not allow for large scale and routine quantification of nanoparticle emissions and concentrations in the environment, making mathematical modelling the preferred tool for predicting the environmental concentrations (Gottschalk and Nowack, 2011). Sun et al. (2014) calculated the predicted environmental concentrations (PEC) for nAg in the European surface water in the range of ng L^{-1} as previously estimated by Gottschalk et al. (2009). Now, one of the main priorities is to address an appropriate risk assessment for freshwater ecosystems by using environmentally realistic exposure concentrations and media. Even if, for aquatic organisms, the risk quotient based on the PEC was low for nAg (Gottschalk et al., 2009),

further investigations are still needed because the growing production and use of the silver nanomaterials may lead to an increase of their environmental concentrations.

The risk may be associated with the nanoparticulate form of silver, and/or, with the release of dissolved silver by oxidative dissolution which strongly depends on the physico-chemical characteristics of the water and on the nAg size (Lee et al., 2012; Liu and Hurt, 2010; Peretyazhko et al., 2014). Silver is recognised as highly toxic for aquatic organisms even at very low concentrations (Arce Funck et al., 2013; Ratte, 1999). Many studies showed that nAg could exert biological effects that could not be attributed to the release of dissolved silver, suggesting a real toxicity of the nanoparticulate form (Chae et al., 2009; Gomes et al., 2014; Griffitt et al., 2008). Moreover, it's now well admitted that nAg toxicity is size-dependant, increasing toxicity being associated with decreasing size (Carlson et al., 2008; Hoheisel et al., 2012). Silver nanoparticles were found to induce DNA damages, cytotoxicity, oxidative stress, antitoxic and antioxidant responses in fishes and bivalves (Chae et al., 2009; Farkas et al., 2011; Lapresta-Fernandez et al., 2012; Garaud et al, *in prep*).

Freshwater gammarids are now widely used in ecotoxicological surveys because they are widespread in various freshwater systems, easy to handle during laboratory testing and especially because they allow assessing effects of pollutants both on the organism itself and on the ecosystem functioning (Andreï al., *in press*). Surprisingly, studies about the effects of nanoparticles on freshwater gammarids are scarce. The present work used *Gammarus roeseli* (Gervais, 1835) as a model to study ecophysiological effects of nAg.

In a potential scenario of release, the gills of aquatic organisms appear to be in direct contact with the contaminant and could be primarily impacted. Effects of nAg on the gills and on the respiratory process are well documented for fish organisms (Bilberg et al., 2010; Cowart et al., 2011; Farkas et al., 2011; Griffitt et al., 2012). It has been shown for example, that nAg could increase the gill thickness and reduce oxygen transport, leading to an internal organism hypoxia (Bilberg et al., 2010; Griffitt et al., 2012). Other studies conducted in gammarids reported effects of metals on ventilation (Arce Funck et al., 2013; Felten et al., 2008) or on electron system transport activity (ETS, Schmidlin et al., 2015). Here we hypothesized that nAg may affect ecophysiology of *G. roeseli* by altering respiratory process and in consequence energy supply. In this context, we investigated ventilation activity and oxygen consumption of gammarids. To look at energy supply, we measured ETS activity indicating the use of oxygen in mitochondria to complete the production of ATP and we assessed the concentrations of energetic

reserves (triglycerides, proteins, cholesterol) as they are substrates for cell to produce ATP (Garaud et al., 2015; Sroda and Cossu-Leguille, 2011).

The present study provides a realistic scenario of contamination in a freshwater ecosystem. Gammarids were exposed to very low range of nAg concentrations in natural water retrieved from a stream and supplemented with food. The objectives were first to evaluate the effects of nAg on respiratory and energy supply processes and to determine whether this set of energetic endpoints could be an effective tool to assess the effects of nAg in gammarids. Finally, we also aimed to determine whether the effects were dependent on the concentration and the size of nAg.

2. Material and methods

2.1 Silver nanoparticle characterization

Five sizes of spherical nAg (10, 20, 40, 60 and 100 nm) suspended in a citrate buffer stabilizer capping agent were purchased from Nanocomposix Europe (Prague, Czech Republic). The stock solutions, with a silver concentration of 0.02 mg mL^{-1} were stored in the dark at 4°C. Hydrodynamic diameters of the tested nAg were assessed by using a particle particle tracker (NanoSight 500, Malvern Instrument Ltd, UK). The nAg size distribution was also characterized in the natural water from La Meholle used for the exposure. Those measurements were performed with the 5 nAg sizes at 5 µg L^{-1}but also at a higher optimal concentration of 100 µg L^{-1}.

2.2. Biological material collection and maintenance

The water used during the experiment was sampled in November 2014 in a reference stream La Méholle (Void-Vacon, N-E France). The water was filtered using glass microfibre filters (90 mm diameter, pore size 1.2 µm, Whatman®) to remove suspended particles and stored at 12°C in the dark (48 h before the start of the experiment).

Gammarus roeseli (Crustacea, Amphipoda) were collected from the river La Nied (Remilly, N-E France). Male gammarids without observable parasit were selected. They were acclimated for 3 days by gradual replacement of their water of origin by the test water (La Méholle). Then, they were let in the La Méholle water during 6 to 10 days before being used. During all the acclimation period, they were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) with a 16:8 h light:dark cycle.

During the experiment, the gammarids were fed with senescent dried alder leaves. Leaf-disks of 16 mm diameter were cut, placed in nylon bags (mesh-size 500 µm) and immersed in the La Méholle stream

to allow them to be conditioned by microorganisms. After 12 days of conditioning, the disks were retrieved and dried during 48h at 105°C before being used.

2.3. Exposure design

All exposures were performed under controlled parameters [12.1 ± 0.2°C; 16:8 h light: dark cycles]. Test solutions were prepared by diluting the nAg stock suspension (0.02 mg mL^{-1}) with filtered and oxygen saturated La Méholle water to obtain nominal concentrations of 0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}.

For each treatment (5 nAg sizes 10, 20, 40, 60 and 100 nm and 4 concentrations 0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}), a 48 h silver saturation of polypropylene microcosms was applied with the relevant exposure concentrations (4 replicates/condition). Then, the preconditioning solution was replaced by 300 mL of exposure solution per microcosm (each containing 4 alder discs). Ten gammarids per replicate sample were then exposed for 72 h. The saturation and exposure experiments were started with a delay of 24 h between each size. In each microcosm (n= 80), 2 water samples of 4 mL were removed after 72 h to determine the final $[Ag]_{total}$ and $[Ag]_{dissolved.}$ Samples were taken from middle of the water column taking care not to remove the particles that have settled at the bottom. Dissolved Ag was separated from the nanoparticulate form using Amicon® ultra-15 centrifugal filter devices (porosity 3 kDa, centrifuged for 40 min at 5,000 x g). Concentrations were measured using Atomic Absorption Spectroscopy (AAS, Detection Limit: 0.1 µg L^{-1}) analysis after 1% HNO_3 acidification. The percentage of dissolution was then calculated as the ratio of dissolved [Ag] to total [Ag]. At the end of the experiment, gammarids were retrieved, used for analyses or stored at -80°C before treatment.

2.4. Biological endpoints

2.4.1. Survival

Every 24h, the number of living *G. roeseli* was counted and the dead organisms were removed.

2.4.2. Silver concentration in gammarids

After 72h of nAg exposure, a pool of 3 organisms per replicate were randomly collected, dried on filtered paper, frozen at -80°C, dried during 48h at 105°C and weighed. The samples were digested in nitric acid (HNO_3, LGC Standards) and hydrogen peroxide (H_2O_2, Fisher scientific). The mineralization was performed with a microwave reaction system before silver analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS, XSERIES 2^{I}, ThermoFisher Scientific). Silver concentrations in gammarids were expressed as µg g^{-1} of dry mass.

2.4.3. Respiration and energetic markers

2.4.3.1. Oxygen consumption

Assessment of gammarids respiration were performed with a respirometer Unisense Microrespiration System (UNISENSE A/S, Aarhus Denmark) which is able to measure the oxygen consumption in real time in small water volumes with very low detection limits. At the end of the experiment, one gammarid per replicate sample was gently collected and disposed in a 2 mL chamber containing uncontaminated La Méholle water, filtered and oxygen saturated. The oxygen concentration decrease corresponding to the gammarid oxygen consumption in the chamber was measured with a microsensor during 30 minutes. Two simultaneous analyses on two gammarids were possible by using 2 different chambers and 2 microsensors. The consumption curves were viewable online in real time. The oxygen consumption rates were then calculated with linear regression performed in regular curve portions and the results were expressed as mg O_2/mg gammarid dried mass/hour.

The relationship between oxygen consumption and silver concentrations in gammarids (see section 2.4.2.) was assessed thanks to a linear model.

2.4.3.2. Ventilation

Measurements of gammarids ventilation were performed by counting the pleopod beating frequency according to Felten et al. (2008). Pleopods are appendages in constant beating to permit a better oxygen uptake by the gills (Sutcliffe, 1984). After the oxygen consumption measurements, the gammarids were removed from the analytic chamber and transferred individually in a well of a 24-wells microplate containing 2 mL of the uncontaminated filtered La Méholle water. After 30 seconds of acclimation, video recordings of the pleopod beating were performed during 30 seconds. The gammarids were then retrieved and stored at -80°C before energetic biomarkers analysis. The videos were analysed several days after by counting the number of beating during 10 seconds and 3 times for a same organism. The results were calculated as the ratio of the pleopod beat/min in contaminated gammarids to that in control organisms and expressed as percentage

2.4.3.3. Energetic biomarkers

Gammarids used for the oxygen consumption and the ventilation measurements and then stored at -80°C were defrosted at 4°C, gently dried on an absorbent paper and weighed. Then, as described in Garaud et al., *in prep* and Sroda and Cossu-Leguille, (2010), they were immersed in a phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors) with a 4/1 volume/weight ratio before to be mechanically

grounded during 2 rounds of 30 seconds with a beadbeater (Retsch MM301). The homogenates were then centrifuged during 5 minutes at 250 g and 4 °C to remove the cuticule fragments. The supernatants were recovered for biomarker measurements with the automated colorimetric methods and the protocols developed by Garaud et al. (2015) on the Konelab 20-XTi (Thermo Scientific).

First, a Scal bovine-based serum purchased from Thermo-Scientific was used to performe calibrations curves for the protein, triglyceride and cholesterol analyses. The concentrations were then measured by using the ready-to-use reagents and the protocols established by (Garaud, 2015) for *Dreissena polymorpha*, and adapted for gammarids. Results were expressed in mg. g fresh weight^{-1} (mg.gfw^{-1}).

Measurements of the electron transport system (ETS) mitochondrial activity were also performed with the same supernatant sample following the (Garaud, 2015) method adapted from Owens and King, (1975) and De Coen and Janssen, (1997) and automated on the Konelab. The results were expressed in in µmol O_2. g fresh weight^{-1}.h^{-1} (µmolO_2/gFW/h).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.1.0 (R Development Core Team, 2014). Parametric conditions before the one-way anova were verified for silver concentrations in gammarids but not for those in water, so respectively a one-way anova and a Kruskal-Wallis ANOVA were performed. For oxygen consumption data, a one way anova was performed to test the difference between the 5 control conditions and because the measurements were performed with a 24 h delay between each size conditions, a one-way anova was conducted for each of them (n=16). When significant differences were evidenced, post-hoc tests were performed (Tukey HSD for Anova, kruskalmc function of the pgirmess library for the non-parametric data). To assess general patterns of respiration and energetic markers response to nAg size and concentration, we performed a linear discriminant analysis (function lda of the library MASS and discDA of the library DiscriMiner). The overall significance of the model was based on the Wilk's statistic following a MANOVA.

3. **Results**

3.1. Silver nanoparticle characterization

The hydrodynamic diameters of the nAg measured in deionized water were consistent with the manufacturer measurements (Table 1). The particle size distribution in the samples of La Meholle spiked with 5 µg L^{-1} of nAg were similar to particle size distribution curve of the La Meholle river without any nAg indicating that concentrations were under the limit of detection. However, the nanoparticle

characterization at 100 µg L^{-1} of the 10, 20, 40, 60 and 100 nm nAg in La Meholle water showed particles with hydrodynamic diameters of 56 ± 3.1, 84 ± 16.8, 90 ± 4.7, 69 ± 6.1 and 88 ± 5.4 nm respectively, indicating that La Meholle water had modified the nAg size distribution (SI Figure S1).

Table 1: *Hydrodynamic diameters provided by the manufacturer Nanocomposix and hydrodynamic diameters measured with a NanoSight 500 (Malvern Instrument Ltd, UK) before the start of the experiment.*

nAg sizes	Hydrodynamic diameter (nm)	
	Nanocomposix	Nanosight
10nm	14.6	14 ± 1.3
20nm	27.2	24 ± 1.2
40nm	41.8	46 ± 0.3
60nm	62.5	58 ± 1.0
100nm	106.5	92 ± 2.6

3.2. Concentrations of silver in water and in gammarids

At the start of the experiment, the mean silver initial concentrations measured in the test solutions were checked for 0, 0.5, 2.5 and 5 µg.L^{-1}: <DL, 0.10 ± 0.07, 1.34 ± 0.18 and 3.56 ± 0.52 respectively.

The total silver concentrations (mean ± SD) measured in the water at the end of the experiment were summarized in the Table 2. After a significant difference detection between all the conditions (Kruskal-Wallis test, chi-squared=59.9, 15 df, $p<0.001$), the *post-hoc* analysis performed on the means of the exposure concentrations detected independently of the nAg size, observed statistical differences between all the concentrations after 72h, excepted between the control and 0.5 µg L^{-1} concentrations (Kruskalmc test, >0.05).

Table 2: *Mean (± S.D.) total silver concentration (µg.L^{-1}) in the water exposed to 4 nominal concentrations (0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}) of 5 nAg size (10, 20, 40, 60 and 100 nm) after 72 h. DL: detection limit (0.1 µg L^{-1}).*

nAg sizes	0 µg L^{-1}	0.5 µg L^{-1}	2.5 µg L^{-1}	5 µg L^{-1}
10 nm	< DL	0.28 ± 0.05	1.06 ± 0.22	2.00 ± 0.33
20 nm	< DL	0.15 ± 0.06	0.98 ± 0.25	3.01 ± 0.93
40 nm	< DL	0.30 ± 0.08	1.88 ± 0.81	4.15 ± 0.70
60 nm	< DL	0.33 ± 0.05	1.40 ± 0.36	2.95 ± 0.21
100 nm	< DL	0.45 ± 0.06	1.35 ± 0.29	3.58 ± 0.91

The presence of dissolved silver was monitored and its concentration was under the AAS detection limits of 0.1 µg L^{-1} for all the conditions and the totality of the samples.

Concentrations measured in gammarids exposed to 5 µg L^{-1} of nAg 10 nm and 40 nm were respectively 5 and 3 times higher compared to the control (figure 1). Indeed, for the nAg 10 nm conditions, the concentration measured at 5 µg.L^{-1} were also 6 times higher compared to the concentrations at 0.5 µg L^{-1}. The other exposure conditions did not induce silver concentration in *G. roeseli* different from the control.

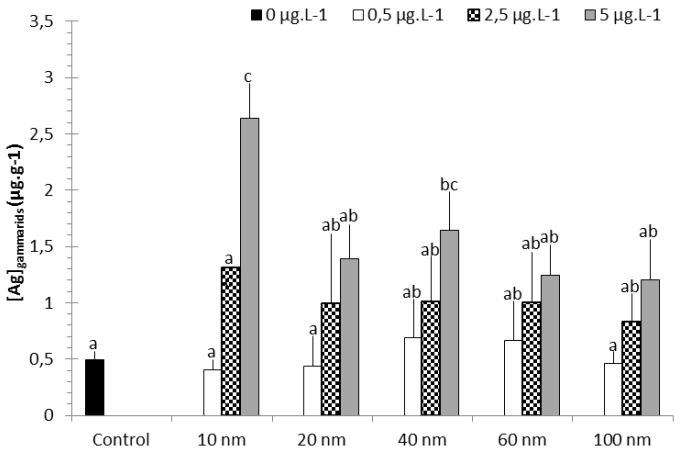


Figure 1: *Mean (+ S.D.) silver concentration in gammarids exposed to 4 concentrations (0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}) of 5 nAg sizes (10, 20, 40, 60 and 100 nm) after 72 h. Groups with the same letters are not significantly different (one-way anova; Tukey HSD; n=3).*

3.3. Biological endpoints

3.3.1. Survival

Survival rates ranged from 83% to 100% and the exposure to nAg did not induce significant gammarid mortality compared to the control.

3.3.2. Discriminant analysis performed with respiration and energetic responses

The discriminant analysis performed with the data obtained from 6 energetic markers (detailed values in SI Table S1) is presented in the Figure 2.

The LDA evidenced that energetic markers were able to discriminate between nAg size and concentration (MANOVA, Wilk's Λ = 0.056, df=19, p=1.7 10^{-5}. The first two discriminant functions explained 86% of the overall variance, while the error rate remaining quite high (56%). That could be easily explained by the similarity of responses between the control of each nAg size, leading to numerous

misclassifications. The LDA also show that the smallest in the nAg, the higher is the dispersion according to concentration in the first axis.

Finally, in the set of energetic biomarkers, only one biomarker was significant: the oxygen consumption with a p-value =2.18 10^{-14}.

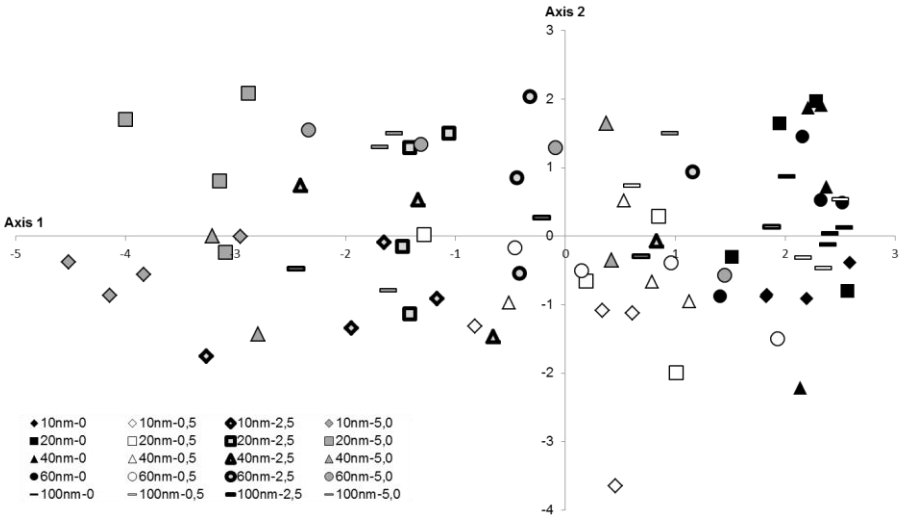


Figure 2: *Discriminant analysis coupling 6 energetic biomarker responses (oxygen consumption, ventilation, ETS activity and concentrations of triglyceride, protein and cholesterol) measured on one G. roeseli for gammarids exposed to 4 concentrations (0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}) of 5 nAg sizes (10, 20, 40, 60 and 100 nm) after 72 h (n=4; Wilks p-value=1.7 10^{-5}; error rate= 0.56).*

3.3.3. Oxygen consumption

Significant differences between concentrations were detected for 3 nAg sizes out 5 (Fig.3): 10 nm (one way anova, F=47.55, 3 df, p<0.001), 20 nm (one way ANOVA, F=19.03, 3 df, p<0.001) and 40 nm (one way anova, F=8.35, 3 df, p<0.001). For the 10 nm conditions, the gammarid oxygen consumptions were significantly different between all the exposure concentrations with the highest oxygen consumption at the nAg concentration of 5 µg L^{-1}. For the nAg 20 nm conditions, exposure at 2.5 and 5 µg L^{-1} induced a significantly higher oxygen consumption compared to the control. For the nAg 40 conditions, the gammarid oxygen consumption was statistically higher after exposure at 2.5 and 5 µg L^{-1} than after exposure to the control.

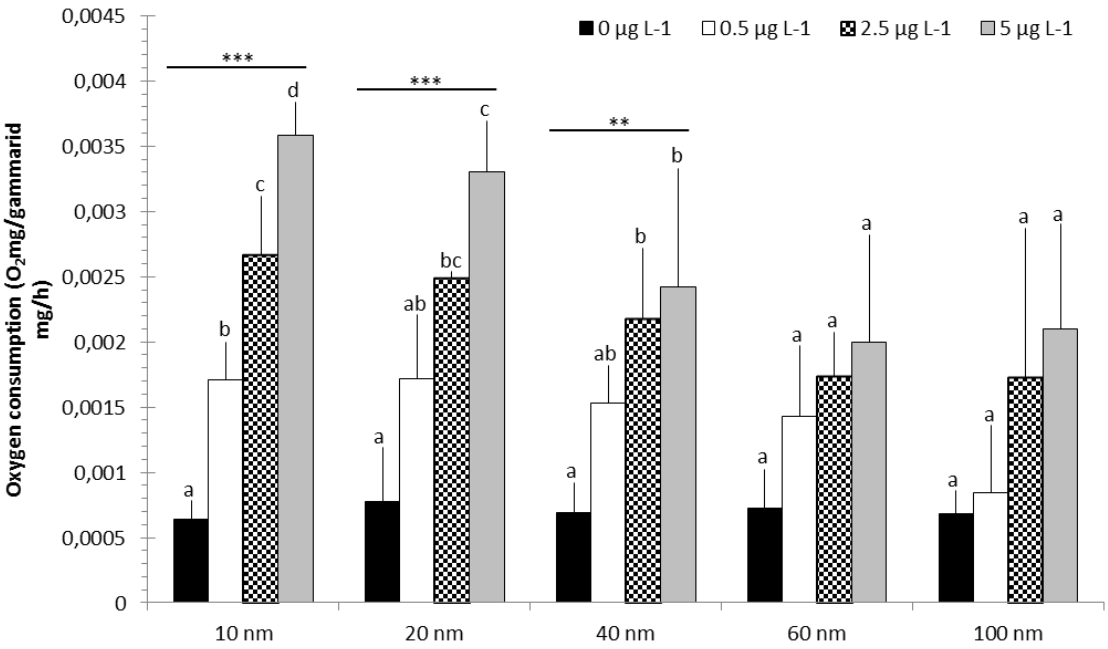


Figure 3: *Mean (+ S.D.) oxygen consumption of G. roeseli exposed to 4 concentrations (0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}) of 5 nAg sizes (10, 20, 40, 60 and 100 nm) after 72 h. For each nAg size, asterisks represent the one-way anova p-value results of the concentration effects and the groups with the same letters are not significantly different (Tukey HSD; n=4).*

3.3.4. Relationship between nAg gammarid concentrations and oxygen consumption

The linear model built between the data obtained for the silver concentrations in *G. roeseli* and the oxygen consumption was significant (F=33.88, 1 and 14df, p-value<0.001) and shows a strong effect of nAg concentration measured in gammarids on individual oxygen consumption.

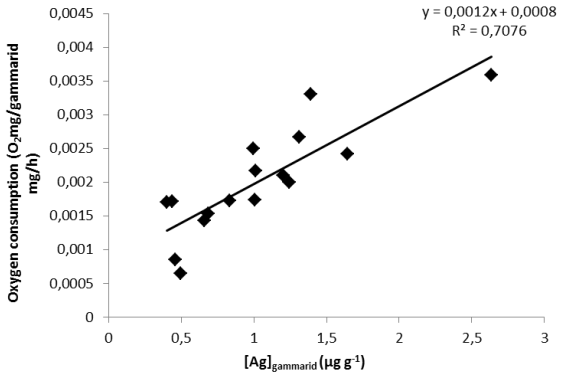


Figure 4: *Linear model built between the data obtained for the silver concentrations in G. roeseli and the oxygen consumption*

4. **Discussion**

4.1. Silver characterization and concentrations

The exposure conditions and especially the very low nAg concentrations tested in the present study did not allow us to determine the size distribution of particles in our experimental media because of the detection limit of the particle tracker Nanosight (10^8 particles mL^{-1}). In order to investigate the effect of La Meholle water on the particle distribution in our experimental water, the tracking analysis was performed at higher concentration 100 µg L^{-1}) which is environmentally unrealistic but brings insight about behavior of nanoparticles in this particular media. The nAg hydrodynamic diameters measured in the complex matrix of La Meholle water were larger than pristine nAg showing a probable complexation and agglomeration of the nAg related to the water physicochemical properties. Gao et al. (2009) showed that the water chemistry (e.g: dissolved organic carbon, ionic strength and pH) might affect the nanoparticle dispersion and size distribution. For example, pristine nAg of 20 to 30 nm displayed diameters of approximately 100 nm when placed in deionized water and of approximately 400 nm in the Suwannee river water. Natural water also contains natural organic matter like fulvic and humic acids that are known to play a key role in nanoparticle sorption and could mitigate their bioavailability (Bernhardt et al., 2010; Maurer-Jones et al., 2013). Regarding our results and those of previously published works, even if the measurements were not done at the same exposure concentrations as we used for gammarids, we could nevertheless assume that the effects observed on gammarids might be due to complexed or aggregated nanoparticles.

Silver nanoparticles can also release ionic silver by oxidative dissolution (Liu and Hurt, 2010) and there is a general agreement that toxicity is partly due to the slow release of ionic silver from nAg (Behra et al., 2013; Kittler et al., 2010). The dissolution rate depends on the nanoparticle itself (size, coating, surface functionalization), but also on the water chemistry (temperature, pH, presence of Ag^+. In the present study, no dissolution was detected for the 5 nAg sizes tested in the stock solutions and in each microcosm after 72h. As our experiments were conducted by adding nanoparticles in natural river water, it is suggested that physico-chemical conditions did not favor nAg dissolution: low temperature (12°C), natural river pH (8.1) and the presence of natural organic matter may explain the absence of dissolution process (Liu and Hurt, 2010).

The measurements of Ag concentrations in *G. roeseli* showed that after 72 h of nAg exposure, silver was present only in gammarids exposed to the highest concentration of 5 µg.L^{-1} of the two sizes of 10 and 40 nm. For the smallest nAg 10 nm size, the concentration in gammarids was dependant of the initial exposure concentration, with a silver concentration in *G. roeseli* at 5 µg.L^{-1} significantly higher than at 0.5

µg.L^{-1}. In the present study we did not investigate whether the presence of silver results from bioaccumulation and whether silver is in nanoparticulate form in gammarids. Several studies have already documented the uptake and accumulation of Ag or nAg in aquatic organisms such as crustacea, gastropod or fish (Asghari et al., 2012; Croteau et al., 2011; Farkas et al., 2011; Griffitt et al., 2012) and shown that silver tissue contents was depending of the particle size (Gaiser et al., 2012). Auffan et al. (2009) found size-dependent interfacial properties and reactivity of nanoparticles which enhanced adsorption for nanoparticles of 30 nm or less and Morones et al. (2005) observed direct interaction of individual nAg with the membrane of Gram-negative bacteria preferentially for nAg of 1 to 10 nm in diameter (high angle annular dark field HAADF scanning transmission electron microscopy STEM). These authors also observed these nAg inside the bacteria cells, suggesting membrane interaction is needed before the uptake. After 48 h of zebrafish embryos exposure to 25 µg.mL^{-1} of small nAg (BSA coating) of 5-20 nm, Asharani et al. (2008) also observed, with TEM images, the presence of nAg inside the cells preferentially accumulated in the nucleus. By using a NanoSIMS approach, Georgantzopoulou et al. (2013) observed nAg in the gut lumen of *D. magna* after a 48 h exposure of 0.1 mg.L^{-1} of 20 and 200 nm. However and in contrast to the previously cited works, only the largest ones (200 nm) have passed the peritrophic membrane and have slightly entered into intercellular spaces within the epithelial layer. Together these results highlighted that exposure to nAg could induce accumulation of Ag in the nanoparticulate form in tissues or cells. In our study and in most of the works reported in the literature, small nAg seem to be the most adsorbed and/or absorbed and then could be responsible for toxicity at the organism level. Indeed, the size-dependent crystalline structure of nanoparticles can influence their reactivity suggesting possible size dependence in toxicity (Auffan et al., 2009).

4.2. Biological endpoints

4.2.1. Survival

Low concentrations of nAg did not induce a significant gammarid mortality during the 72 h exposure period for the 5 nAg sizes studied. These results were consistent with the studies of Andreï et al. (2015) and Mehennaoui et al. (2015) which did not observe mortality of gammarids at the same environmentally realistic concentrations.

4.2.2. Respiration and energetic responses

The overall result of the discriminant analysis performed with all the biological responses give a regular repartition of experimental groups along a gradient ranging from exposure to low concentrations that were close to the control conditions, to exposure to the highest ones. This repartition suggests that

nAg biological effects were dependent on the concentrations, whereas a size effect was not clearly evidenced. However, detailing the results of the discriminant analysis shows that the repartition of experimental groups was only driven by the oxygen consumption parameter. In our study, oxygen consumption was increased in exposed gammarids along the concentration gradient. This increase was highly significant for exposures to the smallest nAg (20 and 10 nm and in a lesser extent 40nm), whereas it was not significant for the largest ones (60 and 100 nm). It is now well admitted that small nAg induce higher toxicity than large ones (Auffan et al., 2009; Bar-Ilan et al., 2009; Hoheisel et al., 2012; Morones et al., 2005), what is mainly explained by a high generation of ROS by small nanoparticles (Auffan et al., 2009; Carlson et al., 2008; Choi and Hu, 2008).

Whereas the oxygen consumption by gammarids was increased in our experiments, other studies showed a decrease in other gammarids (Simcic and Brancelj, 2006; Sutcliffe, 1984) exposed to acute concentrations of metal such as copper mercury and silver (Jones, 1941). Concerning the effect of nAg exposure on oxygen consumption, studies in fish failed to demonstrate any modification (Bilberg et al., 2010; Cowart et al., 2011). For crustaceans, Ketpadung and Tangkrock-Olan (2006) measured an increase of the respiration rate in marine blue crabs (*Portunus pelagicus)* exposed to increasing copper concentration. This increased oxygen uptake was related to the establishment of an escape response (needing to increase energy supply and then ATP production in mitochondria, what requires O_2 as a final electron acceptor) or to the establishment of an internal hypoxia requiring a compensation by an increased uptake (Ketpadung and Tangkrock-Olan, 2006). Whether the increase in oxygen consumption we measured in gammarids can be the result of an escape behavior cannot be concluded from our results, but previous works reported rather a decrease of the locomotor activity after a nAg exposure (Andreï et al., in press ; Mehennaoui et al., in prep), invalidating this hypothesis for gammarids. In contrast, the establishment of an internal hypoxia may be an explanation for our results. Indeed as explained by Sutcliffe (1984), a strong difference between two partial pressures of oxygen (PO_2), for example between high PO_2 in water and low PO_2 in gammarids, induced a high oxygen diffusion rate from water to gammarids. If nAg provoked an internal hypoxia in gammarids exposed to the highest concentrations, replacing individuals in microrespiration chambers where oxygen was at saturation may have accelerated the diffusion rate towards the gills cells, generating the high oxygen consumption we reported. One of the most studied toxicity paradigm for nAg is the generation of reactive oxygen species (ROS, Carlson et al., 2008; Choi et al., 2010; Lapresta-Fernandez et al., 2012; Xia et al., 2006) and (Eom et al., 2013) demonstrated that a ROS induction following nAg exposure in *Caenorhabditis elegans* may have induced the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a protein acting as a transcription factor regulating

physiological pathways responsible for improvement of O_2 transport. This findings support the hypothesis that hypoxia may have resulted from nAg exposure in our study.

Whereas oxygen consumption was clearly increased in our study, ventilation activity remained unchanged. For gammarids, ventilation corresponds to the beating of pleopods in front of gills, then favoring O_2 diffusion towards gills cells. It is surprising that hypoxia we assumed in gammarids was not yet reflected in an increased ventilion activity.

Likewise, ETS activity and energetic reserves remained unchanged during the exposure of gammarids to nAg, as if the uptake of oxygen was not (yet) reflecting an increased energy need. However, energetic biomarkers are known as good tools to assess the effects of a toxic stress on the organism energy budget (De Coen and Janssen, 1997; Verslycke et al., 2004). The cellular energy allocation (CEA) can be studied in organisms by measuring both energy available (Ea) namely protein, lipid and carbohydrate contents, and energy consumed (Ec) through the ETS activity permitting an evaluation of a oxygen consumed rate (De Coen and Janssen, 1997; Gomes et al., 2015; Olsen et al., 2008). After a pesticide exposure (0.072 and 0.100 $\mu g.L^{-1}$ of chlorpyrifos), the estuarine shrimp *Neomysis integer* has been affected for both Ea and Ec with more pronounced effects for the protein content and the ETS activity (Verslycke et al., 2004). Meanwhile, the exposure of *N. integer* to the pesticide revealed a significant increase in respiration rate at increasing concentration, as observed in our study.

Further investigations are needed to confirm these results and better understand both the modification of oxygen budget in the gammarids under nAg exposure and the putative impacts on the energy metabolism.

5. Conclusion

The present study showed that for environmentally realistic exposure conditions (low nAg concentrations in a natural water sampled in a river), silver was recovered in the water and in *G. roeseli* after 72h of nAg exposure. We showed that nAg affected ecophysiological responses in *G. roeseli* and the main impact reported was an increase oxygen consumption related to the silver concentrations and on the nanoparticle sizes. Increased oxygen uptake may have been related to the establishment of internal hypoxia, but further experiments are needed to determine the mechanisms underlying these findings. Nevertheless, effects observed from the very low exposure concentration of 0.5 $\mu g.L^{-1}$ for the small nAg size showed a new insight of potential environmental impact associated with the release of nAg in natural ecosystem.

Acknowledgements:

Financial supports were provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-NANO-0006/MESONNET project), the Laboratory of Excellence Resources 21 "Strategic metals in the 21st century" (ANR-10-LABX-21-01) and the CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). The UE COST Action ES1205 ENTER (Engineered nanomaterials from wastewater treatment & stormwater to rivers) and the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology are acknowledged for providing financial support to J. Andreï for attending meetings and training schools. The contribution of Kahina Mehennaoui was in part possible within NanoGAM (AFP-PhD-9229040, Fonds National de la Recherche Luxembourg). The contributions of Sebastien Cambier and Arno Gutleb were in part made possible within NANION (FNR/12/SR/4009651-Fonds National de la Recherche Luxembourg). The authors wish to thank Philippe Rousselle for the AAS analyses.

References

Addo Ntim, S., Thomas, T.A., Begley, T.H., Noonan, G.O., 2015. Characterisation and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. Food Addit. Contam. Part A 32, 1003–1011. doi:10.1080/19440049.2015.1029994

Arce Funck, J., Danger, M., Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., Guérold, F., Felten, V., 2013. Behavioural and physiological responses of Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. Aquat. Toxicol. 142-143, 73–84.

Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J., 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna. J. Nanobiotechnology 10, 14.

Asharani, P.V., Lian Wu, Y., Gong, Z., Valiyaveettil, S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology 19, 255102. doi:10.1088/0957-4484/19/25/255102

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. 4, 634–641. doi:10.1038/nnano.2009.242

Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. Small 5, 1897–1910. doi:10.1002/smll.200801716

Benn, T.M., Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ. Sci. Technol. 42, 4133–4139.

Bernhardt, E.S., Colman, B.P., Hochella, M.F., Cardinale, B.J., Nisbet, R.M., Richardson, C.J., Yin, L., 2010. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. J. Environ. Qual. 39, 1954–1965.

Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E., 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (Perca fluviatilis). Aquat. Toxicol. 96, 159–165. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.019

Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. J. Phys. Chem. B 112, 13608–13619.

Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes). Aquat. Toxicol. 94, 320–327.

Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquat. Toxicol. 100, 151–159. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.012

Choi, O., Hu, Z., 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. Environ. Sci. Technol. 42, 4583–4588.

Cowart, D.A., Guida, S.M., Shah, S.I., Marsh, A.G., 2011. Effects of Ag nanoparticles on survival and oxygen consumption of zebra fish embryos, Danio rerio. J. Environ. Sci. Health Part A 46, 1122–1128. doi:10.1080/10934529.2011.590726

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

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 6, 43–55.

Durán, N., Marcato, P.D., De Souza, G.I., Alves, O.L., Esposito, E., 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. J. Biomed. Nanotechnol. 3, 203–208.

Eom, H.-J., Ahn, J.-M., Kim, Y., Choi, J., 2013. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)–flavin containing monooxygenase-2 (FMO-2) signaling acts in silver nanoparticles and silver ion toxicity in the nematode, Caenorhabditis elegans. Toxicol. Appl. Pharmacol. 270, 106–113. doi:10.1016/j.taap.2013.03.028

Farkas, J., Christian, P., Alberto Gallego-Urread, J., Roos, N., Hassellövd, M., Tollefsena, K.E., Thomas, K.V., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill cells. Aquat. Toxicol. 101, 117–125.

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 86, 413–425.

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

Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llaneza, V.L., Wang, Y., Bitton, G., Bonzongo, J.-C.J., 2009. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. Environ. Sci. Technol. 43, 3322–3328. doi:10.1021/es803315v

Garaud, M., 2015. Effets des nanoparticules manufacturées (nCeO2 et nAg) sur la biologie du bivalve d'eau douce Dreissena polymorpha. Université de Lorraine, Metz.

Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO2) sublethal effects on two freshwater invertebrates, Dreissena polymorpha and Gammarus roeseli. Aquat. Toxicol. 158, 63–74.

Georgantzopoulou, A., Balachandran, Y.L., Rosenkranz, P., Dusinska, M., Lankoff, A., Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Guignard, C., Audinot, J.-N., Girija, S., Hoffmann, L., Gutleb, A.C., 2013. Ag nanoparticles: size- and surface-dependent effects on model aquatic organisms and uptake evaluation with NanoSIMS. Nanotoxicology 7, 1168–1178. doi:10.3109/17435390.2012.715312

Gomes, S., Scott-Fordsmand, J., Amorim, M., 2015. Cellular Energy Allocation to Assess the Impact of Nanomaterials on Soil Invertebrates (Enchytraeids): The Effect of Cu and Ag. Int. J. Environ. Res. Public. Health 12, 6858–6878. doi:10.3390/ijerph120606858

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel Mytilus galloprovincialis. Mar. Environ. Res. 101, 208–214. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.004

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

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environ. Sci. Technol. 43, 9216–9222.

Griffitt, R.J., Brown-Peterson, N.J., Savin, D.A., Manning, C.S., Boube, I., Ryan, R.A., Brouwer, M., 2012. Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (Cyprinodon variegatus). Environ. Toxicol. Chem. 31, 160–167. doi:10.1002/etc.709

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

Hoheisel, S.M., Diamond, S., Mount, D., 2012. Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in Daphnia magna and Pimephales promelas. Environ. Toxicol. Chem. 31, 2557–2563.

Jones, J. erichsen, 1941. The effect of ionic copper on the oxygen consumption of Gammarus pulex and Polycelis nigra. J. Exp. Biol. 18, 153–161.

Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. Environ. Pollut. 158, 2900–2905.

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

Ketpadung, R., Tangkrock-Olan, N., 2006. Changes in oxygen consumption and heart rate of the blue swimming crab, Portunus pelagicus(Linnaeus, 1766) following exposure to sublethal concentrations of copper. J. Environ. Biol. 27, 7–12.

Künniger, T., Gerecke, A.C., Ulrich, A., Huch, A., Vonbank, R., Heeb, M., Wichser, A., Haag, R., Kunz, P., Faller, M., 2014. Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden façades. Environ. Pollut. 184, 464–471. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.030

Lapresta-Fernandez, A., Fernandez, A., Blasco, J., 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. Trends Anal. Chem. 32, 40–59.

Lee, Y.-J., Kim, J., Oh, J., Bae, S., Lee, S., Hong, I.S., Kim, S.-H., 2012. Ion-release kinetics and ecotoxicityeffects of silver nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. 31, 155–159.

Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environ. Sci. Technol. 44, 2169–2175.

Marambio-Jones, C., Hoek, E.M., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanoparticle Res. 12, 1531–1551.

Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. Anal. Chem. 85, 3036–3049. doi:10.1021/ac303636s

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16, 2346–2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059

Olsen, G.H., Carroll, J., Sva, E., Camus, L., 2008. Cellular energy allocation in the Arctic sea ice amphipod Gammarus wilkitzkii exposed to the water soluble fractions of oil. Mar. Environ. Res. 66, 213–214. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.063

Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. Mar. Biol. 27–36.

Peretyazhko, T.S., Zhang, Q., Colvin, L., 2014. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. Environ. Sci. Technol. 48, 11954–11961.

Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Toxicol. Chem. 18, 89–108.

Schmidlin, L., von Fumetti, S., Nagel, P., 2015. Effects of increased temperatures on Gammarus fossarum under the influence of copper sulphate. Ecotoxicology 24, 433–444. doi:10.1007/s10646-014-1392-6

Simcic, T., Brancelj, A., 2006. Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in Gammarus fossarum, Asellus aquaticus and Niphargus sphagnicolus. Freshw. Biol. 51, 686–694. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01522.x

Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20, 264–273. doi:10.1007/s10646-010-0578-9

Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2010. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater.pdf.

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environ. Pollut. 185, 69–76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004

Sutcliffe, D.W., 1984. Quantitative aspects of oxygen uptake by Gammarus (Crustacea, Amphipoda): a critical review. Freshw. Biol. 14, 443–489.

Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., Janssen, C.R., 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid Neomysis integer (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 306, 1–16. doi:10.1016/j.jembe.2003.12.022

Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., Nel, A.E., 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett. 6, 1794–1807. doi:10.1021/nl061025k

Supporting Information for Andreï et al.

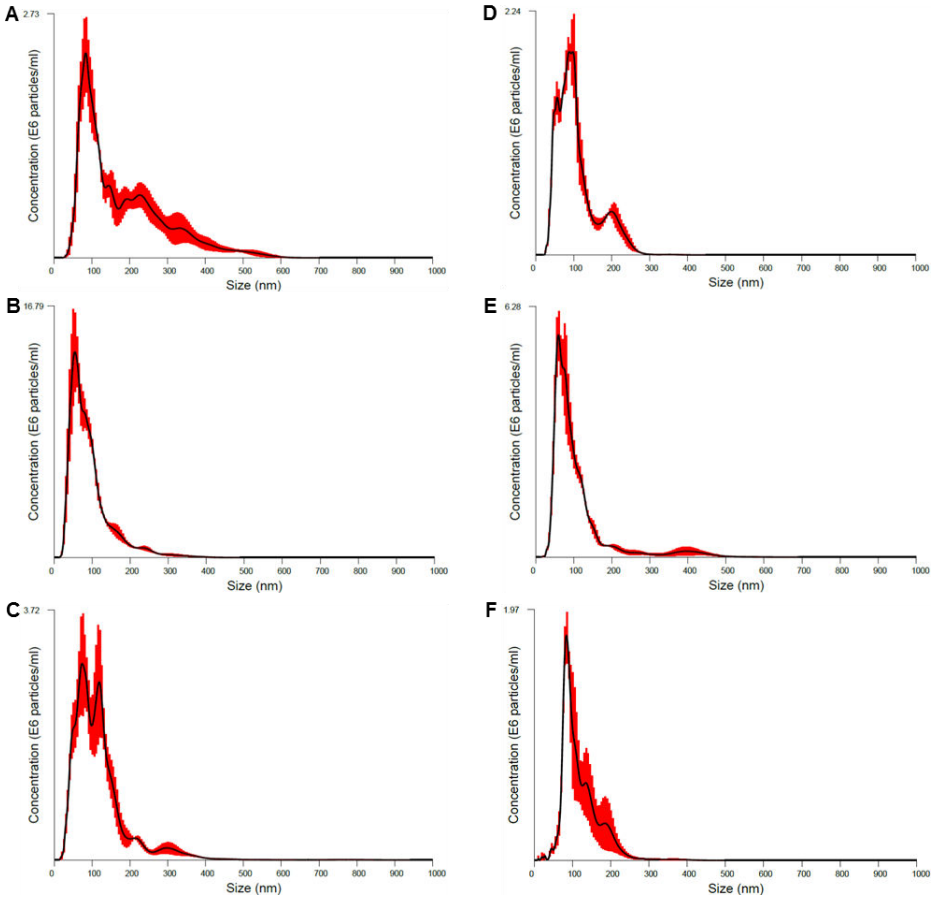


Figure S1: Hydrodynamic diameter measurements and particle size distribution (NanoSight 500, Malvern Instrument Ltd, UK) of A) the La Méholle water and B) the nAg of 10 nm, C) 20 nm, D) 40 nm, E) 60 nm and F) 100 nm at 100 µg L^{-1} in La Méholle water.

Table S1 : Means (± S.D.) biomarker responses of G. roeseli exposed to 4 concentrations (0, 0.5, 2.5 and 5 µg L^{-1}) of 5 nAg sizes (10, 20, 40, 60 and 100 nm) after 72 h.

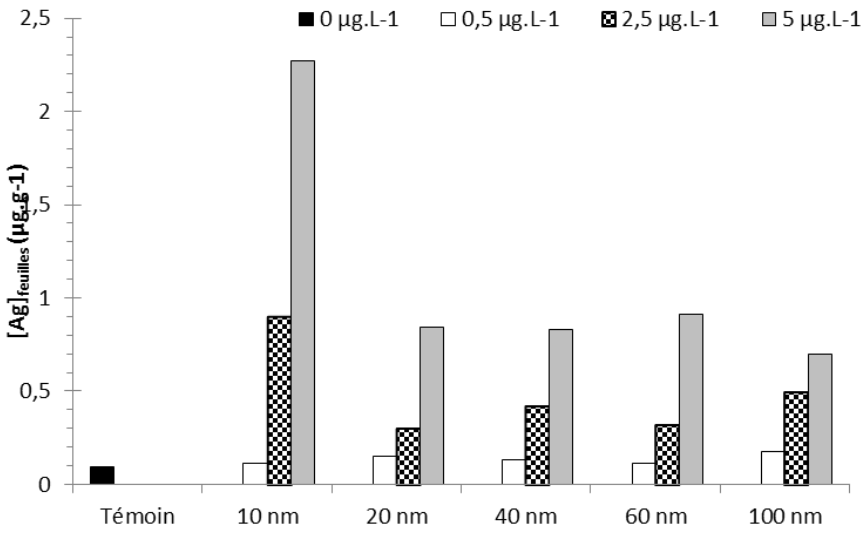
[nAg]	Oxygen consumption (mgO2/mg gammarids/h)	Ventilation (% pleopod beat/min against the control)	ETS (µmolO2/gFW/h)	Triglyceride (mg.gfw^{-1})	Protein (mg.gfw^{-1})	Cholesterol (mg.gfw^{-1})
10 nm						
0 µg L^{-1}	0.0007 ± 0.0001	100 ± 21	30.37 ± 3.88	5.22 ± 5.44	38.57 ± 14.19	0.69 ± 0.29
0.5 µg L^{-1}	0.0017 ± 0.0003	69 ± 43	32.18 ± 4.62	5.62 ± 4.17	38.04 ± 7.58	0.69 ± 0.05
2.5 µg L^{-1}	0.0027 ± 0.0002	87 ± 46	31.52 ± 1.85	5.81 ± 4.84	40.23 ± 5.72	0.74 ± 0.29
5 µg L^{-1}	0.0036 ± 0.0002	82 ± 41	29.34 ± 3.07	3.62 ± 2.90	38.54 ± 5.63	0.76 ± 0.16
20 nm						
0 µg L^{-1}	0.0007 ± 0.0002	100 ± 3	30.69 ± 4.27	4.96 ± 2.63	44.42 ± 8.46	1.05 ± 0.26
0.5 µg L^{-1}	0.0017 ± 0.0005	87 ± 30	32.28 ± 4.28	4.69 ± 4.56	39.82 ±9.12	0.87 ± 0.34
2.5 µg L^{-1}	0.0025 ± 0.0000	113 ± 32	32.07 ± 2.64	2.44 ± 0.60	35.51 ± 4.14	0.87 ± 0.29
5 µg L^{-1}	0.0033 ± 0.0002	107 ± 37	30.25 ± 4.84	4.43 ± 2.96	42.92 ± 14.57	1.07 ± 0.29
40 nm						
0 µg L^{-1}	0.0007 ± 0.0000	100 ± 28	30.61 ± 2.15	4.40 ± 2.50	40.40 ± 4.83	1.03 ± 0.30
0.5 µg L^{-1}	0.0015 ± 0.0003	96 ± 7	30.91 ± 3.24	4.36 ± 3.07	36.60 ± 6.43	0.77 ± 0.15
2.5 µg L^{-1}	0.0022 ± 0.0005	89 ± 23	30.71 ± 4.65	5.23 ± 2.89	41.39 ± 9.11	0.94 ± 0.44
5 µg L^{-1}	0.0024 ± 0.0009	81 ± 21	28.63 ± 1.90	2.32 ± 1.62	36.13 ± 8.77	0.83 ± 0.32
60 nm						
0 µg L^{-1}	0.0007 ± 0.0002	100 ± 28	27.26 ± 2.60	2.78 ± 1.81	34.41 ± 8.24	0.81 ± 0.28
0.5 µg L^{-1}	0.0014 ± 0.0005	100 ± 0	31.77 ± 1.88	6.58 ± 3.78	37.24 ± 5.82	0.83 ± 0.17
2.5 µg L^{-1}	0.0017 ± 0.0003	112 ± 40	31.04 ± 1.91	5.59 ± 1.59	42.10 ± 4.20	1.06 ±0.33
5 µg L^{-1}	0.0020 ± 0.0008	133 ± 26	30.89 ±4.80	5.20 ± 4.49	36.03 ± 6.76	0.95 ±0.18
100 nm						
0 µg L^{-1}	0.0007 ± 0.0002	100 ± 20	31.85 ± 1.23	4.31 ± 2.51	40.48 ± 6.31	0.98 ± 0.13
0.5 µg L^{-1}	0.0008 ± 0.0005	103 ± 31	30.72 ± 4.64	4.45 ± 2.51	38.38 ± 8.23	0.90 ± 0.18
2.5 µg L^{-1}	0.0017 ± 0.0009	120 ± 33	31.23 ± 4.89	4.55 ± 3.11	35.71 ± 5.06	0.75 ± 0.24
5 µg L^{-1}	0.0021 ± 0.0008	116 ± 33	27.68 ± 2.47	3.46 ± 1.39	39.43 ± 9.67	0.84 ± 0.16

Informations supplémentaires

- Résultats - Discussion :

1. Concentrations en argent dans les feuilles d'aulne

Les résultats concernant les concentrations en argent dosées dans les disques de feuilles d'aulne correspondent, pour chacune des conditions, au dosage d'un unique échantillon composé de disques appartenant aux 4 réplicats (Figure 50). Cette mesure montre néanmoins des profils de contamination cohérents avec ceux observés pour les gammares et montrant des concentrations en argent qui semblent être plus élevées pour les nAg de 10 nm à 2,5 et 5 µg.L^{-1}.



<u>Figure 50 :</u> Mesures des concentrations en argent total dosées dans les feuilles d'aulne après 72 h d'une exposition aux 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations : 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=1).

2. Locomotion

L'anova à un facteur a montré une homogénéité significative des pourcentages de locomotion chez les organismes témoins. Chez les gammares exposés aux nAg de 10 et 40 nm à 0,5 et 2,5 µg.L^{-1} l'activité de locomotion a été significativement diminuée par rapport à celle mesurée chez les témoins, contrairement à la condition de 2,5 µg.L^{-1} de nAg de 20 nm, qui elle, a entrainé une augmentation (Figure 51). Ces résultats sont difficiles à interpréter notamment en ce qui concerne l'absence d'effet des nAg 10 et 40 nm à 5 µg.L^{-1}. Dans la littérature à de nombreuses reprises, des réductions de l'activité de

locomotion chez des gammares soumis à une contamination métallique ont été rapportées pour toutes les concentrations supérieures à une concentration seuil avec parfois une relation dose-réponse (Arce Funck et al., 2013; Lawrence and Poulter, 1998; Vellinger et al., 2013). Dans cette étude, cette relation dose-réponse n'a pas été observée tout comme l'existence d'effets dépendants de la taille des nAg. L'intérêt d'étudier une gamme de tailles s'avère pertinente, car si l'expérience avait été effectuée sur les 2 tailles extrêmes de 10 et 100 nm, un effet lié au diamètre des nAg aurait pu être supposé. Cependant à la lumière des résultats obtenus pour les tailles intermédiaires, l'hypothèse d'une relation effet-taille ne peut être retenue.

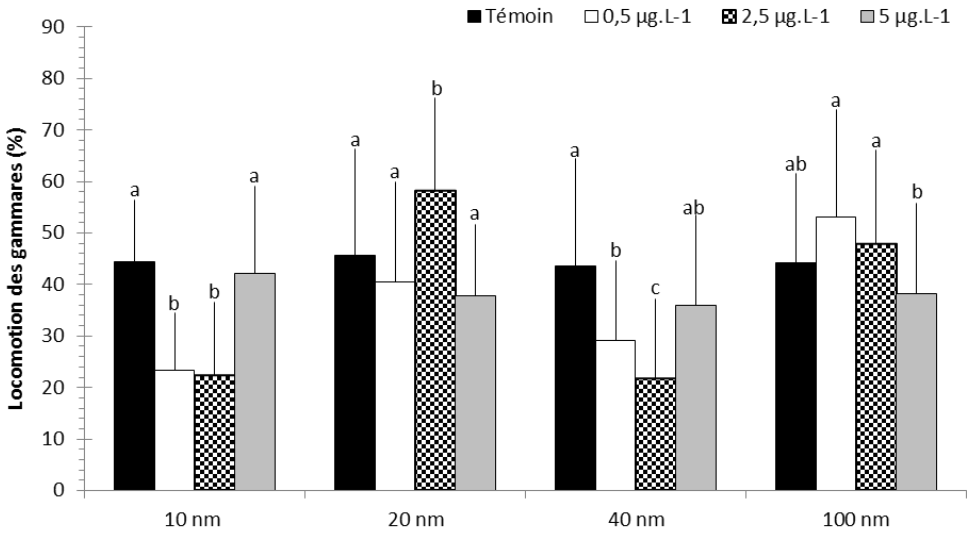


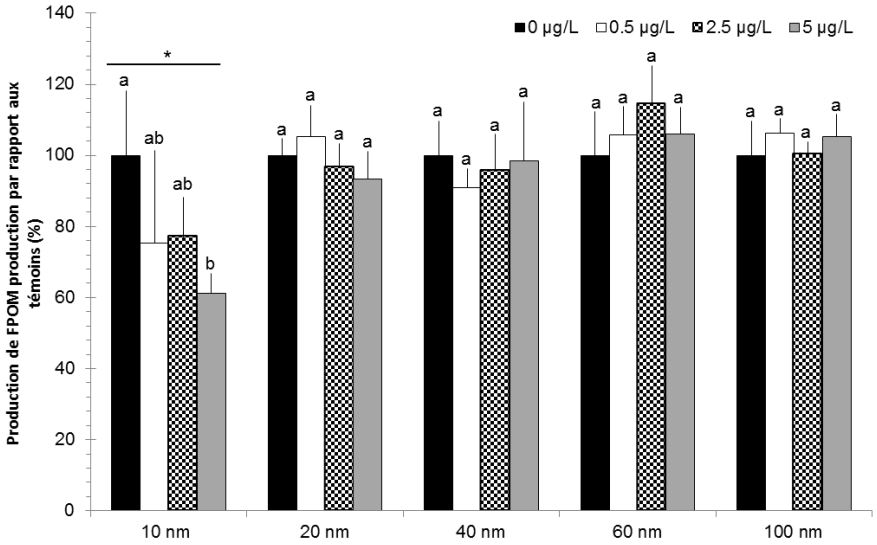
Figure 51: Moyennes (± écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 72 h d'exposition à 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=60). Les mesures relatives aux nAg 60 nm sont manquantes et les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

3. Production de FPOM

Des baisses significatives de production de FPOM ont été observées uniquement dans les conditions de contamination relatives aux nAg de 10 nm (Figure 52 anova à un facteur, F-value= 3,56, ddl=3, p-value<0,05). Les résultats des tests post-hoc TukeyHSD ont montré que seule la plus forte concentration de 5 µg.L^{-1} entrainait des réponses statistiquement différentes de celles des témoins. Ce profil de réponse a déjà été observé dans l'expérience 1B pour les nAg de 10 et 60 nm. Ici, et comme l'étude n'a pas été élaborée pour mesurer spécifiquement ce paramètre, des conditions témoins composés uniquement du milieu d'exposition et de disques de feuilles sans gammare n'ont pas été testées. Les

données présentées ne correspondent donc pas aux quantités de FPOM produites uniquement par les gammares mais prennent aussi en compte celles produites par les microorganismes.

Comme cela a déjà été observé pour les résultats d'activité de locomotion, les effets de la plus petite taille de 10 nm sont statistiquement différents de ceux des deux plus grandes de 60 et 100 nm (Kruskal-Wallis, ddl=4 et p-value<0,001, tests post-hoc). Mais à nouveau, la prise en compte des résultats obtenus pour l'ensemble de la gamme de taille ne permet pas de conclure quant à l'existence d'un effet taille-dépendant.

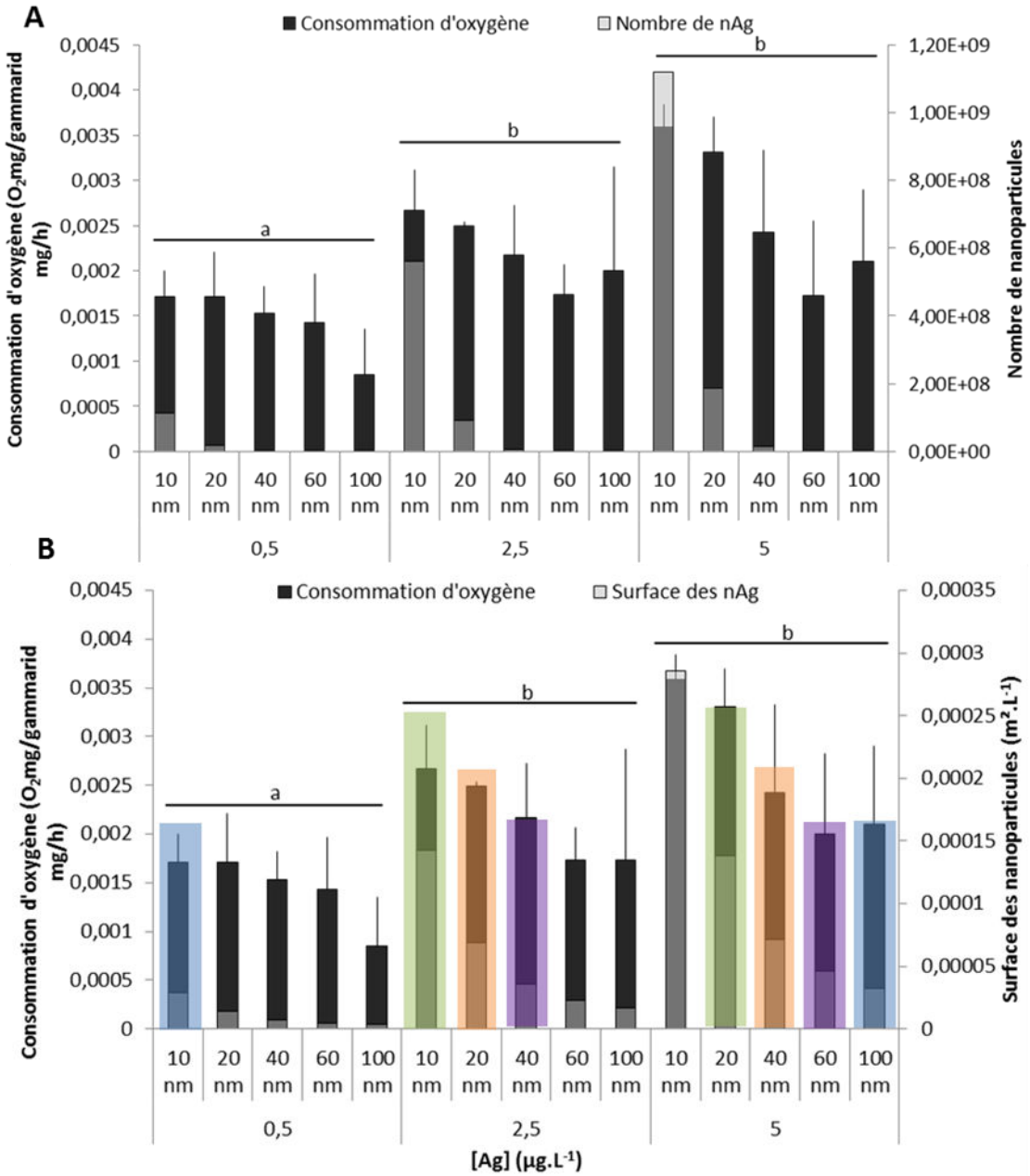


<u>Figure 52 :</u> Moyennes (± écart-types) des mesures de production de FPOM par les G. roeseli après 72 h d'exposition à 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) pour 4 concentrations 0 ; 0,5 ; 2,5 et 5 µg.L^{-1} (n=60). Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

- Discussion des résultats obtenus pour la consommation d'oxygène des gammares en raisonnant sur le nombre de particules et leur surface dans les milieux d'exposition

Classiquement, les effets des nanoparticules, et dans le cas présent des nAg, sont évalués en fonction des quantités d'argent introduites dans le milieu d'exposition. Or, comme cela a été décrit dans le chapitre 1, une nanoparticule possède, certes un noyau composé d'un matériel potentiellement toxique, mais elle dispose également d'une taille et d'une surface spécifique qui peuvent elles-aussi entrainer des effets. Dans cette étude, l'objectif de tester pour une même concentration en argent, plusieurs tailles de nAg partait donc d'un postulat que les effets observés pouvaient être induits par le matériel argent inégalement distribué dans le milieu : en millions de petites particules ou en particules plus grandes mais en plus faibles quantités. En partant maintenant du postulat que l'effet n'est pas dû au métal argent

mais à l'intrusion de nanoparticules dans une structure biologique ou encore à leur adsorption empêchant le bon fonctionnement de cette structure, et ce, indépendamment du matériel qui les compose, la représentation des résultats peut ne plus s'envisager par rapport à une gamme de concentrations, mais plutôt par rapport au nombre ou à la surface de nanoparticules introduites dans le milieu. Dans cette étude, les mesures de consommation en oxygène sont en étroite relation avec les structures branchiales des gammares elles-mêmes en contact potentiellement direct avec les nAg présentes dans le milieu d'exposition. Dans la figure 53 présentée ci-dessous les mesures de consommation d'oxygène des gammares aux 3 concentrations d'exposition des 5 tailles de nAg ont été présentées en parallèle des quantités de nanoparticules (Figure 53A) et des surfaces de nanoparticule (Figure 53B) introduites en début d'expérience. Ces valeurs ont été obtenues, par calcul à l'aide des données de quantités et de surface des nAg des solutions stock et ont été rapportées à nos concentrations nominales d'exposition. Ces résultats montrent logiquement que pour une concentration donnée, les nAg de 10 nm sont les plus nombreuses et représentent la surface la plus élevée. En raisonnant en termes de surface des nAg, on observe par exemple dans la figure 53B des aires de surface qui semble être équivalente entre les nAg de 10 nm à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ et de 100 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$ (entourées en bleu); entre les nAg de 10 nm à 2,5 $\mu g.L^{-1}$ et de 20 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$ (entourées en vert) ; entre les nAg de 20 nm à 2,5 $\mu g.L^{-1}$ et de 40 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$ (entourées en orange) et entre les nAg de 40 nm à 2,5 $\mu g.L^{-1}$ et de 60 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$ (entourées en violet) . Pour chacun de ces couples constitués de concentrations d'exposition différentes mais de surfaces nanoparticulaires totales proches, les résultats de consommation en oxygène s'avèrent également proches, ouvrant ainsi sur de nombreux questionnements : observe-t-on un effet de l'argent ou un effet dû à l'adsorption de nanoparticules sur les branchies ou est-ce un mix des deux ? A l'avenir, dans les tests d'écotoxicité, une plus grande importance devrait être donnée aux quantités et aux surfaces des nanoparticules étudiées afin de mieux comprendre les causes des effets dus aux nanoparticules.



<u>Figure 53 :</u> Moyennes (+ écart-types) des mesures de consommation d'oxygène des gammares exposés aux 3 concentrations (0,5, 2,5 et 5 µg.L^{-1}) des 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60, et 100 nm), par rapport A) aux quantités de nAg ou B) à la surface totale de nAg introduites dans les milieux d'exposition.

BILAN

Les résultats décrits dans ce chapitre permettent de mettre en exergue différentes conclusions

- Des effets des nAg sur le genre *Gammarus sp.* ont pu être observés pour de faibles concentrations et dans des conditions d'exposition environnementalement réalistes.
- Le niveau cellulaire n'est peut-être pas le mieux adapté pour l'évaluation de leurs effets sur les gammares.
- Au contraire, sur le plan physiologique, l'étude de la respiration des organismes via des mesures de consommation en oxygène semble être un outil performant, permettant notamment d'étudier les effets de très faibles niveaux de contamination. Ce constat est également observable par des mesures de l'activité de locomotion déjà connues pour répondre à une contamination argentique.
- L'étude du niveau fonctionnel montre un impact des nanoparticules sur la production des FPOM suggérant un effet des sur l'assimilation et/ou sur les fonctions digestives des gammares. Cette ouvre de nouvelles voies de réflexion et mérite d'être approfondie
- Les effets observés sont majoritairement corrélés à la taille des nanoparticules testées. Les plus petites induisant des effets plus marqués.
- *G. roeseli* apparaît plus sensible~~s~~ à l'exposition aux nAg que *G. fossarum* et *G. pulex.*
- Aucune différence de réponse n'a été observée entre plusieurs populations de *G. roeseli.*

Globalement, une exposition de *G. roeseli* aux nAg peut entrainer des perturbations physiologiques, comportementales et fonctionnelles. Les gammares semblent adopter une stratégie de préservation et de stockage d'énergie pour pouvoir répondre aux coûts énergétiques importants mais nécessaires à la mise en place de mécanismes de détoxication. Ceux mesurés au niveau cellulaire dans cette étude n'ont pas répondu. Les baisses de production de FPOM qui en résultent, pourraient avoir des conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes d'eau douce en modifiant le cycle de la matière organique via une réduction des flux de FPOM.

Des études plus poussées sur le métabolisme énergétique sont à envisager pour mieux comprendre les observations réalisées et déterminer plus précisément les mécanismes impliqués.

CHAPITRE 4

Approche multibiomarqueur des effets biologiques à long terme des nAg, $nTiO_2$ et NTC sur *G. roeseli*

Dans les études présentées dans ce chapitre, plusieurs séries de données sont encore manquantes. Par ailleurs, concernant les expérimentations en mésocosmes, de fort taux de mortalité ont été observés rendant délicate toute interprétation fiable des résultats et laissant de nombreux questionnements en suspens. Ces expérimentations ont été effectuées en collaboration avec d'autres laboratoires, le plus souvent sur de longs temps d'expérimentation nécessitant également un long travail préparatoire en amont. Elles ont nécessité beaucoup de temps, de travail et d'investissement durant ces 3 années de thèse. Pour ces diverses raisons, nous avons collectivement décidé d'aller quand même plus loin et de présenter les résultats obtenus. Même si ces expérimentations à elles seules ne permettent pas d'établir de conclusions précises et fiables quant à l'effet des nanoparticules testées sur les gammares, elles constituent des premiers tests sur ces organismes, notamment en conditions de mésocosmes pour la plupart. Elles apportent finalement différents questionnements intéressants ainsi que des hypothèses qu'il conviendra de considérer ultérieurement.

Suite aux études en conditions environnementalement réalistes menées en microcosmes et décrites dans le chapitre 3, un des objectifs de cette approche a été de complexifier les expérimentations. Chacune des études décrites dans ce chapitre présentent donc un niveau de complexité supérieur puisqu'elles se sont systématiquement déroulées en présence de *G. roeseli* (espèce observée comme étant la plus sensible au nAg) mais également en présence d'un bivalve filtreur *Dreissena polymorpha* ainsi que de communautés microbiennes. Cependant, et même si les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés en conditions plurispécifiques, seuls les résultats concernant les gammares seront présentés. Ceux propres aux dreissènes et aux nAg, ont fait l'objet d'un manuscrit de thèse (Garaud, 2015). Ceux concernant les effets des $nTiO_2$ et NTC feront l'objet de publications scientifiques. Les interactions entre ces deux espèces étudiées en parallèle pourront également faire l'objet d'un travail collaboratif à venir.

L'approche multibiomarqueur des effets biologiques des différentes nanoparticules testées sur *G. roeseli* est commune aux 4 expériences présentées dans ce chapitre. Par contre, la première étude nommée « Etude des effets des $nTiO_2$ sur les gammares (*G. roeseli*) en fonction de leur hétéroagrégation dans deux types d'eau du Rhône naturellement chargées en matières organiques » diffère considérablement des autres en termes de complexité des dispositifs, des milieux et des temps d'exposition. Enfin, les 3 expérimentations qui suivent ont été effectuées en mésocosmes et ont été

élaborées dans un contexte collaboratif avec des dispositifs et des protocoles communs entre plusieurs laboratoires (CEREGE, Aix-en-Provence et ECOLAB, Toulouse).

I. Etude des effets des $nTiO_2$ sur les gammares (*G. roeseli*) en fonction de leur hétéroagrégation dans deux types d'eau du Rhône naturellement chargées en matières organiques – *Expérience 4*

Contexte

Les $nTiO_2$, incorporées dans de nombreux produits du quotidien sont, elles aussi susceptibles de se retrouver dans les écosystèmes d'eau douce. Les conditions physicochimiques d'un cours d'eau ont une forte influence sur les phénomènes de transformation et de dégradation des nanoparticules, ce qui justifie d'étudier leur devenir dans différents types d'eau.

Cette expérience a été élaborée dans un contexte de collaboration avec un laboratoire partenaire : le CEREGE. Situé à Aix-en-Provence, c'est sur ce site que l'expérimentation a été mise en place afin de bénéficier du matériel et de l'expertise de ces partenaires sur la caractérisation des nanoparticules. Cette étude a eu pour but de comprendre le comportement des $nTiO_2$ dans deux types d'eaux prélevées *in situ* et présentant une différence de charge en matière organique. La matière organique présente dans le milieu peut se complexer aux nanoparticules formant des hétéroagrégats qui, moins mobiles auront tendance à sédimenter. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets des $nTiO_2$ sur des gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* en fonction de ces phénomènes d'hétéroagrégation. En effet, la complexation de la matière organique aux $nTiO_2$ peut réduire leur biodisponibilité pour les organismes, mais leur sédimentation et dépôts dans le fond des dispositifs est susceptible d'avoir des effets sur les gammares qui sont des organismes benthiques.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons développé une approche multibiomarqueur associée à de l'imagerie en micro-tomographie RX et en micro-fluorescence X à haute résolution en énergie (micro-HR-XRF).

Mots-clés : nanoparticules de dioxyde de titane - *Gammarus sp.* - biomarqueurs – hétéoagrégation – imagerie

Plan expérimental

Dispositif expérimental : Des gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* ont été prélevés en Moselle dans la Nied française puis transportés dans des glacières jusqu'au CEREGE à Aix-en-Provence. Ils ont été acclimatés durant 16h avant le début des expérimentations dans de l'eau prélevée dans le Rhône sur le site d'Arles, ou de Jons. Les gammares ont par la suite été exposés dans chacune de ces eaux pendant 24 h et 96 h à 3 concentrations de $nTiO_2$ (anatase de 5-30 nm) : 0 ; 0,1 et 1 $mg.L^{-1}$ (Figure 54). La caractérisation de ces $nTiO_2$ est bien décrite dans l'une des études de nos partenaires du CEREGE (Labille et al., 2015). Chaque dispositif était placé à l'obscurité et composé de 60 gammares de sexe indifférencié, de 16 dreissènes (étude menée par M. Garaud), de 1,5 litres d'eau d'Arles ou de Jons et d'un dispositif d'oxygénation du milieu calibré pour l'ensemble des 12 bacs.

Figure 54 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 4 (Cf. Chapitre 2, tableau 9)

Mesures : Concernant les milieux d'exposition, deux fois 10 ml de milieu ont été prélevés directement après les injections de nanoparticules (T0) puis après 1 h, 3 h, 6 h, 24 h et 96 h. Un des prélèvements a été effectué pour permettre de doser et vérifier les concentrations en titane (ICP-MS) et un autre pour mesurer les diamètres des agrégats présents dans le milieu à l'aide d'un compteur à particules (Occhio Flowcell FC200). Pour les mesures effectuées sur ce compteur à particule, l'échantillon a été vigoureusement mélangé à l'aide d'un vortex, puis 1 ml a été prélevé. Le cône et le volume associé ont été placés sur un dispositif spécifique de l'instrument et le volume a progressivement était déversé devant un laser qui permettait la mesure des tailles des agrégats. Un logiciel a par la suite permis de classer les quantités de particules comptées dans différentes classes de tailles allant de 0,10 µm à 1000 µm.

Au sein de chaque bac, 6 pseudo-réplicats de 5 gammares ont été prélevés puis congelés à -80°C pour effectuer des mesures de concentrations en titane sur 3 d'entre eux ainsi que des mesures de biomarqueurs sur les 3 autres (13 biomarqueurs mesurés). Certains organismes ont aussi été immergés dans de l'alcool à 90° et d'autres ont été disséqués afin de prélever les branchies et les caeca digestifs

qui ont été conservés dans du glutaraldéhyde. Ces échantillons ont été prévus pour de l'imagerie en micro-tomographie, micro-fluorescence et en TEM.

Traitement statistiques : Pour chacune des mesures de biomarqueurs, des anovas à 3 facteurs prenant en compte les variables : concentrations en titane appliquées, temps de contamination et site de prélèvement de l'eau ont été effectuées, suivi des tests post-hoc TukeyHSD si nécessaire.

I.1. Résultats-Discussion

Au moment de la rédaction de ce manuscrit de thèse, nous ne disposons pas de la totalité des résultats. En effet, en termes de comportement des nanoparticules dans le milieu d'exposition, les données brutes des mesures d'hétéroagrégation ont été acquises mais l'analyse de modélisation qui suit et qui permet d'interpréter les résultats est encore en cours avec nos partenaires du CEREGE.

De même, les dosages du titane par ICP-MS demandent de nombreuses mises au point du protocole de minéralisation des échantillons contaminés au $nTiO_2$. En effet, la digestion et donc la ionisation du dioxyde de titane en Ti^{4+} est très difficile et des mesures directes classiques en ICP-MS ne sont ni fiables ni valides. D'autres protocole de minéralisation ont notamment été employés dans la littérature (Jacobasch et al., 2014; Khosravi et al., 2012), et nos partenaires (CEREGE) sont également en cours d'optimisation des mesures. Les concentrations réelles en titane dans les milieux d'exposition après 0, 1, 3, 6, 24 et 96 h ainsi que dans les organismes après 24 et 96 h ne seront donc pas fournies dans ce manuscrit.

Enfin, les mesures d'imagerie permettant d'observer une contamination au titane des gammares sont encore incomplètes. Les premières images réalisées en micro-tomographie ont permis d'observer un élément présent en grande quantité dans le tractus digestif des gammares sans certifier qu'il s'agisse de titane (Annexe 4). Cependant, des observations en micro-fluorescence X à haute résolution en énergie (micro-HR-XRF) ont détecté la présence de titane dans le tube digestif (Annexe 5). Par contre, ces analyses ne nous permettent pas d'émettre des hypothèses quant à des phénomènes d'absorption et/ou adsorption.

Aux vues des pourcentages de survie des organismes s'échelonnant entre 80 et 97% après 24 et 96h, les expositions aux $nTiO_2$ n'ont pas induit de mortalité anormale des gammares exposés par rapports aux témoins.

Les valeurs des 13 biomarqueurs cellulaires étudiés sont présentées dans le tableau 14. Il s'agit des concentrations en protéines contenues dans le broyat, en protéines de la fraction cytosolique, en

cholestérol, en triglycérides, de l'activité du système de transport d'électrons (ETS), des concentrations des hydropéroxydes lipidiques (LOOH), de l'activité de la phosphatase acide (ACP), de la capacité totale antioxydante (TAC), des activités de la lactate déshydrogénase (LDH), de la glutathion péroxydase totale (GPx), de la glutathion-s-transférase (GST), de la caspase (CSP) et de la catalase. Les résultats des Anovas à trois facteurs visant à étudier les effets seuls ou en interaction des contaminations en titane, des temps d'exposition et des deux types d'eau testés sont présentés dans le tableau 15.

<u>Tableau 14 :</u> Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli exposé dans deux types d'eau (Arles et Jons) pendant 24 h (J1) et 96 h (J4)72h à 0, 0,1 et 1 mg.L^{-1} de $nTiO_2$. Aucune différence significative due aux $nTiO_2$.

		Arles		Jons	
		J1	J4	J1	J4
Protéine broyat (mg/gMF)	Témoin	26,5 ± 3,9	29,8 ± 3,0	22,9 ± 2,7	23,9 ± 0,9
	0,1 mg.L^{-1}	28,4 ± 5,7	30,7 ± 5,0	28,1 ± 5,6	26,1 ± 7,7
	1 mg.L^{-1}	30,0 ± 1,4	26,0 ± 2,6	26,5 ± 6,2	24,1 ± 1,2
Protéine fraction cytosolique (mg/gMF)	Témoin	19,7 ± 2,6	22,4 ± 2,4	16,7 ± 2,1	17,7 ± 1,4
	0,1 mg.L-1	21,1 ± 4,2	22,9 ± 3,6	21,0 ± 4,8	19,7 ± 6,9
	1 mg.L-1	22,6 ± 0,6	19,4 ± 1,9	20,0 ± 5,5	17,7 ± 1,9
Cholestérol (mg/gMF)	Témoin	0,67 ± 0,27	0,71 ± 0,09	0,44 ± 0,10	0,50 ± 0,08
	0,1 mg.L-1	0,69 ± 0,29	0,60 ± 0,04	0,67 ± 0,27	0,73 ± 0,29
	1 mg.L-1	0,70 ± 0,17	0,50 ± 0,09	0,58 ± 0,18	0,44 ± 0,07
Triglycéride (mg/gMF)	Témoin	4,95 ± 1,24	5,94 ± 1,74	3,63 ± 0,50	3,92 ± 0,63
	0,1 mg.L-1	4,52 ± 1,84	6,02 ± 1,74	5,76 ± 1,66	5,16 ± 1,57
	1 mg.L-1	5,31 ± 1,35	4,61 ± 1,00	4,97 ± 1,65	4,39 ± 0,22
ETS (µmolO2,gMF-1,h-1)	Témoin	34,7 ± 3,2	35,8 ± 3,7	32,9 ± 4,1	35,6 ± 5,7
	0,1 mg.L-1	35,7 ± 5,2	35,6 ± 1,1	37,0 ± 1,6	37,1 ± 2,1
	1 mg.L-1	36,7 ± 6,7	35,3 ± 5,3	36, 4 ± 2,5	35,4 ± 5,3
LOOH (nmol/gprot)	Témoin	668 ± 31	579 ± 44	640 ± 22	632 ± 15
	0,1 mg.L-1	601 ± 36	615 ± 48	651 ± 56	687 ± 73
	1 mg.L-1	637 ± 10	643 ± 59	636 ± 20	631 ± 33
ACP (µmol/gprot/h)	Témoin	11,5 ± 1,5	11,2 ± 0,9	12,0 ± 1,0	12,2 ± 1,6
	0,1 mg.L-1	11,1 ± 1,4	11,7 ± 0,88	12,0 ± 2,4	13,1 ± 2,0
	1 mg.L-1	11,3 ± 1,5	12,2 ± 1,1	12,4 ± 1,1	12,4 ± 0,6
TAC (µmolTeq/gprot/min)	Témoin	-58 ± 103	-98 ± 14	-61 ± 112	-45 ± 96
	0,1 mg.L-1	-36 ± 82	101 ± 11	-48 ± 92	-40 ± 100
	1 mg.L-1	-104 ± 19	-118 ± 21	-54 ± 98	-37 ± 83
LDH (µmolNADH/gprot/h)	Témoin	954 ± 830	579 ± 378	297 ± 49	528 ± 375
	0,1 mg.L-1	578 ± 226	266 ± 35	482 ± 341	779 ± 689
	1 mg.L-1	394 ± 92	266 ± 76	445 ± 373	271 ± 113
Gpx (µmolNADPH/gprot/min)	Témoin	265 ± 162	282 ± 98	364 ± 124	406 ± 85
	0,1 mg.L-1	302 ± 130	278 ± 130	358 ± 127	385 ± 165
	1 mg.L-1	273 ± 80	336 ± 103	376 ± 130	400 ± 118
GST (µmolCDNB/g prot/min)	Témoin	61,6 ± 11,5	51,2 ± 1,3	55,9 ± 10,1	57,5 ± 6,7
	0,1 mg.L-1	53,2 ± 8,3	50,1 ± 5,2	55,2 ± 8,7	56,9 ± 10,1
	1 mg.L-1	53,1 ± 2,7	57,1 ± 10,8	53,6 ± 12,3	53,0 ± 9,4
CSP (µmolpNA/g prot/h)	Témoin	0,47 ± 0,18	0,77 ± 0,33	0,64 ± 0,28	0,58 ± 0,20
	0,1 mg.L-1	0,64 ± 0,22	0,85 ± 0,20	1,16 ± 0,22	0,87 ± 0,37
	1 mg.L-1	0,58 ± 0,34	1,26 ± 0,23	0,84 ± 0,25	0,94 ± 0,60
Catalase H_2O_2 consommé (mmole/gprot/min)	Témoin	40 ± 30	16 ± 2	19 ± 10	18 ± 16
	0,1 mg.L-1	35 ± 36	14 ± 1	13 ± 1	20 ± 16
	1 mg.L-1	38 ± 34	21 ± 9	16 ± 6	33 ± 31

<u>Tableau 15 :</u> Résultats des Analyses de variance (Anova) à 3 facteurs effectuées pour les différentes mesures de biomarqueurs. Ddl signifie degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives.

	Contamination (ddl=2)		temps (ddl=1)		Site (ddl=1)		Contamination/temps (ddl=2)		Contamination/Site (ddl=2)		Temps/Site (ddl=1)		Interaction des 3 (ddl=2)	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
[Protéine]broyat	1,06	0,36	0,04	0,833	4,93	**0,036***	1,12	0,341	0,25	0,78	0,31	0,581	0,34	0,71
[Protéine]f. cytosolique	0,91	0,415	0,01	0,897	4,56	**0,043***	1,27	0,298	0,27	0,76	0,25	0,618	0,21	0,807
[Triglycéride]	1,11	0,344	0,11	0,733	1,88	0,183	0,87	0,429	1,71	0,202	1,09	0,305	0,56	0,573
[Cholestérol]	1,26	0,301	0,52	0,477	1,96	0,174	1,07	0,358	1,61	0,221	0,40	0,531	0,09	0,908
ETS	0,61	0,548	0,08	0,774	0,00	0,96	0,41	0,663	0,15	0,855	0,02	0,879	0,06	0,936
LOOH	0,16	0,849	0,30	0,585	2,57	0,122	2,46	0,107	2,14	0,139	1,22	0,279	0,97	0,393
ACP	0,18	0,831	0,77	0,386	3,57	0,07	0,31	0,736	0,11	0,896	0,00	0,959	0,22	0,797
TAC	0,23	0,79	0,23	0,632	2,12	0,158	0,10	0,898	0,26	0,767	1,02	0,322	0,05	0,949
LDH	1,31	0,288	0,35	0,555	0,09	0,764	0,10	0,901	1,67	0,209	2,29	0,143	0,72	0,496
Gpx	0,07	0,932	0,36	0,552	4,99	**0,035***	0,08	0,916	0,05	0,947	0,02	0,881	0,10	0,897
GST	0,34	0,714	0,14	0,706	0,11	0,742	0,36	0,698	0,39	0,679	0,48	0,492	0,67	0,518
CSP	3,30	0,053	2,40	0,133	0,52	0,476	1,50	0,246	0,91	0,416	5,55	**0,026***	0,09	0,01
Catalase	0,27	0,764	0,93	0,343	1,16	0,291	0,31	0,734	0,03	0,961	4,39	**0,046***	0,06	0,939

L'exposition des gammares aux $nTiO_2$ n'a eu d'effet sur aucun des biomarqueurs testés. Indépendamment de l'exposition au titane et des différents temps de mesures, les gammares disposés dans l'eau provenant du site d'Arles ont présenté, dans leur ensemble, des concentrations en protéines dans le broyat et dans la fraction cytosolique statistiquement plus élevées que les gammares exposés dans l'eau de Jons, ainsi que des activités de la GPx plus faibles. Les activités mesurées pour les biomarqueurs caspase et catalase laissent suggérer de légers effets dépendants des temps et des sites de prélèvement. Cependant comme ces effets n'ont pas de rapport avec l'exposition aux $nTiO_2$, ils n'ont pas fait l'objet d'une argumentation.

Les $nTiO_2$ n'ont pas eu d'effet sur les gammares pour les paramètres mesurés. Peu d'études se sont pour le moment intéressées aux effets des $nTiO_2$ sur les gammares (Bundschuh et al., 2011; Seitz et al., 2014) et à notre connaissance, aucune n'a étudié les réponses de biomarqueurs cellulaires. Des mesures ont cependant été effectuées chez des poissons, des bivalves et des daphnies. Pour ces dernières, une augmentation de l'activité de la catalase a été observée après exposition des organismes à 10 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ (40 nm, ratio rutile/anatase=3/100). Des augmentations des activités de la GPx et de la GST ont aussi été observées à 5 $mg.L^{-1}$. Pour une plus faible concentration de 1 $mg.L^{-1}$ aucun effet n'avait par contre été mesuré sur ces biomarqueurs (Ki Tae Kim et al., 2010), ce qui est cohérent avec nos résultats. Ce constat pourrait indiquer que les faibles concentrations testées, bien que déjà supérieures aux concentrations environnementalement réalistes, n'ont pas induit, pour les mesures effectuées, la mise en place des mécanismes de réponse antioxydante. A de plus fortes concentrations, les $nTiO_2$ auraient pu induire un stress oxydatif via la production de ROS prises en charge par les mécanismes de défense (Ki Tae Kim et al., 2010).

Cette réponse antioxydante a plusieurs fois été observée dans les glandes digestives de moules (*Mytilus galloprovincialis)* avec notamment une augmentation de l'activité de la GST et de la catalase dès 0,2 et 1 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ de 22 nm (Canesi et al., 2010). Sur cette même espèce et après une exposition aux $nTiO_2$ de 27 nm en moyenne, Balbi et al. (2014) ont quant à eux étudié un autre biomarqueur cellulaire intéressant, les métallothionéines. Cependant, dans ces deux études, et à une plus faible concentration de 0,1 $mg.L^{-1}$, aucun effet sur ces biomarqueurs n'a pu être mesuré.

Chez les poissons, les concentrations d'exposition permettant l'observation d'effets au niveau cellulaire étaient également élevées, atteignant parfois le $g.L^{-1}$ (Faria et al., 2014; Federici et al., 2007; Xiong et al., 2011). Dans les travaux de Xiong et al. (2011), la concentration de 50 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ anatase de 20 à 70 nm a par exemple été testée et a montré une augmentation de la SOD dans l'intestin et le foie des poissons zèbres (*D. rerio*), ainsi qu'une augmentation de la catalase dans le foie uniquement. Dans

cette étude, la lipoperoxydation lipidique a aussi été étudiée et les résultats ont montré une augmentation plus importante du MDA dans les branchies lorsque les organismes étaient soumis à la lumière naturelle comparés à ceux, soumis aux mêmes conditions de contamination, mais disposés à l'obscurité (Xiong et al., 2011). En effet, les $nTiO_2$ sont phototoxiques. Soumises à la lumière naturelle (et plus précisément aux UV), elles induisent la production de ROS. Si certaines études ont prouvé l'existence d'effets plus marqués des $nTiO_2$ en présence d'une luminosité naturelle (Bundschuh et al., 2011; Jovanović, 2015; Ma et al., 2012; Mansfield et al., 2015) d'autres, au contraire, ont également montré l'existence d'effets à l'obscurité (Gurr et al., 2005 ; Jomini et al., 2015).
Une hypothèse suggérant que l'absence d'effet observée dans notre étude soit due à son déroulement à l'obscurité semblerait alors un peu rapide.

De plus, et même si les valeurs d'hétéroagrégation ne sont pas encore disponibles, nous pouvons nous demander si les quantités de matière organique présentes dans ces eaux naturelles n'auraient pas fortement diminué la biodisponibilité des $nTiO_2$ pour les gammares. L'absence d'effet observée entre les eaux provenant des deux sites pourrait alors suggérer que les quantités de matière organique étaient déjà trop élevées pour observer un effet dû à des $nTiO_2$ encore biodisponibles.

Une autre hypothèse concerne la présence d'organismes filtreurs, les dreissènes. Connues pour filtrer de grandes quantités d'eau par heure, elles ont pu bioaccumuler une quantité importante de $nTiO_2$, rendant ces dernières moins disponibles pour les gammares. Cette hypothèse pourra être infirmée ou confirmée après obtention des données de concentrations dans l'eau, les gammares et les dreissènes.

Conclusion

De nombreuses données sont encore manquantes pour pouvoir proposer une interprétation plus poussée des valeurs des concentrations et activités des biomarqueurs cellulaires déjà acquises. Pour le moment, seules les conditions d'expositions à très faibles concentrations peuvent justifier une absence d'effet et sont cohérentes avec la littérature. Les mesures de concentrations, et d'hétéroagrégation, nous apporteront plus d'informations sur la biodisponibilité des $nTiO_2$ dans nos conditions d'exposition.

II. Expositions de *G. roeseli* dans des conditions en mésocosmes

II.1. Matériels et méthodes

Dans ces études, des gammares (*G. roeseli*), des dreissènes (*D. polymorpha*) et des communautés de microorganismes contenant des algues (*Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus capricornus*), ainsi que des assemblages de bactéries et d'hyphomycètes ont été exposés ensemble pendant 3 semaines à différents types de nAg, $nTiO_2$ et NTC.

Pour chaque étude, une condition témoin ainsi que deux conditions d'exposition à des nanoparticules ont été étudiées en triplicat sur un total de 9 dispositifs (figure 55A). Ces dispositifs en verre ont été remplis de 7 kg d'un sédiment synthétique composé à 89% de sable, 10% de Kaolinite et 1% de $CaCO_3$ ainsi que de 56 litres d'une eau minérale Volvic, supplémentée avec 70 $mg.L^{-1}$ de $CaCl_2$ $2H_2O$. Trois jours après la mise en eau des dispositifs, les microorganismes ont été introduits et un flux d'eau en continu a été mis en route à l'aide de pompes filtrant 70 litres d'eau par heure. Douze jours après, la première injection de nanoparticules a été effectuée suivie d'un ou deux prélèvements d'eau permettant le dosage des concentrations réelles d'exposition des matériaux composant les nanoparticules d'une part et le dosage en argent dissous pour les mésocosmes argent d'autre part (ICP-MS). De plus, dans un des réplicats de chaque condition de nAg, tous les 7 jours avant l'injection des nAg, 4 DGT (gradient de diffusion en couche mince) ont été immergés dans la colonne d'eau, puis prélevés individuellement à raison de un par jour, pendant les 4 jours qui ont suivi, le but étant d'effectuer une cinétique d'accumulation de l'argent labile. Au total, sur 4 semaines et pour chaque dispositif, 12 injections de nanoparticules ont été effectuées (tous les 2 ou 3 jours) et 9 échantillons du milieu d'exposition ont été prélevés (tous les 3 à 4 jours). Pour chacune des conditions nAg plates et nAg sphériques, 16 DGT ont été utilisés.

Deux jours après la première injection de nanoparticules, au sein de chaque dispositif, 3 cages contenant 6 g de masse sèches de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) préalablement autoclavées ont été implantées dans les dispositifs pour permettre le conditionnement des feuilles par les microorganismes. Puis après 5 jours, soit 7 jours après le début des injections de nanoparticules, les cages ont été prélevées, ouvertes, et 50 gammares de sexe indifférencié ont été ajoutés dans chaque cage avant leur réimplantation dans les dispositifs. Ces cages ont été disposées en contact avec le sédiment et entre les différents carreaux de céramique sur lesquels les dreissènes étaient fixées. A chaque date de prélèvement, soit après 7, 14

et 21 jours d'exposition, une cage de 50 gammares a été prélevée dans chaque bac. La figure 55B résume sur une échelle de temps les principales étapes de l'expérimentation.

A chaque prélèvement, au sein de chaque cage, les gammares ont dans un premier temps été comptés pour évaluer les taux de mortalité, puis 8 à 12 gammares ont été prélevés pour effectuer des mesures directes d'activité MXR et 3 autres pour des mesures directes de locomotion, ventilation et d'osmolalité. Enfin, 2 pools de 5 gammares ont été prélevés puis congelés à -80°C pour effectuer des mesures ultérieures de concentrations de contaminant dans les gammares ainsi que des mesures des métallothionéines. Un 3ème pool de 5 gammares a également été prélevé afin de mesurer les 13 biomarqueurs cellulaires cités dans l'étude précédente ($[\text{protéines}]_{\text{broyat}}$, $[\text{protéines}]_{\text{fraction cytosolique}}$, [cholestérol], [triglycérides], activités ETS, [LOOH], activité ACP, TAC ainsi que les activités LDH, Gpx, GST, CSP et catalase). Les gammares restants ont été euxaussi congelés à -80°C.

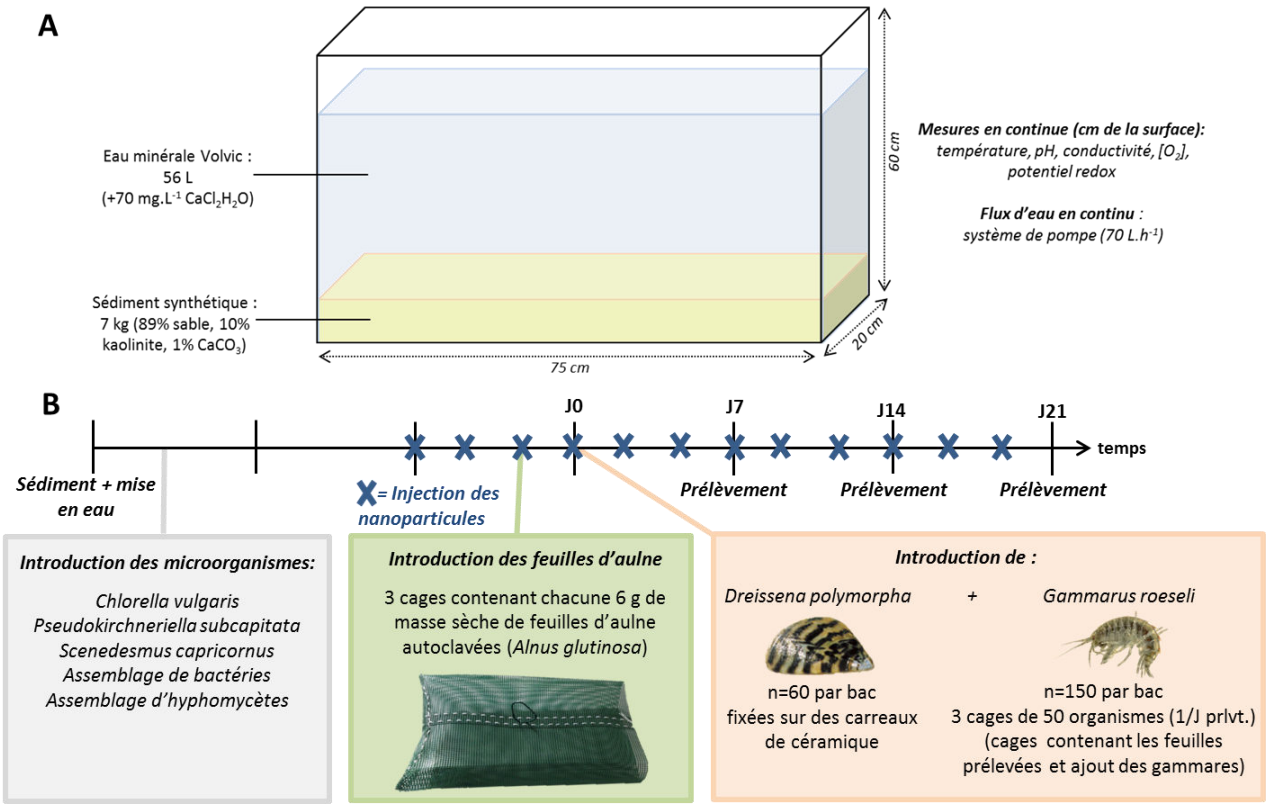


Figure 55 : *A) Schéma d'un dispositif expérimental et B) Echelle de temps (1 intervalle = 1 semaine) et principales étapes de l'expérimentation.*

II.2. Effets de deux types de nAg (plate et sphérique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli – Expérience 5*

Contexte

Comme nous l'avons déjà évoqué plusieurs fois dans le chapitre précédent, les nanoparticules d'argent peuvent, tout au long de leur cycle de vie, être rejetées dans l'environnement, ce pourquoi de nombreuses études se sont déjà intéressées à leurs effets sur divers organismes peuplant les écosystèmes aquatiques d'eau douce.

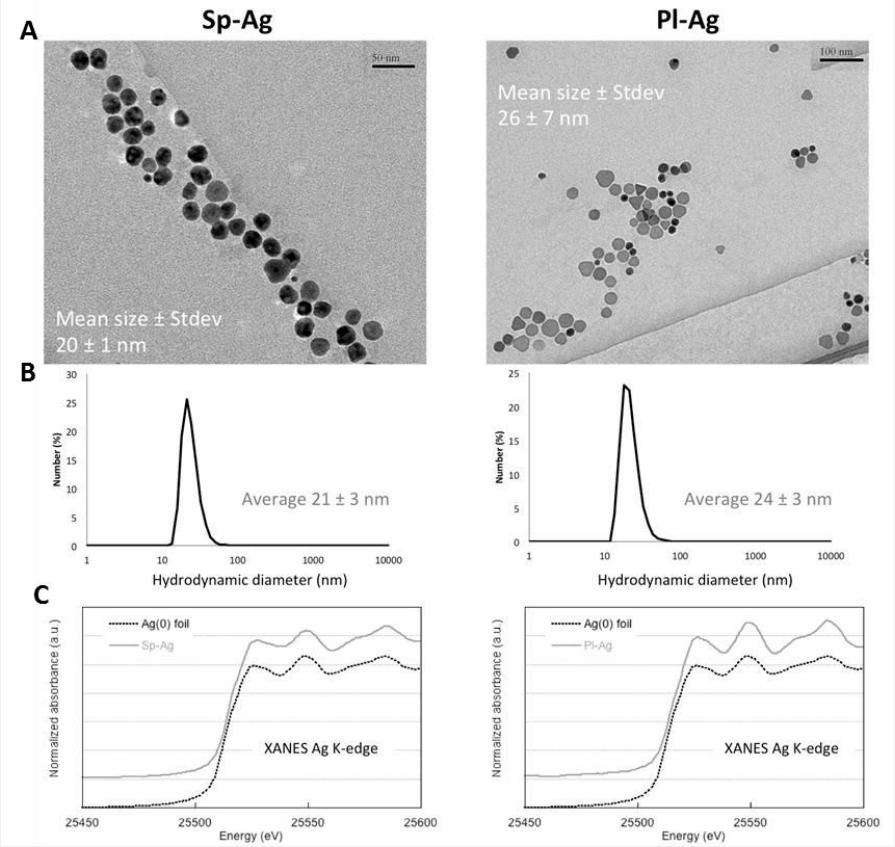
Après avoir étudié dans l'expérience 3 du Chapitre 3 différentes tailles de nAg et après avoir montré que les plus petites nAg de 10 nm étaient celles qui entrainaient les effets les plus importants chez *G. roeseli*, l'objectif de l'étude décrite ici a consisté à évaluer les effets de 2 formes de nAg enrobées de PVP. Ces deux formes, plate triangulaire ou sphérique, présentaient la même surface spécifique. Ce paramètre est important notamment pour comparer les quantités de relargage d'argent dissous.

Le déploiement de l'ensemble des biomarqueurs présentés dans les expériences précédentes n'a pu être réalisé. En effet, les dispositifs utilisés pour l'exposition ont limité certaines possibilités techniques. Ainsi, une récupération exhaustive des FPOM produites par les gammares n'était pas envisageable dans un dispositif composé de sédiment et de bivalves filtreurs et les durées des mesures de consommation en oxygène auraient été trop longues et inadaptées pour ce type d'étude. Une approche multibiomarqueur des effets biologiques cellulaires et individuels a donc été retenue.

Mots clés : Nanoparticules d'argent –forme- *G. roeseli* – multibiomarqueur – mésocosme

Rappels du plan expérimental

Dispositif expérimental: Deux types de nAg enrobées de PVP, de forme sphérique et de forme plate triangulaire ont été commandées chez Nanocomposix (Figure 56). La caractérisation de leurs solutions stocks (20 mg.L^{-1}) effectuée par le CEREGE (M. Auffan) a permis de mesurer les diamètres moyens par MET : 20 ± 1 nm pour les sphériques et 26 ± 7 nm pour les plates ; ainsi que les diamètres hydrodynamiques par DLS : 21 ± 3 nm pour les sphériques et 24 ± 3 nm pour les plates (Figure 56A/B). La similitude entre les tailles mesurées en MET et les diamètres hydrodynamiques montrent que les nAg sont bien dispersées dans leur solution stock. Les natures cristallines ont été analysées par spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES Ag K-edge), confirmant que les nAg étaient principalement composées d'Ag^0 (Figure 56B).



<u>Figure 56 :</u> Caractérisation des nAg sphériques (Sp-Ag) et plates (Pl-Ag) dans leurs solutions stocks. A : Images en microscopie électronique à transmission (MET) et tailles moyennes ± écart-types des nAg. B : Distribution des diamètres hydrodynamiques obtenue par analyse spectroscopique de diffusion dynamique de la lumière (DLS). C : Spectroscopie d'absorption des rayons X (X-ray Absorption Near Edge Structure, XANES Ag K-edge) obtenu sur le FAME (French Absorption spectroscopy beamline in Material

and Environmental science, BM30b) au synchrotron ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble.

Les 12 injections successives (4,16 µg.L^{-1} par injection) de ces deux types de nAg ont permis une exposition à une concentration en argent finale voulue de 50 µg.L^{-1} suite au dernier temps d'injection. Les trois temps de prélèvement des organismes J7, J14 et J21 correspondaient alors respectivement à des concentrations appliquées en argent de 25, 38 et 50 µg.L^{-1}

Environ 2000 à 2500 *G. roeseli* ont été prélevés dans la Nied française en Octobre 2013 puis soumis à 6 jours d'acclimatation dans de l'eau minérale Volvic en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Le jour de l'introduction des organismes, 33 pools de 50 gammares de sexe indifférencié mais de taille homogène ont été triés puis 27 de ces pools ont été répartis dans les 27 cages contenant des feuilles conditionnées avant d'être implantées dans leurs milieux d'expositions. Sur les 6 pools restants, 3 ont servis de T0 et les 3 autres ont permis la mesure de la masse sèche moyenne d'un gammare sur la base de 15 lots de 10 gammares pesés. Cette dernière a été estimée à 4,15 ± 0,42 mg.

Figure 57 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 5 (Cf.Chapitre 2, tableau 9)

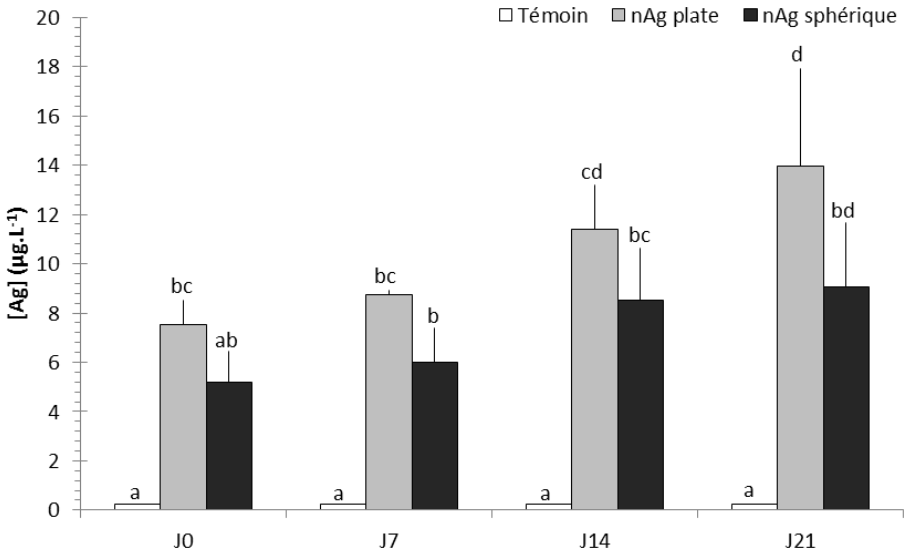
Mesures : Les mesures effectuées, communes aux trois mésocosmes, ont été décrites dans le paragraphe II.1 précédent. Concernant les concentrations et activités des 13 biomarqueurs cellulaires mesurées sur un même pool de gammares, les activités de la CSP et de la catalase n'ont pas pu être exploitées. Leurs protocoles ont par la suite été optimisés.

Traitement statistiques : Pour les figures (58-60, 62 et 65) et le tableau 17, des anovas à deux facteurs (contamination et temps) ont été effectuées parfois suivies de tests post-hoc TukeyHSD. Quand les conditions d'application de l'anova (normalité des résidus de l'anova et homogénéité des variances) n'ont pas été vérifiées (Figures 63 et 64), une anova non paramétrique de Kruskall-Wallis a été effectuée suivi de tests post-hoc de comparaisons multiples. Finalement, une analyse discriminante linéaire (LDA) a été effectuée sur les valeurs des 11 biomarqueurs selon le protocole statistique décrit dans le chapitre 2.

II.2.1. Résultats

II.2.1.1. Concentration en argent dans les milieux d'expositions et les gammares

Les injections de nAg effectuées tous les 2 ou 3 jours ont permis une contamination progressive des milieux d'exposition. Ainsi les concentrations nominales en argent attendues au jour J0 d'introduction des organismes et aux jours de prélèvements J7, J14 et J21 s'élevaient respectivement à 12,5 ; 25 ; 38 et 50 µg.L^{-1}. Les résultats des dosages des concentrations en argent total mesurées (ICP-MS) à ces 4 temps sont présentés dans la figure 58. Si des différences significatives sont observées pour chaque variable, l'anova à deux facteurs n'a pas mis en évidence d'interaction entre les formes de contamination et le temps de prélèvement. Les dosages de contrôle réalisés dans les milieux témoins ont systématiquement révélé des concentrations inférieures à la limite de détection de l'appareil (<0,25 µg.L^{-1}, ICP-MS). Les contaminations progressives des milieux ont été homogènes entre les 2 types de nAg, elles-mêmes significativement supérieures aux témoins, excepté pour les nAg sphériques à J0. Les concentrations en argent dissous issu des nAg plates ont été plus élevées au jour J21 par rapport au jour J0. Une tendance similaire bien que non significative a aussi été observée pour la condition nAg sphérique.



<u>Figure 58 :</u> Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans l'eau des dispositifs d'exposition au jour J0 de l'introduction des gammares et après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent nominales appliquées de 12,5, 25, 38 et et 50 µg.L$^{-1.}$ Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

Les concentrations en argent dissous mesurées par ultrafiltration aux jours J0, J7, J14 et J21 sont restées en dessous des limites de détection de l'appareil (<0,250µg.L^{-1}) et les concentrations en argent labile mesurées via les DGT se sont situées entre 0 et 18 ng.L^{-1} représentant systématiquement moins de 0,2% de la concentration introduite.

Concernant les gammares, l'anova à deux facteurs n'a montré la présence de différences significatives qu'entre les conditions de contamination et seules les mesures des concentrations en argent total des organismes exposés aux nAg sphériques après 14 jours et aux nAg plates et sphériques après 21 jours ont été significativement supérieures à celles mesurées dans les organismes témoins (Figure 59). Pour chaque temps d'exposition, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions d'exposition nAg plate et nAg sphérique.

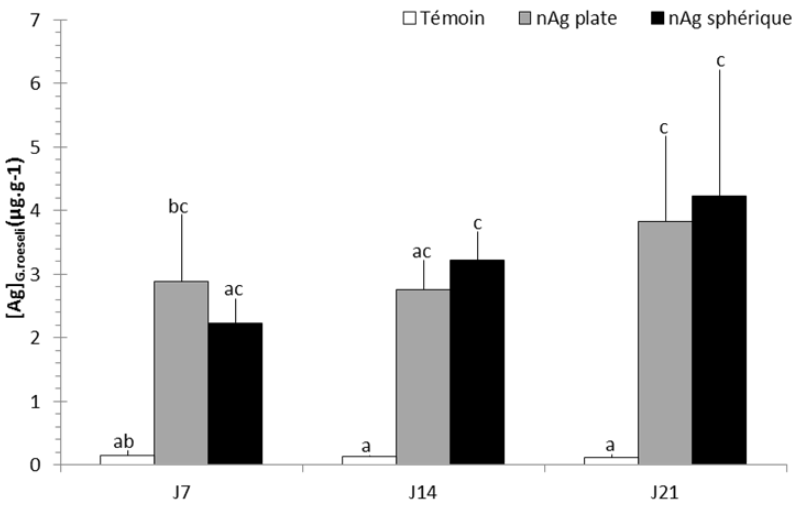


Figure 59 : Moyennes (+ écart-types, n=3) des concentrations en argent total mesurées dans les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.2.1.2. Mortalité des organismes

Les pourcentages de survie des organismes après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux différentes conditions de contamination sont présentés dans la figure 60. Les résultats statistiques concernant l'anova à 2 facteurs montrent que les expositions aux nAg n'ont pas eu d'effet sur la mortalité des organismes. A l'inverse le facteur temps d'exposition a induit une augmentation de la mortalité (F-value=35,30, ddl=2 et p-value<0,001) et ce, indépendamment du type d'exposition. En moyenne, la survie s'est élevée à 86 ± 5 % à J7 contre 71 ± 7 % à J14 et 53 ± 13 % à J21.

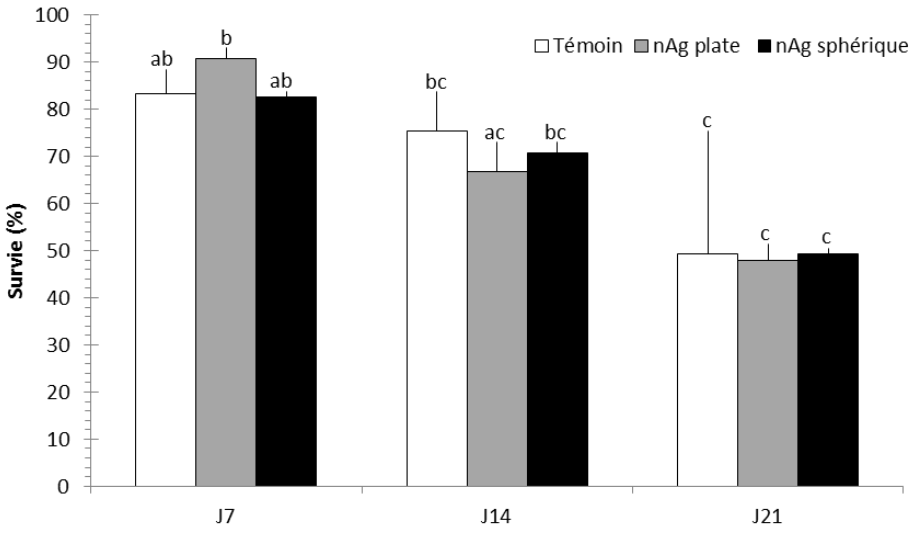


Figure 60 : Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L$^{-1.}$ Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.2.1.3. Biomarqueurs cellulaires

II.2.1.3.1 Approche multibiomarqueurs et analyse discriminante

Les valeurs moyennes et écart-types mesurées pour les 13 biomarqueurs analysés sur un même pool de gammares sont présentées dans le tableau 16 et la significativité des tests statistique dans le tableau 17. Seuls les résultats obtenus pour les concentrations en triglycérides et l'activité ETS ont montré un effet interaction entre les conditions de contamination et le temps d'exposition. Les résultats obtenus pour les témoins à 14 jours ont, pour ces 2 biomarqueurs, présenté des valeurs inférieures aux témoins J7. On notera également qu'à J21, l'activité ETS des organismes exposés aux nAg sphériques était significativement plus faible que celle mesurée dans les gammares témoins (TukeyHSD, p-value=0,039) et dans les gammares exposés aux nAg plates (TukeyHSD, p-value=0,027). Toutes conditions de contamination confondues, des effets proportionnels aux temps d'exposition des gammares dans les dispositifs ont été observés. Ainsi, des baisses significatives des concentrations en protéines et en cholestérol dosées sur les broyats entre les temps J7 et J21 ont été observées. De la même façon les réponses de la TAC, négative à J7 et positives à J14 et J21 sont statistiquement différentes.

Tableau 16 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs de biomarqueurs cellulaires mesurées sur les G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux nAg plate et sphérique qui correspondent respectivement à des concentration en argent appliquée de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}.

		J7	J14	J21
Protéine broyat (mg/gMF)	témoin	32,5 ± 4,6	23,2 ± 2,9	18,4 ± 6,1
	nAg plate	24,6 ± 2,9	22,0 ± 2,2	22,7 ± 3,0
	nAg sphérique	25,8 ± 3,1	23,8 ± 2,6	19,0 ± 4,4
Protéine fraction cytosolique (mg/gMF)	témoin	17,0 ± 7,6	20,1 ± 2,3	15,7 ± 3,7
	nAg plate	21,0 ± 5,0	17,9 ± 1,0	16,8 ± 3,4
	nAg sphérique	20,4 ± 1,6	20,2 ± 4,3	16,6 ± 5,4
Cholestérol (mg/gMF)	témoin	0,83 ± 0,26	0,5 ± 0,06	0,46 ± 0,13
	nAg plate	0,60 ± 0,17	0,58 ± 0,12	0,56 ± 0,02
	nAg sphérique	0,58 ± 0,06	0,52 ± 0,16	0,46 ± 0,03
Triglycéride (mg/gMF)	témoin	8,00 ± 2,06 *(a)*	3,22 ± 1,07 *(ad)*	0,88 ± 0,75 *(d)*
	nAg plate	4,90 ± 0,88 *(abc)*	2,92 ± 0,87 *(cd)*	2,05 ± 1,34 *(cd)*
	nAg sphérique	5,42 ± 0,20 *(ac)*	4,29 ± 1,33 *(cd)*	1,47 ± 1,39 *(bd)*
ETS (µmol O2,gMF-1,h-1)	témoin	34,2 ± 1,7 *(a)*	28,1 ± 2,9 *(bc)*	30,2 ± 0,7 *(ab)*
	nAg plate	32,0 ± 1,1 *(ab)*	30,1 ± 2,2 *(ab)*	30,5 ± 2,7 *(ab)*
	nAg sphérique	30,3 ± 2,5 *(ab)*	30,1 ± 1,4 *(ab)*	24,4 ± 1,0 *(d)*
LOOH (nmol/gprot)	témoin	568 ± 45	613 ± 116	647 ± 220
	nAg plate	635 ± 90	590 ±63	485 ± 18
	nAg sphérique	616 ± 58	698 ± 144	580 ± 121
ACP (µmol/gprot/h)	témoin	9,26 ± 0,57	10,10 ± 2,07	11,24 ± 4,94
	nAg plate	9,45 ± 2,09	10,22 ± 0,34	9,93 ±1,43
	nAg sphérique	9,53 ± 0,77	9,63 ± 0,43	10,34 ± 2,69
TAC (µmolTeq/gprot/min)	témoin	-17,3 ± 3,2	10,9 ± 10,9	16,0 ± 11,5
	nAg plate	-16,3 ± 3,1	-0,3 ± 5,7	1,2 ± 7,4
	nAg sphérique	-9,4 ± 5,7	8,00 ± 14,4	10,4 ± 22,0
LDH (µmolNADH/gprot/h)	témoin	2182 ± 1561	805 ± 539	835 ± 578
	nAg plate	1229 ± 1174	1458 ± 917	1646 ± 1148
	nAg sphérique	979 ± 704	1219 ± 873	1310 ± 1433
Gpx (µmolNADPH/gprot/min)	témoin	199 ± 50	208 ± 34	263 ± 55
	nAg plate	188 ± 45	216 ± 18	276 ± 88
	nAg sphérique	206 ± 26	235 ± 64	210 ± 25
GST (µmolCDNB/gprot/min)	témoin	55,5 ± 23,8	43,1 ± 12,0	46,6 ± 15,6
	nAg plate	49,1 ± 10,0	49,9 ± 15,9	60,3 ± 2,4
	nAg sphérique	56,7 ± 11,1	40,7 ± 11,3	62,1 ± 30,9

Tableau 17 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives.

	Contamination (ddl=2)		temps (ddl=2)		Interaction (ddl=4)	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
[Protéine]broyat	0,62	0,548	9,57	**0,001****	2,31	0,096
[Protéine]f. cytosolique	0,25	0,775	1,52	0,245	0,41	0,799
[Triglycéride]	0,86	0,436	33,52	**<0,001*****	3,31	**0,033***
[Cholestérol]	0,88	0,429	4,32	**0,029***	1,69	0,195
ETS	5,25	**0,015***	9,12	**0,001****	4,12	**0,015***
LOOH	0,66	0,527	0,68	0,519	0,93	0,464
ACP	0,06	0,933	0,55	0,585	0,13	0,966
TAC	1,62	0,224	11,87	**<0,001*****	0,47	0,75
LDH	0,2	0,815	0,21	0,809	0,78	0,549
Gpx	0,09	0,911	2,42	0,117	0,85	0,511
GST	0,22	0,798	1,15	0,336	0,44	0,775

La majorité des réponses biologiques mesurées n'a pas révélé d'effets de l'exposition des gammares aux 2 types de nAg. Les résultats de la LDA permettant l'étude de la batterie de biomarqueurs dans son ensemble sont présentés dans le tableau 18. Dans cette LDA, un ensemble de 6 biomarqueurs a été suffisant pour discriminer les 9 conditions différentes. Une significativité élevée du modèle a été observée (Lambda Wilks : p-value = $1{,}75.10^{-4}$) et est associée à un faible taux d'erreur (0,04). Les concentrations en triglycérides, les activités ETS et la TAC sont quant à elles, les 3 variables significatives de ce lot de 6 biomarqueurs.

Tableau 18 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conservés pour la LDA.

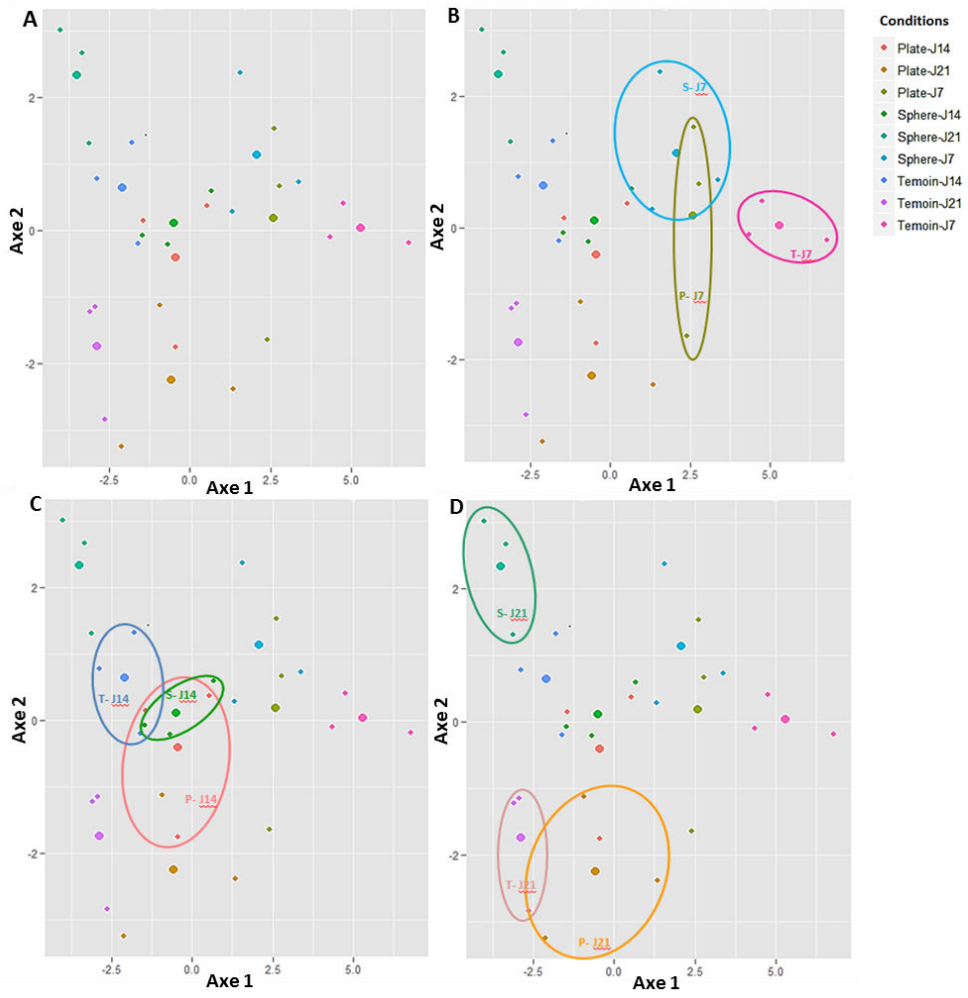
Pouvoir discriminant	Axe 1 : 0,70		Axe 2 : 0,17		Significativité des variables
Coefficient	Brut	Standardisé	Brut	Standardisé	p-value
[Triglycéride]	0,573	1,352	0,384	0,908	<0,001
ETS	0,306	0,928	-0,431	-1,306	<0,01
TAC	-0,085	-1,280	0,012	0,173	<0,05
Gpx	0,003	0,131	-0,019	-0,989	0,434
LOOH	0,002	0,175	0,007	0,797	0,606
GST	0,038	0,607	0,055	0,884	0,789

La représentation graphique de la LDA est donnée dans la figure 61A. Compte tenu du nombre de conditions à observer, 3 représentations graphiques supplémentaires ont été effectuées correspondant chacune à un temps de prélèvement et les réponses à observer ont été mises en évidence à l'aide d'ellipses (Figure 61B, C, D). Après 7 jours d'exposition, les mesures relatives aux organismes témoins présentent une homogénéité sur les deux axes et les représentations elliptiques ne recoupent pas celles

des 2 types de nanoparticules. Les mesures des nAg plates et sphériques sont quant à elles plus dispersées sur l'axe 2, et leurs ellipses se recoupent entre elles.

Après 14 jours d'exposition, les mesures des témoins, toujours homogènes, sont cependant situées à l'extrémité de celles observées à J7 sur l'axe 1. La totalité des points correspondant aux conditions témoins, nAg plates et nAg sphériques est regroupée. Leurs 3 représentations elliptiques se chevauchent complètement (nAg plates et sphériques) ou se recoupent partiellement (Témoin par rapport aux nAg plates et sphériques).

A J21, les mesures témoins, toujours homogènes, sont bien séparées de celles relatives aux temps J7 et J14. Les mesures des nAg plates recoupent alors celles des témoins et ces deux conditions sont clairement séparées de la condition nAg sphériques.



<u>Figure 61 :</u> A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition, n=3) sur les valeurs des 11 biomarqueurs et discriminée par 6 d'entre eux. B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, nAg plate et nAg sphérique à J7, J14 et J21.

II.2.1.3.2. Activité de transport MXR

L'ANOVA à deux facteurs révèle un effet de l'interaction conditions de contamination X temps d'exposition sur les activités de transport MXR dans les branchies des gammares (Figure 62, F-value=9,09, ddl=4 et p-value<0,001). Pour les organismes témoins, les moyennes d'activités négatives mesurées après 7 jours sont statistiquement différentes de celles, positives mesurées à J14 et J21. Les organismes exposés aux nAg plates présentent des activités similaires aux témoins à tous les temps. Au contraire, les nAg sphériques semblent induire des activités MXR différentes de leurs témoins respectifs à J7 et J14 ainsi qu'à J7 par rapport aux gammares exposés aux nAg plates.

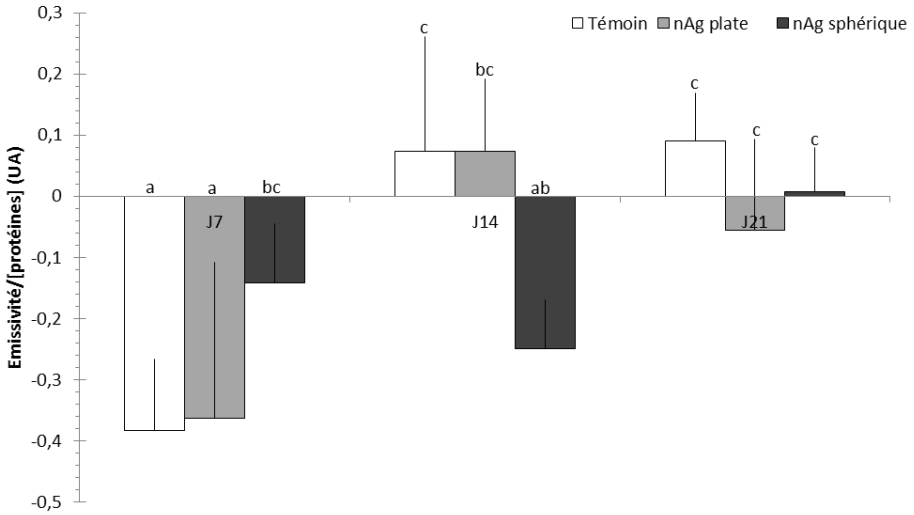


Figure 62 : Moyennes (+ écart-types) des activités de transport MXR (n=9, émissivité en unité arbitraire) mesurées chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.2.1.4. Biomarqueur physiologique : l'osmolalité de l'hémolymphe

L'osmolalité de l'hémolymphe des témoins demeure homogène entre les 3 temps (Figure 63). Les expositions aux nAg plates n'ont pas induit d'effet sur les mesures à J7, J14 et J21. En ce qui concerne l'exposition aux nAg sphériques, une baisse significative est observée à J21 par rapport au témoin correspondant. Par contre les valeurs d'osmolalité mesurées chez les gammares exposées aux nAg sphériques ne sont jamais significativement différentes de celles observées chez les organismes exposés aux nAg plates.

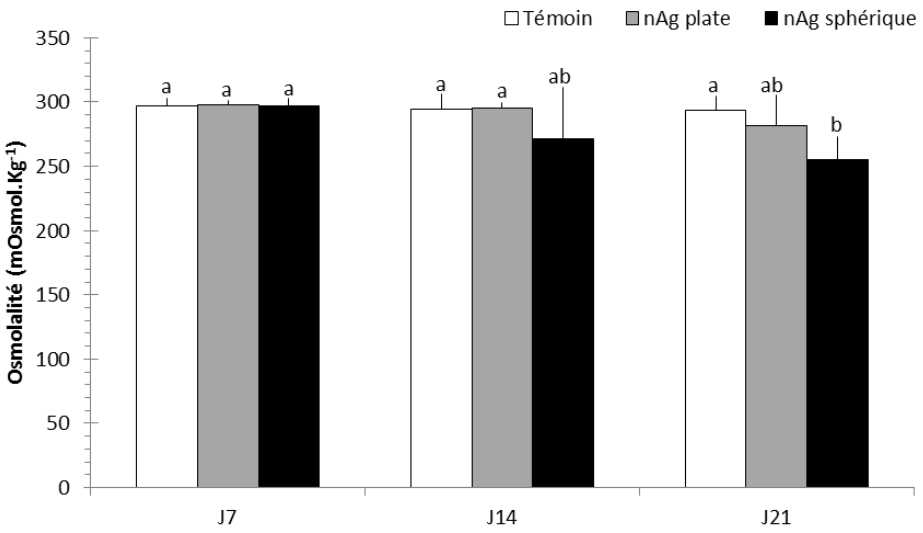


Figure 63 : Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.2.1.5. Les biomarqueurs de comportement

II.2.1.5.1. La ventilation

Les anovas non paramétriques de Kruskal-Wallis révèlent des différences significatives dépendantes de la contamination (ddl=2 et p-value<0,05) et du temps d'exposition (ddl=2 et p-value<0,001). La ventilation chez les gammares témoins est restée constante durant les 3 temps d'exposition (Figure 64). Pour chaque temps, aucune différence n'a été observée entre les 3 formes de contamination. Par contre une diminution significative de la ventilation est observée entre les temps J7/J14 et J21 pour les nAg plates et entre J7 et J21 pour les nAg sphériques.

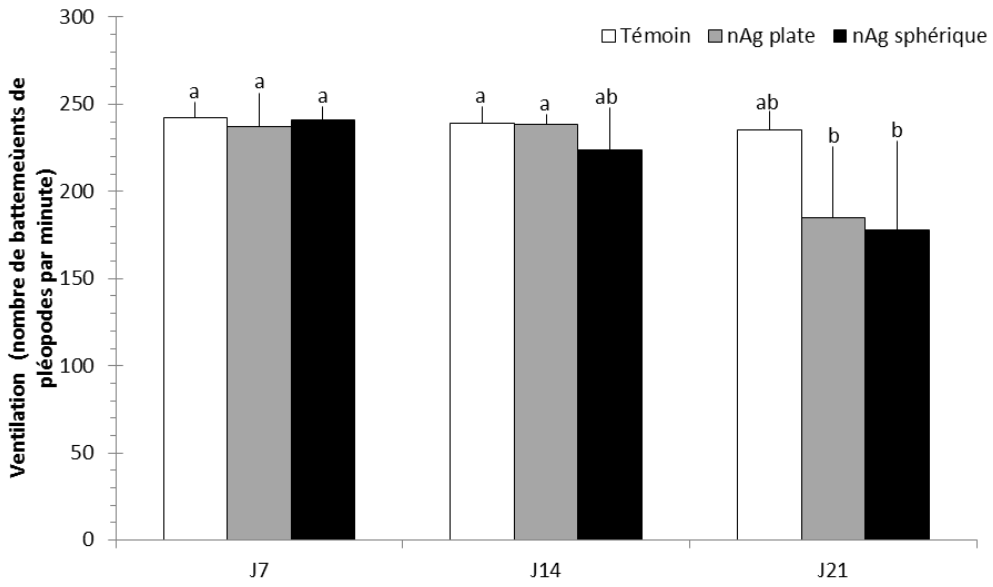


Figure 64 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.2.2.5.2. La locomotion

Des effets liés au temps d'exposition des gammares aux nAg ont été observés sur la locomotion (Figure 65, anova à deux facteurs, F-value=49,62, ddl=2 et p-value<0,001). Aux 3 trois temps considérés, les pourcentages de locomotion des témoins demeurent similaires entre eux (proches de 50%) et à J7 et J14, aucune différence n'a été observée entre les 3 conditions d'exposition. Par contre, à J21 les gammares exposés aux nAg plates et sphériques montrent une diminution de locomotion par rapport aux témoins ainsi que par rapport aux temps J7 et J14. La réduction de l'activité de locomotion est d'environ 70% pour les nAg plates et de 50% pour les nAg sphériques et les activités mesurées sont significativement différentes.

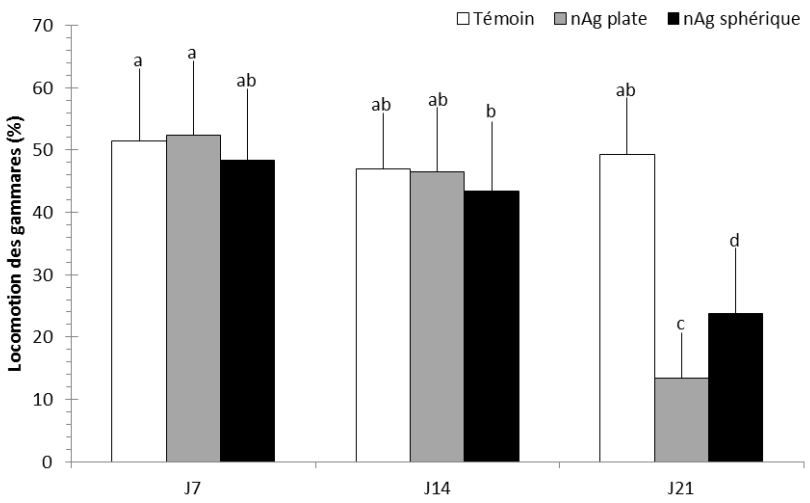


Figure 65 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nAg plates et sphériques qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 25, 38 et et 50 µg.L-1. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.3.2. Discussion

II.3.2.1. Effets des dispositifs d'expérimentation, du temps d'exposition et de la température sur les gammares

Dans la littérature, les gammares ont plusieurs fois été étudiés dans des expériences en mésocosmes. Certaines ont eu pour but d'évaluer les effets de contaminants par l'utilisation de rivières artificielles (Böttger et al., 2013; Heckmann and Friberg, 2005; E. . Taylor et al., 1994) alors que d'autres se sont intéressées aux interactions entre espèces, comme par exemple l'étude sur la coexistence entre une espèce de gammare invasive, *Dikerogammarus villosus* et une espèce native, *G. pulex* (Felten et al., 2008). A notre connaissance, aucune étude ne fait encore état des effets de nanoparticules sur les gammares en mésocosmes.

Les résultats de survie des gammares observés dans cette étude montrent que dans les dispositifs, la mortalité a progressivement augmenté tout au long de l'expérience, atteignant à J21 des taux de mortalité significativement plus élevés par rapport à J7 et avoisinant les 50%. Ces taux de mortalité sont restés homogènes entre les conditions témoins et contaminées révélant ainsi un effet, non pas dû aux nAg, mais plutôt lié à l'expérimentation elle-même. De plus, une représentation de l'interaction entre le temps passé dans les mésocosmes et les pourcentages de mortalité observés a permis de calculer un coefficient de détermination (R^2) de 0,99 indiquant ainsi un effet du temps sur la survie (non présenté).

Dans leur étude, Böttger et al. (2013) avaient eux-aussi observé durant la dernière semaine de leur expérimentation qui avait duré 70 jours, une augmentation de la mortalité globale de *G. roeseli* disposés dans des cages contenant également des feuilles d'aulne. Ils avaient alors émis l'hypothèse que dans ces cages, les feuilles représentaient le seul élément d'habitat pour les gammares qui leur permettait notamment de se cacher lors des mues. En fin d'expérience, les feuilles ayant été largement consommées, les faibles quantités de ressources nutritives restantes associées à la perte de refuge pour les organismes auraient pu favoriser des comportements de cannibalisme, bien connus chez les gammares (Dick, 1995; Kelly et al., 2002b; MacNeil et al., 1997). Dans la présente étude, l'hypothèse d'une quantité de ressource nutritive insuffisante n'est pas validée puisque les masses de feuilles introduites avaient été calculées pour permettre aux gammares d'être nourris *ad libitum* pendant 21 jours. Cependant, l'hypothèse du cannibalisme pourrait s'avérer être un des paramètres explicatifs puisque peu de corps d'individus morts ont été retrouvés dans les cages, et que ce comportement à systématiquement été observé dans chacune des études menées sur *G. roeseli* dans le cadre de cette thèse. Par exemple, dans l'expérience 1 où 3 espèces de gammares avaient été étudiées, aucune mortalité significative n'avait été observée chez les organismes (20 mâles pour 400 mL), cependant, après 72 h d'exposition les pourcentages de survie chez *G. fossarum* et *G. pulex* s'élevaient chacun à 94 ± 6% alors que chez *G. roeseli* cette survie était de 90 ± 6%.

Une autre hypothèse pourrait être celle de la température de l'eau dans les dispositifs. En effet, si les expériences détaillées dans le chapitre 3 se sont déroulées en conditions contrôlées à une température optimale pour les gammares de 12 °C, dans cette étude elle a été mesurée entre 17 et 21 °C (Annexe 6). Rappelons que ces études en mésocosmes ont été menées dans un contexte collaboratif inter et intra-laboratoires avec un protocole commun ne nous permettant pas de pouvoir travailler à des températures plus faibles. Pour pallier à cela, les gammares prélevés dans l'eau de la Nied à 10 degré avaient d'abord été acclimatés pendant 3 jours à de l'eau de Volvic à 12 °C, puis les bacs d'acclimatation avaient été disposés, 3 jours avant l'introduction des gammares, à côté des futurs bacs d'exposition pour permettre leur acclimatation progressive à la température de l'eau des mésocosmes qui s'élevait déjà à ce moment-là à plus de 21°C (Annexe n). Au jour J0 de l'introduction des gammares et aux jours J7, J14 et J21 de prélèvement, les températures s'élevaient respectivement à 21, 18, 17 et 18 °C.

Dans la littérature, les protocoles des études s'intéressant aux effets de la température sur les gammares ont rarement dépassés les 20 à 24 °C pour *G. roeseli* (Dehedin et al., 2013; Pöckl, 1992; Sornom et al., 2010). Ces études ont par exemple montré que 20 °C représentait la limite supérieure de température au-delà de laquelle, chez *G. roeseli,* la reproduction était négativement affectée (Pöckl et

al., 2003). Elle correspond également à la température pour laquelle *G. roeseli* possède une croissance maximale associée à une plus faible durée de vie de 280 à 300 jour à 20 °C contre 550 à 600 jours à 12 °C, soit le double de temps (Pöckl, 1992). De plus, dans leur étude menée sur des gammares (*G.roeseli*) également prélevés dans la Nied Française, Sornom et al. (2010) ont montré des effets significatifs de la température avec, pour une même salinité, des valeurs de mortalité et de ventilation plus élevées à la plus forte température testée (18 °C). Au niveau cellulaire, dans leurs études également effectuées sur la Nied française et sur la même espèce, Sroda and Cossu-Leguille (2010) ainsi que Gismondi et al. (2012) ont montré qu'en été, lorsque l'eau présentait les températures les plus élevées (de 19 à 23 °C), les réserves énergétiques, via les mesures de concentrations lipidiques, étaient négativement corrélées aux fortes températures. Cette corrélation peut être due aux coûts énergétiques que représentent les processus de reproduction et de mue mis en place lors d'un réchauffement de température de l'eau (Pöckl, 1992; Pöckl et al., 2003). Dans notre étude, la température moyenne de 18 ± 1 °C mesurée dans les dispositifs correspondait aux températures mesurées en fin de printemps et début d'été dans la Nied. Les mesures de biomarqueurs effectuées au niveau cellulaires ont donc été cohérentes, puisque les valeurs correspondant aux réserves énergétiques (concentration en protéines, triglycérides, cholestérol et activité ETS) ont significativement diminué au cours du temps pouvant ainsi montrer la mise en place progressive de mécanismes à forts coûts métaboliques. Une hypothèse serait de dire, que la hausse de température subie par les gammares avant le début de l'expérimentation a mimé le passage à l'été et donc une période favorable à la reproduction composée de courtes périodes de mue et d'une rapide maturation sexuelle des gammares (Pöckl, 1992). En effet, de jeune gammares encore sexuellement indifférenciables ont été choisis pour cette étude, et leur masse sèche a augmenté de 21 % entre J0 et J21.

Concernant l'activité de transport MXR, les différences significatives observées chez les témoins entre J7 et J14/J21 pourraient être corrélées à cette prise de masse par les gammares, puisque des tests internes au laboratoire ont déjà montré que les substrats utilisés pour les mesures pouvaient être cytotoxiques sur de jeunes gammares de petites tailles. En effet, des activités de transport négatives n'ont pas de signification biologique cohérente et sont le reflet d'une cytotoxicité. Cette cytotoxicité existant chez les témoins semble s'annuler à J14/J21, probablement en lien avec la prise de masse des gammares ayant survécu. De ce fait, leur taille ayant augmenté, l'activité de transport MXR a pu être mesurée, même si elle est restée très faible. Dans la littérature, les mesures d'osmolalité sur les crustacés se sont plutôt intéressées aux effets de la salinité, cependant certaines y ont associé le facteur

température mais n'ont pas montré de tendance générale quant à son importance sur l'osmolalité (Dobrzycka-Krahel et al., 2014; Einarson, 1993; Sornom et al., 2010).

La ventilation et la locomotion n'ont pas été modifiées au cours de l'expérimentation en mésocosme contrairement à l'hyperventilation observée par Sornom et al. (2010) à 18 °C. Dans leur étude, Wijnhoven et al. (2003) ont étudié la ventilation chez *G. roeseli* en fonction d'une hausse de température et ont montré que le nombre de battements de pléopodes par minute était augmenté de 140 à 230 entre 17 et 21°C jusqu'à atteindre une température critique de 29-30 °C, au-delà de laquelle la ventilation avait considérablement diminué. Malgré un milieu d'exposition différent, ces valeurs sont cohérentes avec celles observées dans notre étude où les moyennes des battements de pléopodes des témoins à 18 °C s'élevaient à 240 ± 10.

II.3.2.2. Effet des nAg sur les gammares

II.3.2.2.1. Concentration en argent dans les milieux d'exposition et les gammares

Les expérimentations en mésocosmes sur les nAg sont peu nombreuses. L'étude de Lowry et al. (2012) s'est surtout intéressé à la distribution et à la spéciation de l'argent dans les différents compartiments d'une zone humide d'eau douce. Celle de Buffet et al. (2014) a quant à elle couplé des mesures de dissolution des nAg aux effets observés sur des organismes marins exposés à de très faibles concentrations, et enfin, Cleveland et al. (2012) ont étudié les rejets d'argent issus de produits de consommation composés de nAg en mimant un écosystème estuarien. Ces études très complètes et qui apportent des informations sur des situations précises de contamination d'un milieu, reposent cependant sur de nombreux paramètres propres à chacune d'elle et il apparaît difficile de comparer les comportements des nAg dans des systèmes si différents.

Dans notre étude, les injections successives ont bien permis une contamination progressive des systèmes dans le temps, bien que l'augmentation des concentrations soit non significative pour la forme sphérique. Cependant, les concentrations mesurées dans la colonne d'eau ne représentaient pour les nAg plates que 60 à 28% et pour les nAg sphériques que 41 à 18% des concentrations totales appliquées respectivement à J0 et J21. Les nAg introduites dans les milieux ont par exemple pu s'agréger à la matière organique formant des hétéroagrégats qui ont pu sédimenter, mais ont aussi pu s'adsorber sur les organismes, les parois ainsi que tous les dispositifs présents dans les mésocosmes. Les nAg peuvent également relarguer de l'argent dissous via la dissolution oxydative (Liu and Hurt, 2010). Cependant dans nos systèmes, aucune valeur de concentration en Ag située au-dessus de la limite de détection de l'ICP-MS (0,250 $\mu g.L^{-1}$) n'a été mesurée après ultrafiltration du milieu. L'insertion de DGT dans le milieu a

toutefois permis de mesurer des concentrations en argent labile de l'ordre du $ng.L^{-1}$, ce qui représentait moins de 0,2% de l'argent introduit. Ces deux résultats semblent indiquer que les conditions physico-chimiques de nos milieux n'ont pas favorisé la dissolution des nAg.

L'exposition des gammares aux deux types de nAg, a bien induit une contamination des organismes à l'argent, mais malgré une legère tendance à l'augmentation, cette dernière est resté uniforme entre les temps J7, J14 et J21, contrairement à ce qui a été observé dans le milieu. Plusieurs études ont déjà observé une bioaccumulation des nAg dans les tissus et organes de certains organismes d'eau douce. Par exemple, Georgantzopoulou et al. (2013) ont visualisé la présence de nAg de 200 nm semblant passer l'espace intercellulaire de la couche epithéliale de la membrane de l'intestin de *Daphnia magna* (NanoSims). Asharani et al. (2008) ont quant à eux observé que des nAg enrobées de BSA (albumine de sérum bovin) d'environ 20 nm avaient tendance à s'accumuler dans les noyaux de cellules de poisson zèbre. Ils ont par ailleurs montré leur distribution dans le cerveau, le cœur et le sang d'embryons de *Danio rerio* (MET et EDS). Dans l'étude présentée ici, ce type d'analyse en imagerie n'a pas pu être mis en place ne permettant pas de savoir si l'argent a été ingéré par voir trophique et/ou bioaccumulé et/ou adsorbé.

II.3.2.2.2. Niveau cellulaire et physiologique

Sur le pool de biomarqueurs cellulaires mesurés, malgré un effet de l'interaction temps d'exposition X conditions de contamination sur les concentrations en triglycérides et l'activité ETS, seule l'activité ETS a diminué en réponse à la contamination. Cette baisse a été observée uniquement chez les gammares exposés durant 21 jours aux nAg sphériques. Schmidlin et al. (2015) ont étudié l'activité ETS sur des gammares (*G. fossarum*) et ont également montré qu'une exposition au sulfate de cuivre pouvait en engendrer une baisse significative. Concernant les mécanismes de réponses antioxydantes et antitoxiques mesurées par les autres biomarqueurs, aucun effet de l'argent n'a été observé. L'induction de ces mécanismes par l'argent issu des nAg a pourtant déjà été observée chez les organismes marins *S. plana* et *H. diversicolor* (Buffet et al., 2014).

L'activité de transport MXR correspond à un mécanisme de défense qui, par l'intermédiaire de pompes membranaires, permet d'expulser les xénobiotiques hors des cellules. Dans cette étude, une forte toxicité des substrats (Calcéine-AM et inhibiteurs) sur les jeunes organismes de petite taille ne permet pas d'émettre d'hypothèses fiables quant à un effet des nAg. Cependant, on peut observer une légère tendance intéressante entre les 3 temps. La croissance des gammares entre les temps J0 et J21 a réduit ce phénomène de toxicité puisque les témoins ont retrouvé des moyennes d'activité positives dès

J14. Les gammares exposés aux nAg plates ont présenté le même schéma de réponse que les témoins alors qu'il a fallu attendre le temps J21 pour pouvoir l'observer chez les gammares exposés aux nAg sphériques. Ce décalage pourrait résulter d'un effet plus marqué des nAg sphériques, retardant la récupération d'une activité MXR mesurable.

La mesure de l'osmolalité de l'hémolymphe représente un biomarqueur physiologique pour évaluer un état de stress chez des gammares soumis à une contamination (V. Felten et al., 2008b; Issartel et al., 2010; Lignot et al., 2000; Vellinger et al., 2012). Dans cette étude, l'exposition des gammares pendant 21 jours et à 50 $\mu g.L^{-1}$ de nAg de forme sphérique a induit une diminution significative de l'osmolalité suggérant ainsi un dysfonctionnement de la régulation ionique. Cette observation est cohérente avec la littérature puisqu'il a plusieurs fois été montré que les stress métalliques et notamment l'argent engendrait une diminution d'osmolalité résultant d'une perte en ions Na^+ et Cl^- du milieu intérieur (Arce Funck et al., 2013; Grosell et al., 2002a, 2002b).

II.3.2.2.3. Niveau individuel : ventilation et locomotion

Au niveau individuel et plus précisément comportemental, seules les mesures de locomotion des organismes ont mis en évidence la présence d'effets chez les gammares soumis à la plus forte concentration d'exposition (50 $\mu g.L^{-1}$) et après 21 jours par rapport aux témoins. Une même tendance non significative est également observable pour la ventilation.

Les mesures des activités de locomotion des gammares apportent généralement une réponse rapide des effets d'une exposition à de très faibles concentrations (Gerhardt, 1996). Dans cette étude, la baisse de locomotion observée seulement chez les organismes exposés 21 jours à la plus forte concentration de nanoparticules pourrait suggérer que, suite à la détection de l'argent dans le milieu, et parce qu'ils possédaient déjà des niveaux de réserves énergétiques bas, les gammares auraient réduit leurs dépenses énergétiques en diminuant leur locomotion, afin de pouvoir mettre en place des mécanismes de détoxication également coûteux en énergie. Cette hypothèse de redirection et de réallocation énergétiques a déjà été émise par Lawrence and Poulter (1998) ainsi que par (Felten et al., 2008b) et Arce Funck et al. (2013) qui ont eux aussi observé des baisses des activités de locomotion et de ventilation respectivement chez *G. duebeni* exposé au cuivre et chez *G. fossarum* exposés au cadmium ou à l'argent.

II.2.2.3. Effet de la forme des nAg

Dans cette étude, deux formes de nAg possédant une même surface spécifique ont été testées, la forme cubique et la forme plate triangulaire. Si les concentrations d'exposition de ces deux formes dans les milieux et les organismes sont restées homogènes, des effets différents ont tout de même parfois été observés. Les biomarqueurs étudiés un à un au niveau cellulaire n'ont pas montré, hormis l'ETS, d'effet marqué de la contamination. Une analyse discriminante groupant la totalité des mesures obtenues a permis de synthétiser l'information afin de pouvoir dégager des tendances générales non observables en considérant chaque biomarqueur isolément. Les résultats de l'analyse discriminante ont révélé que 3 des biomarqueurs testés permettaient de différencier les 9 conditions de contamination (concentration en triglycéride, activité ETS et TAC). De plus, elle a également montré des profils similaires de réponses liés aux nAg plates et sphériques semblant s'écarter de ceux observés chez les témoins à J7 et une homogénéité des réponses entre les 3 conditions à J14. Par contre, à J21 les gammares exposés aux nAg sphériques ont présenté des profils de réponses différenciés (axe 2 discriminant) de ceux des conditions témoin et nAg plates permettant l'observation d'un effet dû à la forme des nanoparticules.
Pour les autres mesures (à l'exception de la locomotion) et malgré l'absence de différence significative entre les deux formes, les nAg sphériques sont celles qui semblent avoir le plus d'effets sur les gammares à J21. Pour la locomotion une différence a par contre été observée et a montré un effet plus marqué des nAg plates à J21.

Dans la littérature, si les effets des nAg en fonction de leur taille sont relativement bien renseignés, quelques études se sont également intéressées à l'effet de la forme. Ainsi, Wiley et al. (2005) ont montré que les différentes formes de nAg peuvent, d'un point de vue cristallographique, se composer de différentes facettes comme par exemple les facettes {100}, {110} et {111}. D'autres travaux s'intéressant à la réactivité de ces différentes facettes, ont montré que la facette {111} était la plus réactive et que les nAg possédant une morphologie présentant les plus forts pourcentages de facettes {111} à leur surface étaient également celles qui interagissaient le mieux avec la membrane des *E. coli* et étaient donc celles qui induisaient le plus d'effets chez la bactérie (Morones et al., 2005; Pal et al., 2007). Dans ces études, les formes présentant principalement des facettes de surface {111} étaient les formes plates triangulaires tronquées, les formes cuboctaèdres (polyèdre à 14 faces), icosaèdres (polyèdre à 20 faces) et décaèdres (polyèdre à 10 faces). La présence de défauts sur ces configurations cristallines de surface des nAg (défauts d'empilement par exemple) peuvent aussi induire des différences entre les formes de nAg (Bansal et al., 2010) et une plus forte toxicité sur les organismes, comme cela été observé sur des cellules et embryons de poisson zèbre (George et al., 2012).

Dans l'étude des effets des nAg en fonction de leur forme, deux nanoparticules présentant une même taille et une même aire de surface peuvent donc en fonction de la quantité de facettes réactives sur leur surface, avoir des effets différents sur les organismes, et ce paramètre serait donc intéressant à vérifier dans cette étude.

Conclusion

Cette étude a tout d'abord montré la grande complexité que peut représenter une expérimentation en mésocosmes. En effet, la mortalité élevée en fin d'expérience chez les témoins apparaît difficile à interpréter mais pourrait être le résultat d'une combinaison de différents paramètres (habitat, cannibalisme, température) qu'il ne nous a pas été possible de contrôler dans cette étude. Les résultats de l'exposition aux deux formes de nAg montrent un effet de l'argent principalement au niveau physiologique et sur le comportement des organismes. Ces derniers pourraient adopter une stratégie de réallocation énergétique afin d'obtenir l'énergie nécessaire à la mise en place de mécanismes de défense. Toutefois les mécanismes de défense étudiés, n'ayant pas été modifiés par l'exposition, n'ont pas permis d'appuyer cette hypothèse. Même si la forme sphérique semble être celle qui présente le plus d'effets sur les gammares, une caractérisation plus précise de la configuration cristalline de sa surface semble primordiale et devrait à l'avenir faire partie des paramètres de caractérisation des nAg à étudier avant toute expérimentation.

II.3. Effets de deux types de $nTiO_2$ (anatase bâtonnet et anatase cubique) sur l'espèce *G. roeseli* – Expérience 6

Contexte

A l'instar des nAg, les $nTiO_2$ sont elles aussi très largement exploitées, peuvent également être produites sous différentes formes et structures cristallines et peuvent être rejetées dans les écosystèmes d'eau douce. L'objectif, identique à celui de l'étude précédente, était d'évaluer les effets de deux formes de $nTiO_2$ possédant la même structure cristalline, les anatases bâtonnets (AB) et les anatases cubique (AC). Ces formes peuvent avoir une influence sur la réactivité de surface et donc induire des effets différents sur *G. roeseli*.

Mis en place et défini par le programme MESONNET, le même protocole d'expérimentation que celui établi précédemment pour les nAg a scrupuleusement été respecté. Seules les concentrations d'exposition ont changé. En effet, les $nTiO_2$ possédant des PEC plus élevées que les nAg dans les eaux de surface (Gottschalk et al., 2009; Sun et al., 2014), leur concentration finale a été augmentée à 1 $mg.L^{-1}$.

Une approche multibiomarqueur des effets biologiques a donc été mise en place via l'étude de biomarqueurs cellulaires et individuels.

Mots clés : nanoparticule de dioxyde de titane – forme - *G. roeseli* – multibiomarqueur – mésocosme

Rappels du plan expérimental

Dispositif expérimental : Deux types de $nTiO_2$ anatase ont été testés dans cette étude, elles ont été synthétisées dans un laboratoire partenaire, le CMCP (Chimie de la Matière Condensée de Paris) par Corinne Chanéac. La caractérisation de leurs suspensions stock effectuée par Christophe Pagnout (LIEC) a permis d'observer leurs formes et de mesurer leurs diamètres moyens par MET. Ainsi les $nTiO_2$ anatase de forme cubique (AC) possédaient des dimensions de 20 à 25 nm et la forme anatase bâtonnet (AB), des dimensions de 10 nm de large et 200 nm de long (Figure 66). Des mesures des cinétiques d'agrégation dans l'eau Volvic ont aussi été effectuées et sont présentées en annexe.

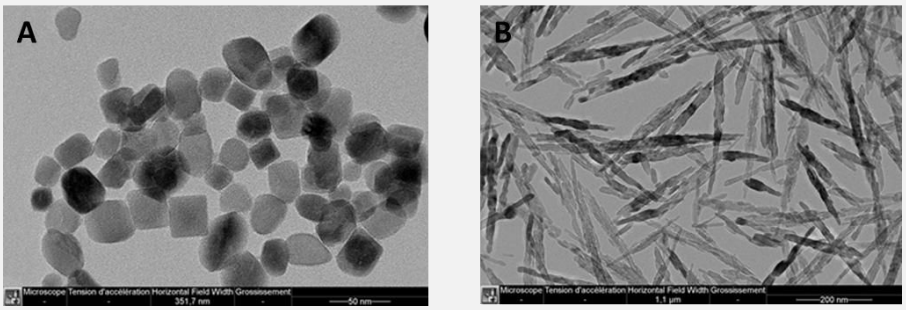


Figure 66 : Observation au MET des solutions stock des A : $nTiO_2$ anatase cubique (AB) d'une taille de 20-25 nm et B : des $nTiO_2$ anatase bâtonnet de 10 nm de large et 200 nm de long. Sources : C. Pagnout.

Les 12 injections successives (84 $\mu g.L^{-1}$) de ces deux types de $nTiO_2$ ont permis une exposition à une concentration en titane finale voulue de 1 $mg.L^{-1}$ après la dernière injection. Les trois temps de prélèvement des organismes J7, J14 et J21 correspondaient alors respectivement à des concentrations appliquées en titane de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$.

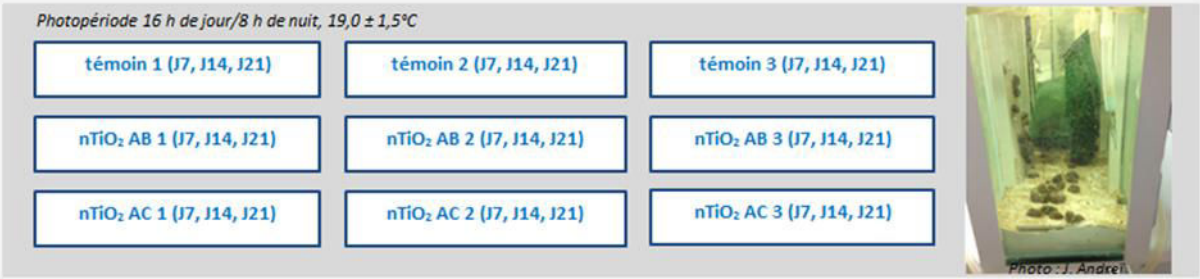


Figure 67 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 6 (Cf.Chapitre 2, tableau 9)

Environ 2000 à 2500 *G. roeseli* ont été prélevés en Moselle dans la Nied en Février 2014 puis ont été soumis à 6 jours d'acclimatation dans de l'eau minérale Volvic (supplémentée) en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Le jour de l'implantation des organismes, 33 pools de 50 gammares de sexe indifférencié et de taille homogène ont été triés puis 27 de ces pools ont été répartis dans les 27 cages

de feuilles conditionnées avant d'être implantés dans leurs milieux d'expositions respectifs. Sur les 6 pools restants, 3 ont servi de T0 et les 3 autres ont permis la mesure de la masse sèche moyenne d'un gammare sur la base de 15 lots de 10 gammares pesés. Cette dernière a été estimée à 5,79 ± 0,58 mg.

Mesures : Les mesures effectuées, communes aux trois mésocosmes, ont été décrites dans le paragraphe II.1 précèdent. En raison d'un manque d'organismes, les mesures d'activité MXR aux 3 temps ainsi que les mesures d'osmolalité à J21 n'ont pas été effectuées. Les organismes prélevés pour les mesures de locomotion et de ventilation à J21 ont été utilisés pour l'analyse multibiomarqueurs plutôt que pour les mesures d'osmolalité.

Traitement statistiques : Pour les figures (68,70,73) et le tableau 20, des anovas à deux facteurs (contamination et temps) ont été effectuées et parfois suivies des tests post-hoc TukeyHSD. Quand les conditions d'application de l'anova (normalité des résidus de l'anova et homogénéité des variances) n'ont pas été vérifiés (Figures 71), une anova non paramétrique de Kruskall-Wallis a été effectuée suivie de tests post-hoc de comparaisons multiples. Une analyse discriminante linéaire (LDA) a été effectuée sur les valeurs des 13 biomarqueurs mesurés selon le protocole statistique décrit dans le chapitre 2.

II.3.1. Résultats

II.3.1.1. Concentration en titane dans les milieux d'expositions et les gammares

Comme nous l'avons déjà expliqué pour l'expérience « Etude des effets des $nTiO_2$ sur les gammares (*G. roeseli*) en fonction de leur hétéroagrégation dans deux types d'eau du Rhône naturellement chargées en matières organiques », les dosages par ICP-MS du titane demandent encore quelques mises au point qui sont actuellement en cours d'optimisation au CEREGE. Les résultats des concentrations réelles en titane dans les milieux d'exposition et dans les organismes ne seront donc pas présentés dans ce manuscrit de thèse.

II.3.1.2. Mortalité des organismes

Les résultats ont montré une absence d'effets significatifs de l'interaction temps d'exposition X type de contamination aux $nTiO_2$. Les conditions de contamination n'ont pas eu d'effet sur la mortalité des organismes (anova à deux facteurs, F=0,143, ddl=2 et p-value=0,868) alors que le temps d'exposition a entrainé des baisses significatives de la survie des gammares (Figure, 68 ; anova à deux facteurs, F=89,15, ddl=2 et p-value=<0,001). En moyenne à J7 le pourcentage de survie s'est élevé à 80 ± 5 %, puis une

diminution marquée a été observée à J14 présentant des pourcentages de 34 ± 17 %. Finalement, nous avons observé une survie très faible après 21 jours dans tous les milieux d'exposition. Cette survie anormalement faible représente une difficulté majeure pour interpréter les différents résultats.

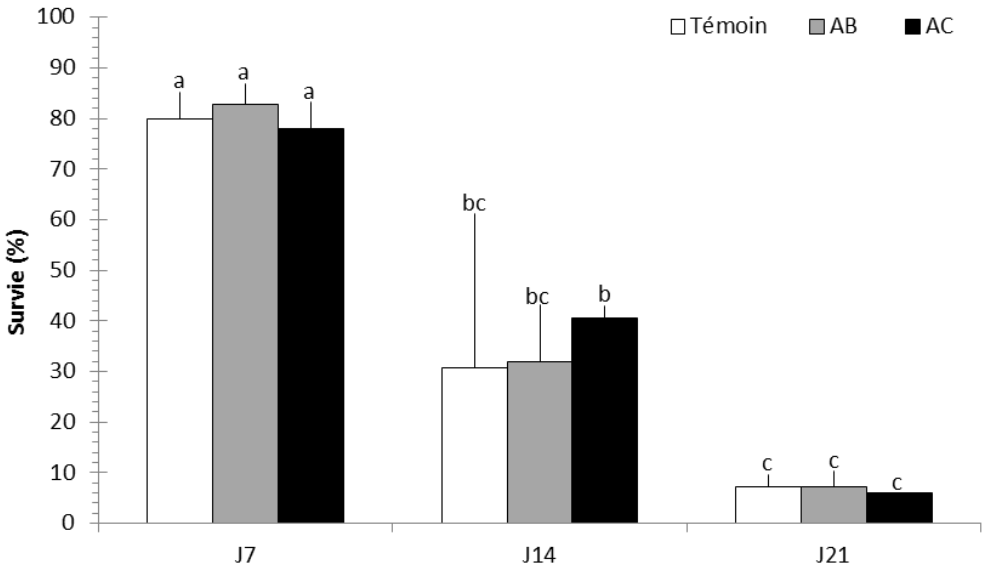


Figure 68 : Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et AC qui correspondent respectivement à des concentrations appliquées de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.3.1.3. Biomarqueurs cellulaires, approche multi-biomarqueurs et analyse discriminante

Les valeurs moyennes et écart-types mesurées pour les 13 biomarqueurs analysés sur un même pool de gammares sont présentés dans le tableau 19 et les résultats des tests statistiques dans le tableau 20. Aucune interaction d'effets due aux conditions de contamination en fonction du temps d'exposition n'a été observée.

Cependant, ces deux variables ont eu chacune des effets sur les concentrations en protéines dosées dans le broyat et dans la fraction cytosolique ainsi que sur les concentrations en triglycérides (Tableau 20). Pour les deux dosages protéiques, les tests TukeyHSD n'ont pas révélé de différences significatives entre les 3 types de contamination pour chaque temps. Par contre, toute condition de contamination confondue, à J14 et J21, les gammares ont présenté des concentrations significativement plus faibles qu'à J7. Les concentrations en triglycérides étaient quant à elles significativement plus élevées chez les gammares contaminés par la forme AC à J7 et J14 par rapport aux témoins et à la forme AB à J21 mais ces différences entre deux temps n'apporte pas d'élément conrêt.

L'Anova a révélé un effet du temps sur 6 autres biomarqueurs. Ainsi, une diminution significative, toutes conditions de contamination confondues, du cholestérol et de l'activité ETS a été observée entre les temps J7 et J14 ainsi qu'entre J7 et J21. Pour la LOOH, des diminutions été mesurées entre J7 et J21 puis entre J14 et J21. A l'inverse, des augmentations ont été observées pour la TAC et l'activité LDH entre J7 et les temps J14 et J21 ainsi que pour l'activité de la GST entre J7/J14 et J21.

<u>Tableau 19 :</u> Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux nTiO2 AB et AC qui correspondent respectivement à des concentrations en argent appliquées de 0,5, 0,8 et 1 mg.L^{-1}.

		J7	J14	J21
Protéine broyat (mg/gMF)	Témoin	20,9 ± 2,1 *(a)*	12,7 ± 4,8 *(b)*	14,8 ± 1,9 *(ab)*
	Anatase Bâtonnet	20,2 ± 3,1 *(ab)*	14,2 ± 0,7 *(ab)*	12,7 ± 1,5 *(b)*
	Anatase Cubique	22 ± 4,3 *(a)*	20 ± 1,7 *(ab)*	15,1 ± 2,0 *(ab)*
Protéine fraction cytosolique (mg/gMF)	Témoin	14,9 ± 1,7	9,4 ± 3,9	10,3 ± 2,1
	Anatase Bâtonnet	14,7 ± 1,9	10,3 ± 0,9	9,3 ± 1,4
	Anatase Cubique	16,1 ± 3,9	14,4 ± 0,9	12,3 ± 2,8
Cholestérol (mg/gMF)	Témoin	0,45 ± 0,03	0,32 ± 0,14	0,4 ± 0,03
	Anatase Bâtonnet	0,49 ± 0,08	0,34 ± 0,03	0,38 ± 0,08
	Anatase Cubique	0,45 ± 0,06	0,44 ± 0,08	0,4 ± 0,08
Triglycéride (mg/gMF)	Témoin	2,18 ± 0,94 *(ab)*	1,13 ± 0,26 *(ab)*	0,64 ± 0,13 *(a)*
	Anatase Bâtonnet	2,39 ± 1,44 *(ab)*	1,47 ± 0,80 *(ab)*	0,82 ± 0,20 *(ac)*
	Anatase Cubique	3,47 ± 0,83 *(b)*	3,16 ± 1,42 *(bc)*	1,82 ± 0,40 *(ab)*
ETS (µmolO2,gMF-1,h-1)	Témoin	25,4 ± 3,8	19,4 ± 5,6	22,2 ± 1,7
	Anatase Bâtonnet	28,6 ± 3,3	22,8 ± 2,3	20,0 ± 1,8
	Anatase Cubique	27,9 ± 5,2	25,1 ± 1,4	19,2 ± 3,6
LOOH (nmol/gprot)	Témoin	434 ± 34 *(ab)*	432 ± 42 *(ab)*	388 ± 34 *(ab)*
	Anatase Bâtonnet	511 ± 42 *(ab)*	522 ± 121 *(b)*	338 ± 16 *(a)*
	Anatase Cubique	470 ± 27 *(ab)*	454 ± 74 *(ab)*	355 ± 83 *(ab)*
ACP (µmol/gprot/h)	Témoin	14,2 ± 1,9	15,2 ± 3,5	15 ± 1,1
	Anatase Bâtonnet	13,9 ± 2,9	15,6 ±2,8	16 ± 2,0
	Anatase Cubique	12,4 ± 2,0	12,9 ± 1,3	13,7 ± 1,6
TAC (µmolTeq/gprot/min)	Témoin	8,6 ± 12,3	23,1 ± 26,6	21,7 ± 15,5
	Anatase Bâtonnet	8,5 ± 22,9	45,6 ± 14,3	39,6 ± 25,4
	Anatase Cubique	4 ± 30,4	28,9 ± 10,7	36,2 ± 11,2
LDH (µmolNADH/gprot/h)	Témoin	2997 ± 904	6587 ± 3398	5319 ± 2022
	Anatase Bâtonnet	2695 ± 1063	5081 ± 402	6067 ± 989
	Anatase Cubique	3057 ± 698	3669 ± 451	3886 ± 1616
Gpx (µmolNADPH/gprot/min)	Témoin	397 ± 93	525 ± 79	339 ± 83
	Anatase Bâtonnet	348 ± 63	545 ± 182	487 ± 74
	Anatase Cubique	440 ± 179	342 ± 40	295 ± 96
GST (µmolCDNB/g prot/min)	Témoin	60,2 ± 2,8 *(a)*	76,7 ± 17,3 *(a)*	105,2 ± 16,9 *(ab)*
	Anatase Bâtonnet	64 ± 6,2 *(a)*	88,1 ± 26,6 *(ab)*	137 ± 39,7 *(b)*
	Anatase Cubique	73,8 ± 26,5 *(a)*	74,5 ± 11,5 *(ab)*	91,8 ± 7,7 *(ab)*
CSP (µmolpNA/g prot/h)	Témoin	0,96 ± 0,12	0,25 ± 0,13	0,51 ± 0,18
	Anatase Bâtonnet	0,56 ± 0,20	0,59 ± 0,40	0,58 ± 0,78
	Anatase Cubique	0,89 ± 0,18	1,08 ± 0,56	0,65 ± 0,35
Catalase H_2O_2 consommé (mmole/gprot/min)	Témoin	21,2 ± 8,4	15,3 ± 3,9	23,3 ± 4,7
	Anatase Bâtonnet	16,3 ± 9,2	18,0 ± 16,2	21,7 ± 9,6
	Anatase Cubique	26,8 ± 19,5	21,9 ± 10,1	31,8 ± 23,9

Tableau 20 : Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives.

	Contamination (ddl=2)		temps (ddl=2)		Interaction (ddl=4)	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
[Protéine]broyat	3,83	**0,041***	15,2	**<0,001*****	1,47	0,251
[Protéine]f. cytosolique	4	**0,036***	9,5	**0,001****	0,58	0,675
[Triglycéride]	7,98	**0,003****	7,72	**0,003****	0,25	0,905
[Cholestérol]	0,67	0,523	3,92	**0,038***	0,94	0,463
ETS	0,63	0,541	8,99	**0,001****	1,32	0,298
LOOH	1,01	0,382	9,69	**0,001****	1,22	0,334
ACP	2,4	0,119	1,01	0,383	0,09	0,982
TAC	1,02	0,3801	4,81	**0,021***	0,35	0,835
LDH	2,04	0,159	5,85	**0,011***	1,06	0,405
Gpx	1,96	0,169	1,96	0,169	2,14	0,117
GST	1,71	0,21	11,26	**<0,001*****	1,34	0,295
CSP	1,62	0,227	0,75	0,486	1,3	0,307
Catalase	0,83	0,451	0,52	0,604	0,07	0,989

Les résultats de la LDA permettant l'étude de la batterie de biomarqueurs dans son ensemble sont présentés dans le tableau 21. Dans cette LDA, un ensemble de 7 biomarqueurs a été utilisé pour discriminer les 9 conditions d'exposition. Le modèle construit est significatif (Lambda Wilks : p-value = 0,02) et est associé à un taux d'erreur égal à 0,15. L'activité de la GST est le seul biomarqueur significatif du modèle.

Tableau 21 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conserver pour construire la LDA.

Pouvoir discriminant	Axe 1 : 0,46		Axe 2 : 0,36		Significativité des variables
Coefficient	Brut	Standardisé	Brut	Standardisé	p-value
GST	-0,042	-1,198	0,031	0,872	<0,01
LDH	0,000	0,744	0,000	1,201	0,05
Gpx	-0,013	-1,593	-0,013	-1,602	0,09
TAC	0,020	0,447	0,031	0,672	0,183
CSP	1,257	0,508	-0,497	-0,201	0,285
ACP	-0,416	-0,924	-0,301	-0,67	0,535
Catalase	0,069	0,839	0,013	0,153	0,871

La représentation graphique de la LDA ainsi que 3 autres relatives aux 3 temps d'exposition sont présentées dans la figure 69. A J7, les points matérialisant les 3 conditions de contamination sont proches et leurs ellipses respectives se chevauchent. A J14, les ellipses correspondant aux mesures effectuées chez les organismes témoins et chez ceux exposés aux $nTiO_2$ AB s'entrecoupent et se chevauchent alors que celle représentant les organismes exposés aux $nTiO_2$ AC est bien isolée,

notamment le long de l'axe 1. Enfin, à J21, une dispersion sur l'axe 1 est observable, les ellipses des $nTiO_2$ AB (entre les repères -4 et -2) et témoin (entre les repères -1,5 et 1,3) ne se rencontrent pas alors que les ellipses témoins (entre les repères -1,5 et 1,3) et $nTiO_2$ AC (entre les repères 1 et 4) s'entrecoupent très partiellement.

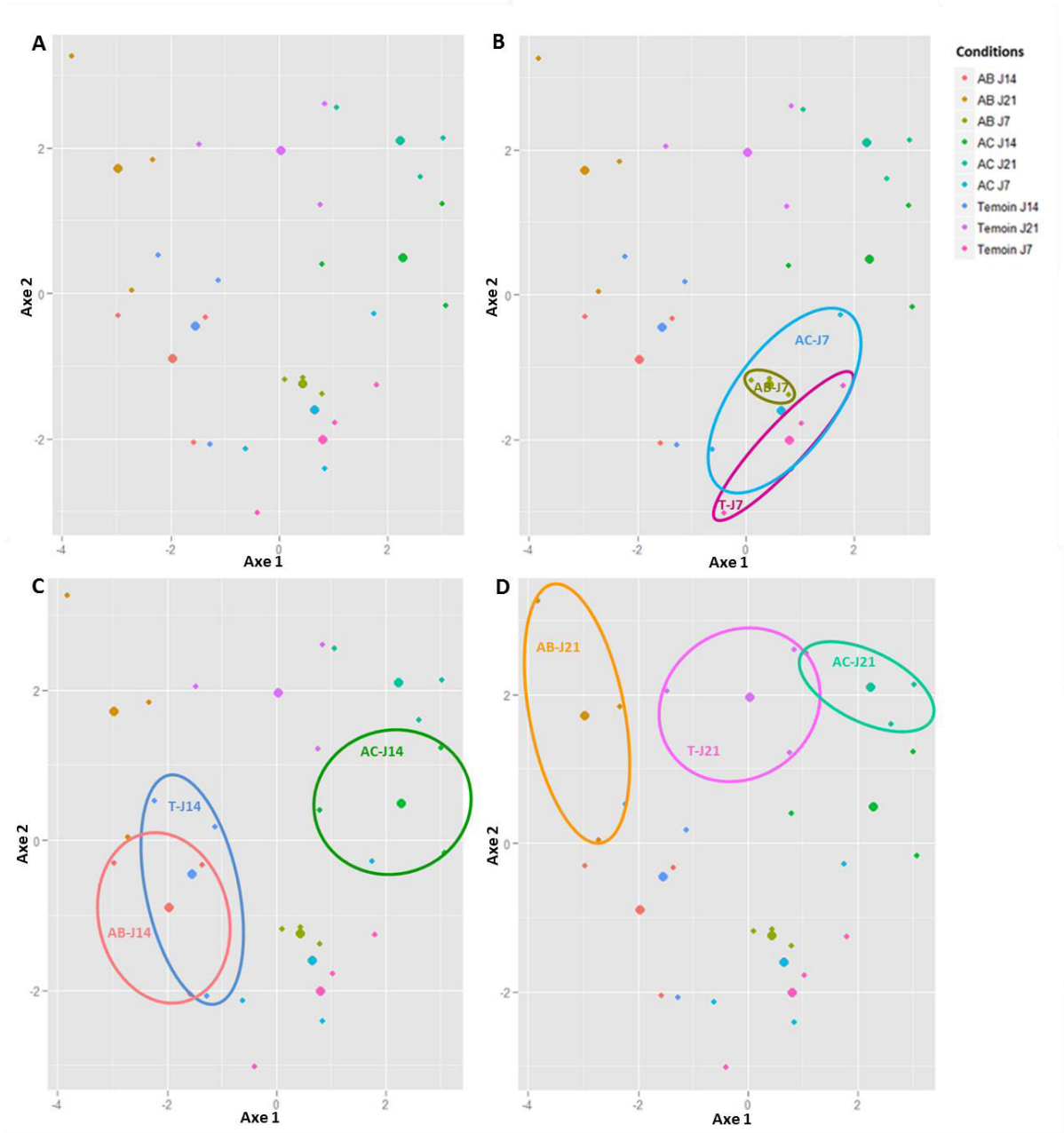


Figure 69 : A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition) sur les valeurs des 11 biomarqueurs et discriminée par 7 d'entre eux (n=3). B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, nTiO2 AB et nTiO2 AC à J7, J14 et J21.

II.3.1.4. Biomarqueur physiologique : l'osmolalité de l'hémolymphe

Seuls les organismes exposés durant 14 jours aux $nTiO_2$ AC, montrent une diminution significative de l'osmolalité (F=6,92, ddl=2 et p-value<0,01) par rapport aux témoins. Cependant, aucune différence significative de l'osmolalité n'a été observée entre les deux formes chez les gammares exposés durant 14 jours (Figure 70).

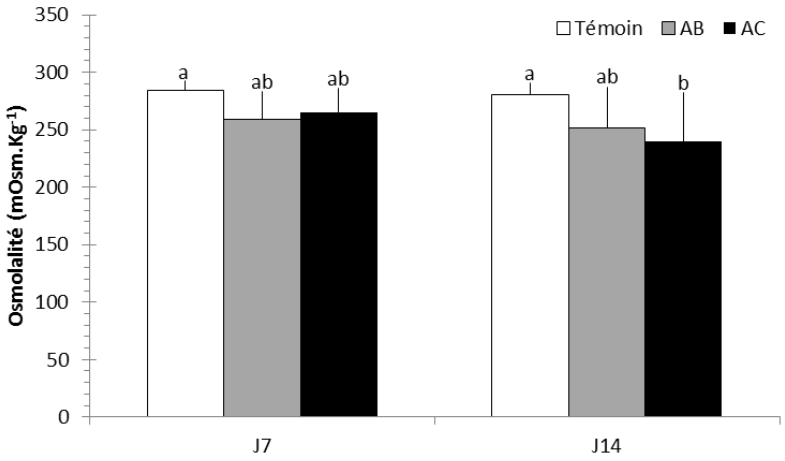


Figure 70 : Moyennes (+ écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées dans les gammares après 7 et 14 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et $nTiO_2$ AC qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquée de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.3.1.5. Les biomarqueurs de comportement

II.3.1.5.1. La ventilation

Aucune différence significative de la ventilation n'a été observée (Figure 71).

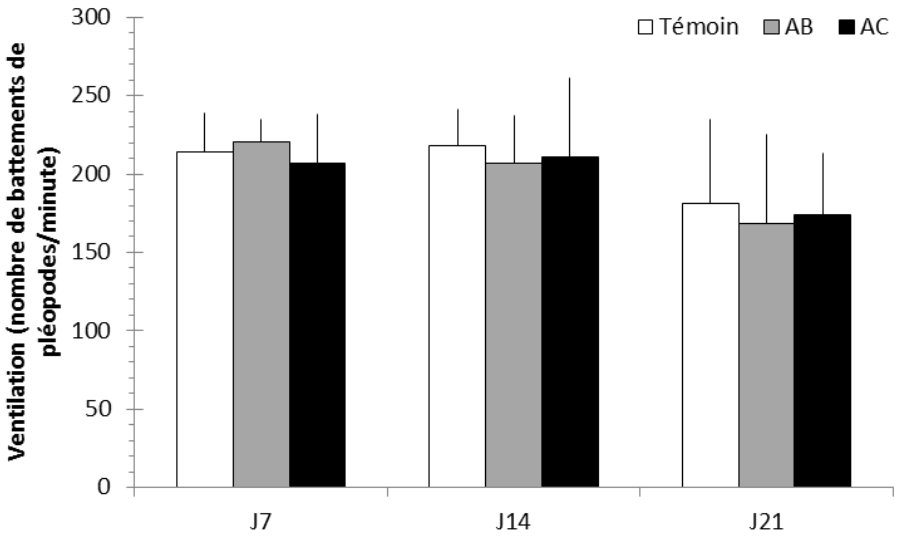


Figure 71 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux $nTiO_2$ AB et aux $nTiO_2$ AC qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquées de 0,5, 0,8 et 1 $mg.L^{-1}$. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.3.1.5.2. La locomotion

Concernant les mesures de locomotion (Figure 72), une interaction significative entre le temps d'exposition et le type de contamination a été observée (anova à deux facteurs, F=5,4, ddl=4 et p-value<0,001). Pour chaque type d'exposition, nous observons une diminution de la locomotion en fonction du temps. Chez les témoins cette diminution n'est significative qu'à J21. Par contre, chez les gammares exposés aux $nTiO_2$ AC, la locomotion est significativement plus faible dès J7 par rapport aux organismes témoins et le demeure à J14 et J21 alors que chez les gammares exposés $nTiO_2$ AB, la différence par rapport aux témoins n'est significative qu'à J14. On remarquera également qu'à J7 et J21, les gammares exposés à la forme AC se déplacent significativement moins que ceux exposés à la forme AB. Enfin, chez les gammares exposés à la forme AC, la diminution de la locomotion est significative à J14 et J21 par rapport aux temps précédents alors que chez les organismes exposés à la forme AB, la locomotion est significativement plus faible qu'entre J21 et J7.

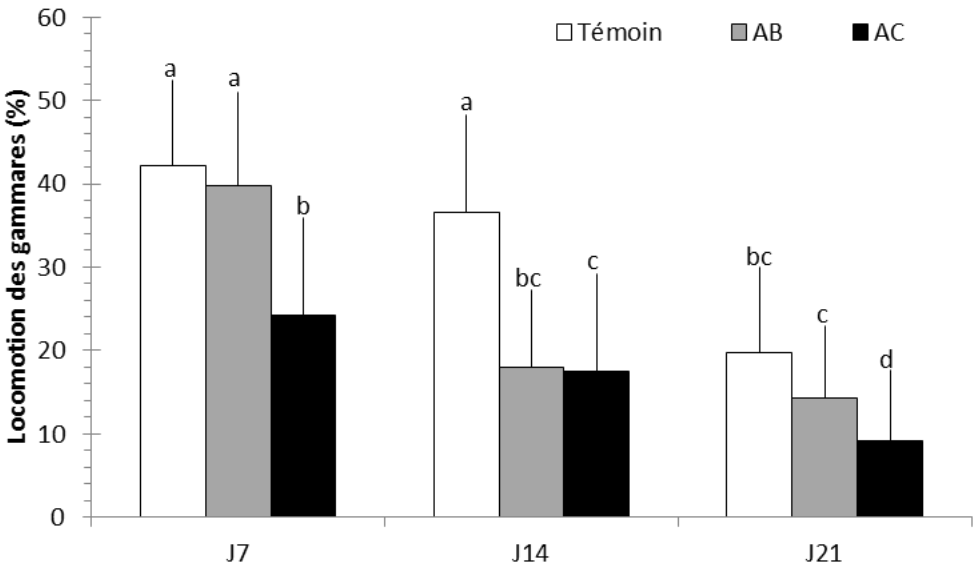


Figure 72 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion des gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux nTiO2 anatase bâtonnet (AB) et anatase cubique (AC) qui correspondent respectivement à des concentrations en titane appliquées de 0,5, 0,8 et 1 mg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.3.2. Discussion

II.3.2.1. Effets des dispositifs d'expérimentation et du temps d'exposition sur les gammares

Si l'on considère la mortalité anormalement élevée des organismes (66% à J14 et 93% à J21), il apparait difficile d'interpréter les résultats des différents biomarqueurs mesurés chez les survivants après ces temps d'exposition. Les hypothèses déjà discutées précédemment (température d'exposition ou cannibalisme) sont des pistes pour expliquer cette mortalité anormale.

II.3.2.2. Effet des $nTiO_2$ sur les gammares

Compte tenu de la mortalité élevée, les effets observés à J14 et J21 sur les biomarqueurs étudiés seront interprétés avec précaution et le terme « tendance » a été préféré au terme « différence » dans la suite de l'argumentation.

L'analyse discriminante reposant sur les valeurs issues du pool de biomarqueurs d'activité antioxydants, antitoxiques ou de réserves énergétiques mesurés au niveau cellulaire, n'a montré aucun effet de la forme des $nTiO_2$ à J7 puisque que les réponses sont similaires à celles des témoins. Pour les autres temps et même si les interprétations sont incertaines, les résultats observés à J14 et J21 pourrait indiquer des effets différents dus à la forme AC au temps J14, et à la forme AB au temps J21.

Au niveau physiologique et individuel, les effets induits par l'exposition aux nanoparticules de la forme AC semblent également plus marqués et plus précoces que la forme AB, notamment sur la locomotion des organismes. Nous pouvons supposer que l'ajout de la contamination à une situation de stress déjà existante, peut déclencher la mise en place d'autres mécanismes de détoxication, ce qui impliquerait un coût énergétique plus important, expliquant ainsi les baisses de locomotions, plus importantes chez les organismes exposés que celles observées chez les témoins.

De façon très générale, il semblerait que la forme AC induise plus d'effets sur les gammares que la forme AB. Peu d'études ont été effectuées avec ces organismes dans un contexte d'exposition aux $nTiO_2$ et les travaux néanmoins publiés se sont principalement intéressés à l'activité de consommation des feuilles. Ces études montrent par ailleurs des résultats contradictoires. Ainsi, Bundschuh et al. (2011) ont observé une baisse de la consommation de *G. fossarum* dès 0,2 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ à 80% anatase de 97 ± 2 nm, alors que pour des conditions d'exposition similaires ($nTiO_2$ 100 nm), Seitz et al. (2014) n'ont observé aucun effet sur la consommation des gammares.

Au niveau comportemental, des expériences sur *Daphnia magna* réalisées par Noss et al. (2013) ont rapporté une baisse significative de l'activité de nage des daphnies exposées durant 96h à des $nTiO_2$ de 61 nm pour des concentrations de 5 et 20 $mg.L^{-1}$. Au contraire, Lovern et al. (2007) n'ont observé aucun changement comportemental des daphnies exposées à des concentrations de 2 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ de 30 nm pendant seulement 60 min. Des temps d'exposition longs associés à une plus faible concentration seraient donc plutôt favorables à une baisse de locomotion comme cela a été observé dans notre étude, après 7 jours, chez les organismes exposés aux $nTiO_2$ AC.

Différents travaux ont montré que les $nTiO_2$ pouvaient s'agréger et sédimenter dans les milieux d'exposition (Adams et al., 2006; Federici et al., 2007; Wiench et al., 2009; Zhu et al., 2010). Cette agrégation des $nTiO_2$ peut considérablement diminuer la biodisponibilité des nanoparticules pour les organismes (Keller et al., 2010). Ce phénomène d'agrégation pourrait donc expliquer l'effet plus marqué chez *G. roeseli* après une exposition aux $nTiO_2$ AC. En effet, les résultats des cinétiques d'agrégation effectuées dans l'eau de Volvic et présentés en annexe 7 dans la figure n montrent que la forme AC est la plus stable dans l'eau et s'agrège moins rapidement que la forme AB après 14 minutes de cinétique. Ces mesures tendent à montrer que la forme AC serait plus bioaccessible/biodisponible dans les milieux d'exposition, entrainant ainsi plus d'effets sur les gammares.

Conclusion

Malgré une forte mortalité associée aux conditions d'exposition, les résultats obtenus sur les gammares survivants semblent indiquer que la forme anatase cubique engendrerait plus d'effets sur les gammares que la forme anatase bâtonnet, notamment au niveau de la locomotion. Pour valider les hypothèses apportées dans cette étude, et parce que la littérature est encore très peu fournie sur les effets des $nTiO_2$ sur les gammares, d'autres expérimentations, peut-être réalisées en conditions plus contrôlées pourraient être menées. Compte tenu des résultats déjà obtenus sur le gammare en termes de consommation des feuilles, ces études devraient également s'orienter vers des approches fonctionnelles afin d'évaluer si des relargages directs dans les cours d'eau, notamment via les crèmes solaires, seraient susceptibles d'entrainer des conséquences plus importantes sur l'équilibre des écosystèmes aquatiques d'eau douce.

II.4. Effets de deux types de NTC (avec ou sans matière organique) sur les gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli* – Expérience 7

Contexte

Très peu d'études se sont pour le moment intéressées aux nanotubes de carbone (NTC) qui sont moins sujettes à un rejet dans les écosystèmes d'eau douce puisqu'elles sont le plus souvent incorporées dans des produits solides plus enclins à être entreposés dans des décharges. Des modélisations ont évalué des PEC dans les eaux de surface inférieures au $ng.L^{-1}$ (Gottschalk et al., 2009; Sun et al., 2014).

Dans l'eau, les NTC se dispersent difficilement, mais leur enrobage naturel par la matière organique présente peut recouvrir leur surface hydrophobe et ainsi favoriser leur dispersion et leur stabilité dans la colonne d'eau avant sédimentation et donc potentiellement augmenter leur toxicité pour les organismes (Edgington et al., 2010; Jackson et al., 2013; Kennedy et al., 2008).

Dans ce contexte, nous avons étudié un type de NTC en considérant 2 conditions de dispersion différentes : l'eau déionisée d'une part et l'eau déionisée additionnée de matière organique d'autre part.

Le protocole d'expérimentation, défini par le programme MESONNET, a été identique à ceux établis précédemment pour les expériences en mésocosmes, et une approche multibiomarqueur des effets biologiques a été mise en place via l'étude de biomarqueurs cellulaires et individuels.

Mots clés : nanotube de carbone – matière organique - *G. roeseli* – multibiomarqueur – mésocosme

Rappels du plan expérimental

Dispositif expérimental : Des NTC biparois (DWNT, référence 240124) ont été synthétisées par un des laboratoires partenaires (Centre Inter universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, Toulouse). Deux types ont été testés, des DWNT dispersés dans de l'eau déionisée sans additif (NTC), et des DWNT dispersés dans de l'eau déionisée cette fois-ci additionnée à de la matière organique SR-NOM (matière organique naturelle de la rivière Suwannee, référence 2R101N) comme dispersant naturel (NTC+MO).

Les 10 injections successives de ces deux types de NTC ont permis une exposition à une concentration finale voulue de 1 $mg.L^{-1}$ à l'issue du dernier temps d'injection. Les trois temps de prélèvement des organismes J7, J14 et J21 correspondaient alors respectivement à des concentrations appliquées en NTC de 0,4, 0,7 et 1 $mg.L^{-1}$.

Environ 2000 à 2500 *G. roeseli* ont été prélevés dans la Nied en fin Juin 2014 puis soumis à 6 jours d'acclimatation dans de l'eau minérale Volvic (supplémentée) en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Le jour de l'implantation des organismes, 33 pools de 50 gammares de sexe indifférencié et de taille homogène ont été triés puis 27 de ces pools ont été répartis dans les 27 cages de feuilles conditionnées avant d'être implantés dans leurs milieux d'expositions. Sur les 6 pools restants, 3 ont servi de T0 et les 3 autres ont permis la mesure de la masse sèche moyenne d'un gammare sur la base de 15 lots de 10 gammares pesés. Cette dernière a été estimée à 4,15 ± 0,59 mg.

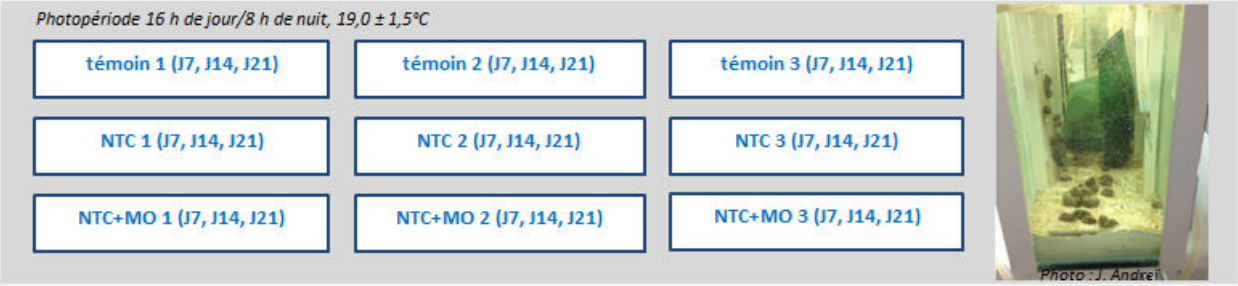


Figure 73 : Plan expérimental simplifié de l'expérience 7 (A, Cf.Chapitre 2, tableau 9)

Mesures : Les mesures effectuées, communes aux trois mésocosmes, ont été décrites dans le paragraphe II.1 précédent. Par manque d'organismes, les mesures d'activité MXR aux 3 temps ainsi que les mesures des autres biomarqueurs à J21 n'ont pas été effectuées.

Traitement statistiques : Pour les figures (74,76-78) et le tableau 23, des anovas à deux facteurs (contamination et temps) suivies de tests post-hoc TukeyHSD ont été réalisées.

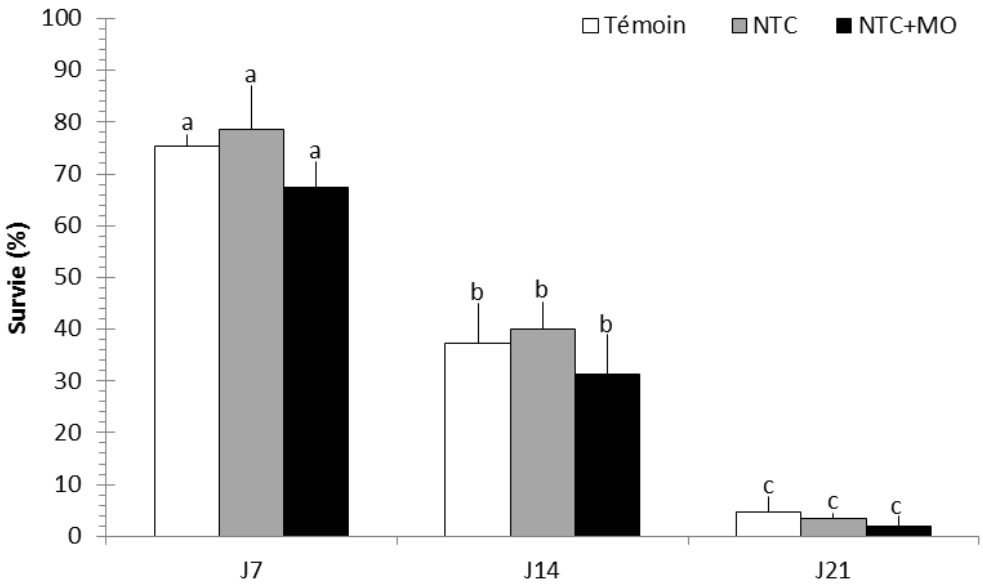
II.4.1. Résultats

II.4.1.1. Concentrations en NTC dans les milieux d'expositions et les gammares

Des dosages de carbone dans des organismes sont compliqués à mettre en place et nécessitent l'utilisation d'un microscope hyperspectral par exemple. Des échantillons d'eau et d'organismes ont été prélevés dans le but de pouvoir étudier la contamination aux NTC lorsque la technique nécessaire sera disponible. Les résultats ne seront donc pas présentés dans ce manuscrit de thèse.

II.4.1.2. Mortalité des organismes

Au cours de cette expérimentation, nous avons également observé une mortalité forte et croissante dans le temps et ce, dans tous les mésocosmes y compris les témoins (Figure 74). Ce constat pose une nouvelle fois clairement le problème de conditions d'exposition certainement inadaptées pour les gammares.



<u>Figure 74 :</u> Moyennes (+ écart-types, n=3) de la survie des gammares après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations appliquées de 0,4, 0,7 et 1 mg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.4.1.3. Biomarqueurs cellulaires, approche multi-biomarqueurs et analyse discriminante

Les valeurs moyennes et écart-types mesurés pour les 13 biomarqueurs analysés sur un même pool de gammares sont présentés dans le tableau 22 et les significativités des tests statistiques anovas à 2

facteurs dans le tableau 23. Aucun effet relatif aux conditions de contamination seules ou en interaction avec les temps d'exposition n'a été observé. Par contre un effet temps d'exposition a été observé pour 4 biomarqueurs. Les concentrations en protéines du broyat, et les LOOH ont significativement diminué entre J7 et J14 alors que les activités de la GST et de la catalase ont augmenté, et ce chez les gammares exposés comme chez les témoins.

Tableau 22 : Moyennes (± écart-types) des différentes valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur G. roeseli après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux NTC qui correspondent respectivement à des concentration en argent appliquée 0,4, 0,7 et 1 mg.L^{-1}.

		J7	J14
Protéine broyat (mg/gMF)	Témoin	18,9 ± 2,5	18,1 ± 2,2
	NTC	20,6 ± 1,8	18,3 ± 0,7
	NTC+MO	21,7 ± 3,1	17,2 ± 3,4
Protéine fraction cytosolique (mg/gMF)	Témoin	17,9 ± 2,6	17,9 ± 3,9
	NTC	17,5 ± 1,4	14,9 ± 1,4
	NTC+MO	20,6 ± 1,5	17,1 ± 3,3
Cholestérol (mg/gMF)	Témoin	0,39 ± 0,06	0,42 ± 0,07
	NTC	0,44 ± 0,03	0,33 ± 0,08
	NTC+MO	0,53 ± 0,20	0,43 ± 0,08
Triglycéride (mg/gMF)	Témoin	3,00 ± 0,38	2,35 ± 0,67
	NTC	3,19 ± 0,85	2,13 ± 0,37
	NTC+MO	3,20 ± 0,51	3,41 ± 1,40
ETS (µmolO2,gMF-1,h-1)	Témoin	26,9 ± 1,0	27,2 ± 1,6
	NTC	28,2 ± 0,9	27 ± 0,8
	NTC+MO	29,1 ± 1,0	26,9 ± 3,5
LOOH (nmol/gprot)	Témoin	509 ± 27	467 ± 47
	NTC	540 ± 57	477 ± 28
	NTC+MO	538 ± 65	507 ± 14
ACP (µmol/gprot/h)	Témoin	13,4 ± 1,6	11,8 ± 0,4
	NTC	12,0 ± 0,5	13,6 ± 4,7
	NTC+MO	9,8 ± 2,0	13,1 ± 4,7
TAC (µmolTeq/gprot/min)	Témoin	24,2 ± 5,6	23,4 ± 7,8
	NTC	27,0 ± 14,1	37,2 ± 13,1
	NTC+MO	19,9 ± 10,5	25,4 ± 13,8
LDH (µmolNADH/gprot/h)	Témoin	289 ± 86	1914 ± 1474
	NTC	290 ± 25	595 ± 371
	NTC+MO	1076 ± 1450	1550 ± 1533
Gpx (µmolNADPH/gprot/min)	Témoin	434 ± 103	405 ± 109
	NTC	408 ± 43	459 ± 33
	NTC+MO	332 ± 114	437 ± 75
GST (µmolCDNB/g prot/min)	Témoin	45,5 ± 9,8	60,3 ± 7,0
	NTC	51,7 ± 7,6	62,3 ± 5,3
	NTC+MO	50,8 ± 15,6	58,8 ± 11,9
CSP (µmolpNA/g prot/h)	Témoin	1,16 ± 0,39	1,11 ± 0,28
	NTC	0,92 ± 0,47	0,98 ± 0,45
	NTC+MO	0,94 ± 0,42	1,2 ± 0,57
Catalase H_2O_2 consommé (mmole/gprot/min)	Témoin	15,4 ± 7,5	33,6 ± 13,9
	NTC	13,7 ± 9,1	19,5 ± 6,4
	NTC+MO	12,9 ± 8,1	33,3 ± 20,7

Tableau 23 : *Résultats statistiques des Analyses de variance (Anova) à 2 facteurs effectuées pour les différentes mesures. Ddl = degré de liberté, les valeurs en gras sont significatives.*

	Contamination (ddl=2)		temps (ddl=1)		Interaction (ddl=4)	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
[Protéine]br	0,29	0,751	4,94	**0,046***	0,79	0,474
[Protéine]f.	1,67	0,228	2,87	0,116	0,78	0,48
[Triglycéride	1,33	0,299	1,82	0,202	1,03	0,385
[Cholestérol	1,33	0,299	1,72	0,213	0,91	0,427
ETS	0,43	0,658	1,49	0,245	0,78	0,477
LOOH	0,93	0,418	4,87	**0,047***	0,2	0,815
ACP	0,39	0,682	0,61	0,45	1,09	0,364
TAC	1,26	0,318	0,86	0,371	0,35	0,707
LDH	1,09	0,366	2,55	0,136	0,68	0,523
Gpx	0,52	0,605	1,08	0,318	0,92	0,421
GST	0,24	0,785	5,42	**0,038***	0,17	0,845
CSP	0,28	0,761	0,19	0,667	0,18	0,832
Catalase	0,73	0,498	6,83	**0,022***	0,63	0,545

La LDA effectuée sur le jeu de données obtenu à partir des 13 biomarqueurs mesurés n'a pas permis de discriminer les conditions de contamination (modèle non significatif ; Lambda Wilks : p-value = 0,42). Les résultats et la représentation graphique sont présentés dans le tableau 24 et la figure 75. Les larges ellipses correspondant aux trois conditions de contamination (facteur temps négligé car non significatif ici) se superposent.

Tableau 24 : Résultats de la LDA regroupant les pouvoirs discriminants des 2 axes, les valeurs des coefficients bruts et standardisés ainsi que la significativité des 6 biomarqueurs conservés pour construire la LDA.

Pouvoir discriminant	Axe 1 : 0,68		Axe 2 : 0,32		Significativité des variables
Coefficient	Brut	Standardisé	Brut	Standardisé	p-value
$[protéine]_{broyat}$	-0,198	-0,541	-0,798	-2,174	0,249
TAC	-0,040	-0,443	0,008	0,086	0,278
LOOH	-0,016	-0,75	-0,032	-1,499	0,462
Catalase	0,116	1,573	-0,012	-0,157	0,588
Gpx	-0,01	-0,719	-0,021	-1,723	0,601
CSP	0,856	0,331	1,117	0,432	0,721
GST	-0,197	-2,068	-0,109	-1,148	0,814

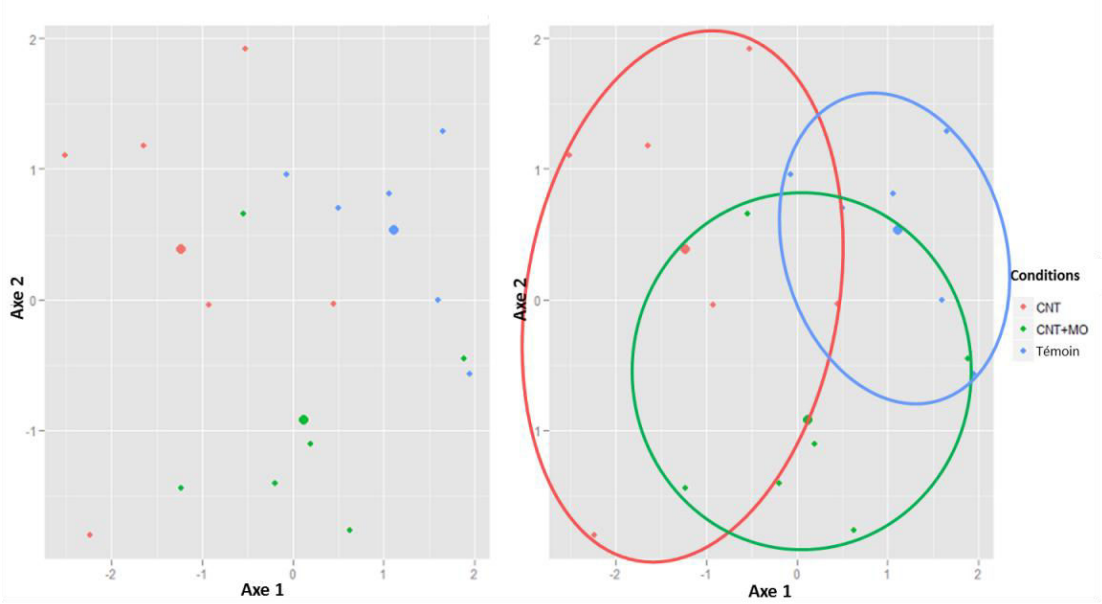


Figure 75 : A) Analyse discriminante linéaire (LDA) effectuée pour 9 conditions (3 contaminations pour 3 temps d'exposition) sur les valeurs de 7 des 13 biomarqeurs (n=3). B, C et D) Représentation elliptique des conditions témoin, NTC et NTC+MO à J7, J14 et J21.

II.4.1.4. Biomarqueur physiologique : l'osmolalité de l'hémolymphe

La figure n montre que pour les 2 temps d'exposition, aucun effet des NTC n'a été observé sur les valeurs de l'osmolalité mesurées dans l'hémolymphe des gammares.

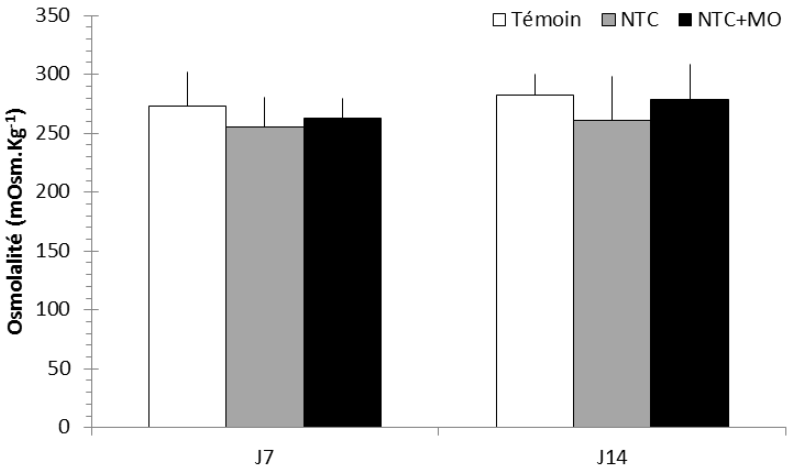


Figure 76 : Moyennes (+écart-types) des valeurs d'osmolalité de l'hémolymphe mesurées chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC et NTC+MO appliquées de 0,4, 0,7 et 1 mg.L^{-1}.

II.4.1.5. Les biomarqueurs de comportement

II.4.1.5.1. La ventilation

La mesure de l'activité ventilatoire n'a pas révélé de différences significatives (Figure 77).

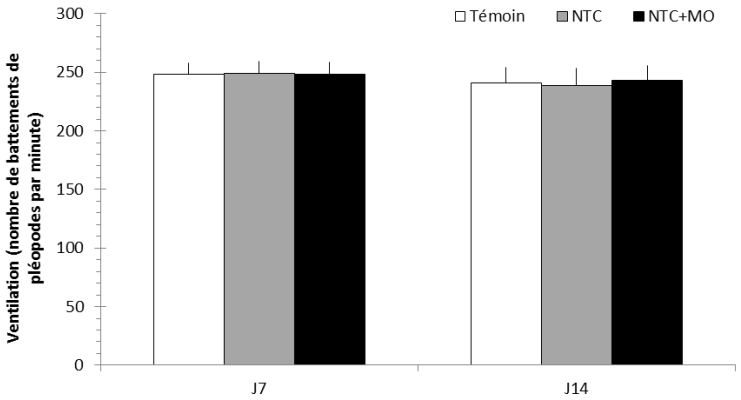


Figure 77 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de ventilation chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC appliquées de 0,4, 0,7 et 1 mg.L^{-1}.

II.4.1.5.2. La locomotion

Après 7 jours d'exposition aux NTC et aux NTC+MO, la locomotion des gammares a significativement été diminuée par rapport aux témoins qui présentaient des pourcentages de locomotion de 38 ± 13 % (Figure 78). Par contre après 14 jours les différences n'étaient plus significatives.

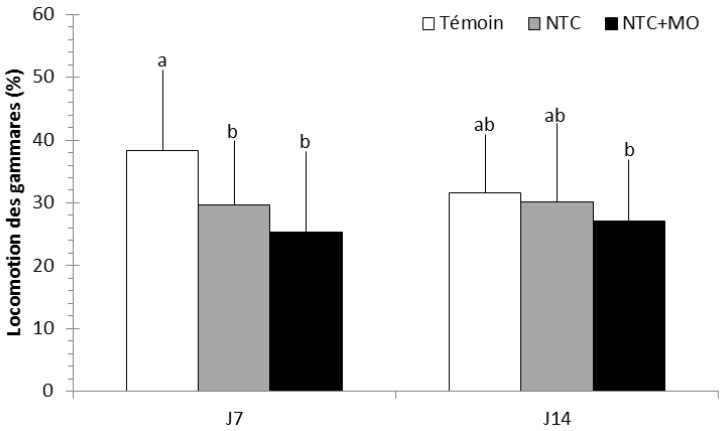


Figure 78 : Moyennes (+ écart-types) des mesures de locomotion chez les gammares après 7,14 et 21 jours d'exposition aux NTC et NTC+MO qui correspondent respectivement à des concentrations en NTC appliquées de 0,4 et 0,7 mg.L^{-1}. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents.

II.4.2. Discussion - Conclusion

Les temps d'exposition, indépendamment des facteurs de contamination, ont entraîné une mortalité anormalement élevée aux temps J14 et J21 avec des pourcentages de mortalité moyens s'élevant à 64 % à J14 et à 97 % à J21. Encore une fois, il apparait extrêmement délicat d'émettre toute interprétation fiable. Les mêmes hypothèses que celles évoquées précédemment peuvent être discutées, comme celles des températures d'exposition élevées, de la perte d'habitat et du cannibalisme, auxquelles peuvent s'ajouter le prélèvement d'organismes plus faibles en été lors de la reproduction.

Finalement, seule l'activité de locomotion à J7 a été affectée chez les organismes soumis aux deux types de NTC par rapport au témoin et la réduction observée a été suivie d'une récupération à J14.
Un nombre important d'études rapporte la présence de NTC dans le tractus digestif des organismes sans passage à travers les barrières biologiques (Jackson et al., 2013; Mouchet et al., 2010, 2008; Mwangi et al., 2012; Petersen et al., 2011, 2009). Concernant les amphipodes, Mwangi et al. (2012) ont même émis l'hypothèse que les NTC provoqueraient un désordre digestif chez *Hyalella azteca* (amphipode d'eau douce). A notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée aux biomarqueurs cellulaires de réponses antioxydantes ou antitoxiques ou aux effets sur le comportement des organismes exposés aux différentes sortes de NTC.

Il conviendrait certainement de concevoir de nouvelles expérimentations notamment en microcosmes qui incluraient une contamination par voie trophique et intégreraient des mesures de réponses fonctionnelles.

BILAN

Au terme de ces expérimentations, plusieurs grandes conclusions peuvent être proposées :

- L'utilisation de systèmes plus complexes incluant des sédiments, un courant d'eau et d'autres espèces n'a pas permis d'évaluer de façon fiable les effets des nAg, $nTiO_2$ et NTC sur *G. roeseli*.
- Les dispositifs d'expérimentation en mésocosmes ont fortement affecté les gammares et ont entrainé y compris chez les témoins des taux de mortalités corrélés au temps passé dans les mésocosmes.
- Les résultats observés sont à interpréter avec prudence puisqu'ils ont été mesurés sur des individus plus résistants à la contrainte expérimentale.
- Une approche multibiomarqueur menée au niveau cellulaire ne semble pas être des plus adaptées pour évaluer les effets biologiques des nanoparticules sur les gammares.
- Des effets ont pu être observés au niveau physiologique et sur le comportement des gammares en fonction des types de matériaux nanoparticulaires testés.
- Seule la réduction de l'activité de locomotion des gammares est un effet commun aux 3 matériaux testés.
- Cette réduction pourrait indiquer une stratégie de réallocation énergétique mise en œuvre par les organismes pour mettre en place des mécanismes de défense et de détoxication.
- Tout en considérant les fortes mortalités observées, les résultats obtenus pourraient suggérer des effets dépendants de la forme des nanoparticules. Les nAg de formes sphériques et les $nTiO_2$ de forme cubique pourraient engendrer plus d'effets sur les gammares.

Les forts taux de mortalité ont engendré à la fois une impossibilité d'acquérir certaines données et l'obtention de réponses peut-être biaisées chez les organismes ayant survécu. Dans ces conditions, il ne nous est pas permis d'émettre des conclusions fiables quant aux effets des nanoparticules sur les gammares. L'expérimentation en mésocosme développée dans le cadre de ce travail ne semble pas être la mieux adaptée pour des études menées sur des gammares. Des expériences réalisées en conditions mieux contrôlées pourraient notamment s'orienter vers des approches plus fonctionnelles.

Discussion générale et perspectives

L'objectif général de ce travail de thèse a consisté à évaluer les effets des nanoparticules sur des Crustacés d'eau douce Gammaridae en s'intéressant à plusieurs niveaux d'organisation biologique, du niveau (sub)individuel au niveau fonctionnel. La réflexion associée a été la compréhension des mécanismes biologiques qui permettent de faire le lien entre des phénomènes observés au niveau individuel et ceux observés à des niveaux supérieurs. Cette démarche a donc permis de révéler des effets « purement » écotoxicologiques via l'étude de biomarqueurs cellulaires et des effets plus « écologiques » indirects grâce à la mesure des processus fonctionnels.

A la lumière des résultats obtenus et présentés dans ce manuscrit, trois grands axes de discussion ressortent. Le premier permet notamment de discuter de l'intérêt de réaliser des études qui se rapprochent de conditions environnementalement réalistes en termes d'exposition (faibles concentrations, organismes nourris) et à plusieurs niveaux d'étude.
Dans un second temps, les effets induits par la taille, la forme et la composition des nanoparticules sont discutés.
Enfin, une troisième partie est argumentée autour des limites techniques auxquelles les études de nano-écotoxicité font face ainsi que les perspectives qu'ouvrent nos résultats.

I. Vers une approche environnementalement réaliste

I.1. La mise en place de conditions réalistes en microcosme

Les études d'écotoxicologie portant sur les nanoparticules sont en grande majorité basées sur des tests de toxicité aigüe qui utilisent des concentrations d'exposition bien plus élevées que celles prédites dans l'environnement par les modélisations mathématiques. Si cette approche permet d'apporter des informations importantes notamment sur les mécanismes de toxicité, elle permet difficilement de se projeter dans un contexte naturel, c'est dire évaluer les effets des concentrations actuelles ou prédites sur les organismes et les écosystèmes.

Une des premières démarches de ce travail de thèse a donc été de développer des conditions d'expérimentations les plus réalistes possibles en termes d'exposition en conditions environnementales. Ce type d'approche se heurte à de nombreuses limites techniques qu'il faut prendre en compte afin de

construire un raisonnement précis permettant d'émettre des hypothèses cohérentes. Dans l'étude des nanoparticules, ce type de démarche demeure peu développé.

Dans les études réalisées en microcosmes et concernant l'exposition de *Gammarus sp.* aux nAg, la concentration minimale d'exposition a été fixée à 0,5 $\mu g.L^{-1}$, c'est à dire proche de la limite de détection des appareils de dosage. Même si cette concentration demeure supérieure aux concentrations environnnementalement prédictibles évaluées par les modèles mathématiques (Gottschalk et al., 2009 ; Sun et al., 2014), elle fait partie des concentrations les plus basses qui ont été jusqu'à présent testées pour les nAg. L'utilisation d'une eau naturelle prélevée en rivière de référence et l'ajout d'une litière de feuilles conditionnées *in situ* par des microorganismes, sont deux paramètres qui permettent de s'approcher un peu plus de conditions d'exposition réalistes. Cependant, ce genre d'approche implique de ne pas pouvoir totalement maîtriser l'évolution de la contamination. Ce postulat est inhérent à l'étude des nanoparticules puisqu'elles peuvent subir de nombreuses transformations et dégradations dans leur milieu d'exposition, tout au long de leur cycle de vie (Lowry et al., 2012; Nowack et al., 2012). Les paramètres physicochimiques des milieux ont une grande influence sur le devenir des nanoparticules (Gao et al., 2009) et l'utilisation d'une eau de rivière se confronte à de nombreux verrous de caractérisation. En effet, classiquement, des mesures du diamètre hydrodynamique et du potentiel zeta des nanoparticules permettent d'évaluer leur comportement et leur état d'agrégation dans le milieu. Les techniques classiques de mesure (Nanosight, nanosizer ou DLS) ne sont pas forcément les plus appropriées au type de milieu complexe qu'est une eau de rivière puisque de nombreuses particules en suspension et colloïdes sont également pris en compte dans la mesure, entrainant ainsi des artéfacts. Concernant les nAg, une des transformations chimiques les plus courantes est la dissolution oxydative (Liu and Hurt, 2010; Lowry et al., 2012; Peretyazhko et al., 2014). Cette dernière entraine un relargage d'argent dissous qui est bien connu pour être toxique pour les invertébrés d'eau douce (Luoma, 2008; Ratte, 1999). De nombreuses études ont discuté de ces phénomènes de dissolution des nAg afin de comprendre si les effets observés sur les organismes dépendaient de l'argent sous sa forme nanoparticulaire et/ou sous sa forme dissoute. Ce phénomène de dissolution est très fortement dépendant des types de nanoparticules testées (taille, forme, enrobage) mais également des paramètres physicochimiques de l'eau (Behra et al., 2013). Seules des études au cas par cas peuvent alors évaluer la participation de ce phénomène aux effets toxiques observés. Quoi qu'il en soit, la présence d'Ag dissous résultant de la dissolution de nanoparticules dans le milieu, représente une conséquence indirecte du rejet de nanoparticules dans le milieu naturel. Dans ces travaux de thèse, les nanoparticules étudiées et les conditions physicochimiques des eaux utilisées n'ont pas favorisé ce processus de dissolution des nAg

puisque les plus forts taux mesurés ont été de 10 % (72h d'exposition à 5 µg.L^{-1} de nAg de 10 nm). Cependant, une fois de plus, ces résultats sont à prendre avec précaution puisque les organismes étudiés, les feuilles, les débris et les matières en suspension présents dans le milieu, ainsi que les parois des dispositifs peuvent être des supports de l'adsorption de l'argent dissous qui n'est alors plus mesurable dans la colonne d'eau. Finalement, le challenge expérimental de travailler à de très faibles concentrations associées à l'utilisation d'une eau de rivière s'est révélé très intéressant puisqu'il a permis d'observer dans ces conditions, des effets issus des nAg sur les gammares. La consommation en oxygène, la locomotion et la production de FPOM semblent être, pour les gammares, des biomarqueurs répondant à une contamination au nAg puisque des variations significatives ont été observées dès la plus faible concentration d'exposition.

Tout en gardant à l'esprit que le réalisme de ces expérimentations reste somme toute relatif, des interprétations et hypothèses sur les conséquences des nAg dans les écosystèmes d'eau douce ont tout de même pu être apportées. Elles font l'objet de la section I.4. de cette discussion.

I.2. La prise en compte de la variabilité inter et intraspécifique participe au réalisme environnemental

La grande majorité des études d'écotoxicité se base souvent sur l'étude d'une seule espèce. Or, pour avoir une vision plus large et générale des effets des nanoparticules sur les Crustacés Gammaridae d'eau douce, la prise en compte d'une variabilité inter et intra-spécifique est un facteur important. En effet, la qualité de l'eau fait partie des paramètres qui gouvernent les exigences des espèces qui présentent des sensibilités ou tolérances différentes face à une contamination. Dans le cas présent et puisqu'un des objectifs de cette thèse a été d'évaluer les effets des nanoparticules en se positionnant dans des conditions réalistes, une étude portée sur plusieurs espèces provenant de site de différentes qualités nous a semblé primordiale. De plus, comme plusieurs populations appartenant à une même espèce peuvent présenter des niveaux de sensibilité/tolérance différents, résultant de leur héritage génétique et de leur environnement local (Pain-Devin et al., 2014), une étude intra-spécifique s'avère également intéressante.

Un des postulats de départ était que différentes espèces appartenant au genre *Gammarus* pouvaient présenter des réponses et une sensibilité variable face à la contamination au nAg. Plusieurs études ont déjà rapporté des différences de sensibilité interspécifique chez les gammares laissant supposer la mise en place de stratégies de défense propre à l'espèce (Adam et al., 2010; Boets et al., 2012; Sroda and Cossu-Leguille, 2011). Une telle variabilité a également été observée dans notre étude puisque *G. roeseli* est apparu comme l'espèce la plus sensible comparée à *G. fossarum* et *G. pulex*. Ce résultat est en soi

assez surpenant puisque *G. roeseli* est pourtant l'espèce provenant du site de plus mauvaise qualité. Ce constat n'est donc pas en accord avec la théorie qui suggère que les organismes provenant des sites les plus contaminés sont plus tolérants à une contamination que ceux provenant de sites de bonne qualité (Naylor et al., 1990).

L'augmentation de l'activité du mécanisme antitoxique de transport MXR mesurée uniquement chez *G. pulex,* montre une variabilité interspécifique dans la mise en place des mécanismes de détoxication. Cependant il ne permet pas, à lui seul, de conclure sur la variabilité interspécifique observée. Un rapport entre la taille des organismes et leur sensibilité peut être suggéré puisque que *G. roeseli* est une espèce de plus grande taille que les 2 autres. Ce constat a déjà été observé par Boets et al. (2012) suite à une exposition de différentes espèces natives et invasives de gammares exposés à différentes concentrations de cadmium.

L'étude menée sur les trois populations de *G. roeseli* étudiées n'a pas permis de révéler l'existence d'une sensibilité plus aiguë d'une population par rapport à une autre, et aucun effet franc dû à l'exposition n'a été observé. Pour une même population de *G. roeseli*, les mesures de consommation des feuilles et de production de FPOM, mesurées dans les deux études de variabilité inter et intra-spécifiques, ont montré des résultats différents. Dans l'étude des populations, la présence de femelles et la saison de prélèvement des gammares sont deux hypothèses pouvant expliquer la plus grande tolérance des organismes face au stress. En effet, Sroda et Cossu-Leguille (2010) ont mis en évidence, chez *G. roeseli*, l'existence d'une plus forte capacité de défense oxidative naturelle des femelles par rapport aux mâles associée à une variabilité saisonnière.

I.3. Vers une complexification des dispositifs d'exposition : des microcosmes aux mésocosmes

Après l'observation d'effets des nAg sur les gammares dans des conditions d'exposition en microcosmes se rapprochant de conditions naturelles, et après avoir pris en compte l'existence d'une variabilité inter-espèces, une complexification des dispositifs d'exposition a été mise en œuvre. Comme le montre le schéma présenté dans la figure 79, les expériences effectuées dans ce travail de thèse se situent à des échelles de complexité écologique intermédiaire, entre des tests effectués en milieux contrôlés « peu réalistes », et des expérimentations dans des mésocosmes situés en extérieurs. L'augmentation d'une complexité écologique passe notamment par l'ajout d'autres espèces (tests plurispécifiques), mais également par l'utilisation de dispositifs plus grands, contenant de plus gros volumes d'eau et en présence de sédiments (mésocosmes).

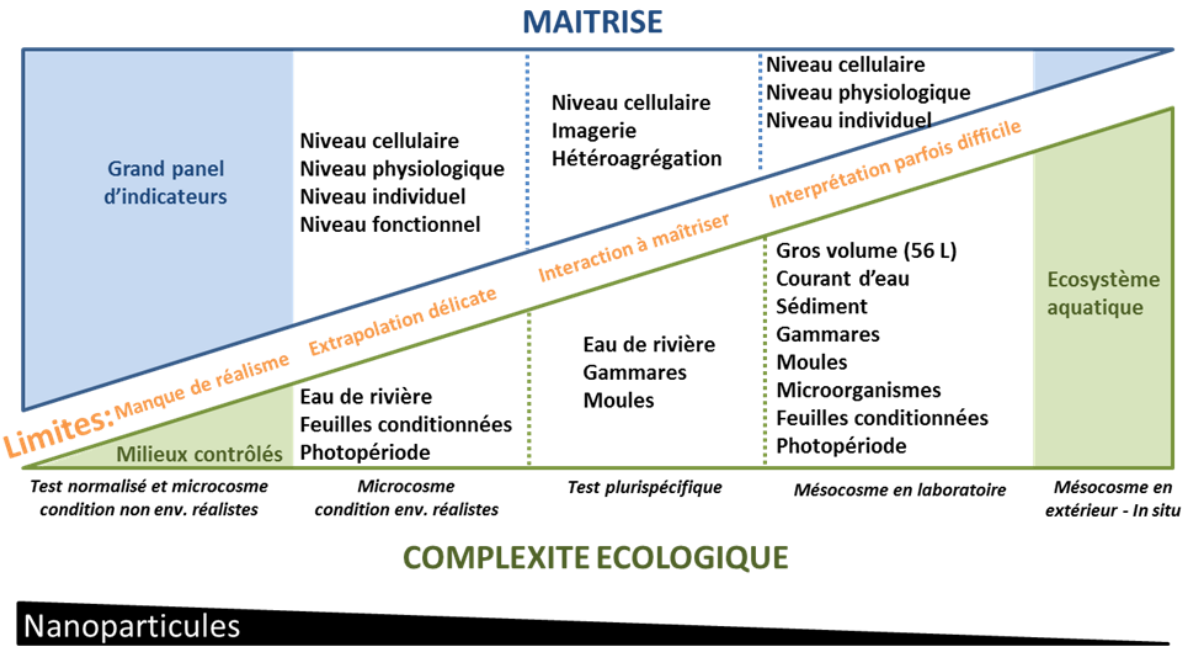


Figure 79 : Schéma réprésentant la relation inversement proportionnelle entre une gamme de complexité écologique des études et leur maîtrise associée. Les expérimentations effectuées dans ce travail de thèse y ont été représentées en indiquant les différents paramètres participant à la complexité écologique ainsi que les niveaux d'orgnanisation étudiés et les limites observées. La représentativité des études menées sur les nanoparticules associée à la complexité écologique est figurés avec la flèche noire. Sources : J. Andreï.

Dans ce type d'étude, le choix des espèces est important et doit être représentatif d'interactions existant en conditions réelles. L'espèce *G. roeseli* a été préférée dans ces études plus complexes puisqu'elle est la seule à avoir à répondu aux expositions aux nAg dans les microcosmes. La seconde espèce introduite dans les dispositifs a été la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), puisque ce bivalve a fait l'objet d'un autre travail de thèse relatif au programme MESONNET. Dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, ces deux espèces benthiques peuvent occuper les mêmes habitats, et plusieurs études se sont déjà intéréssées à leur intéraction. Par exemple il a été observé que l'arrivée de l'espèce invasive *Dreissena polymorpha* sur un nouveau site, pouvait se traduire par une augmentation de l'abondance des macroinvertébrés benthiques dont les amphipodes (Gergs and Rothhaupt, 2008a; Stewart and Haynes, 1994). En effet, les coquilles de dreissènes (vides ou pleines) peuvent, par exemple, servir d'habitat pour les gammares (Kobak and Żytkowicz, 2007). De plus, les pseudofécès produites par les dreissènes peuvent être consommées par les gammares, parfois même préférentiellement à une litière de feuilles (Gergs et Rothhaupt, 2008a, 2008b). Avec leurs appendices, les gammares peuvent alors stresser les dreissènes en irritant leurs tissus mous et entrainer la mise place de mécanismes de

défense anti-prédateurs (Kobak et al., 2012). A l'inverse, les fécès et pseudofécès produites par les gammares peuvent elles aussi servir de source de nourriture aux organismes filtreurs et collecteurs (Navel et al., 2011). Un transfert trophique à double sens d'une contamination semble alors envisageable entre les gammares et les dreissènes. Ces interactions comportementales, trophiques et énergétiques n'ont pas pris directement part aux objectifs de ces travaux de thèse, cependant elles ouvrent de nouveaux questionnements pour de futures études d'écotoxicité.

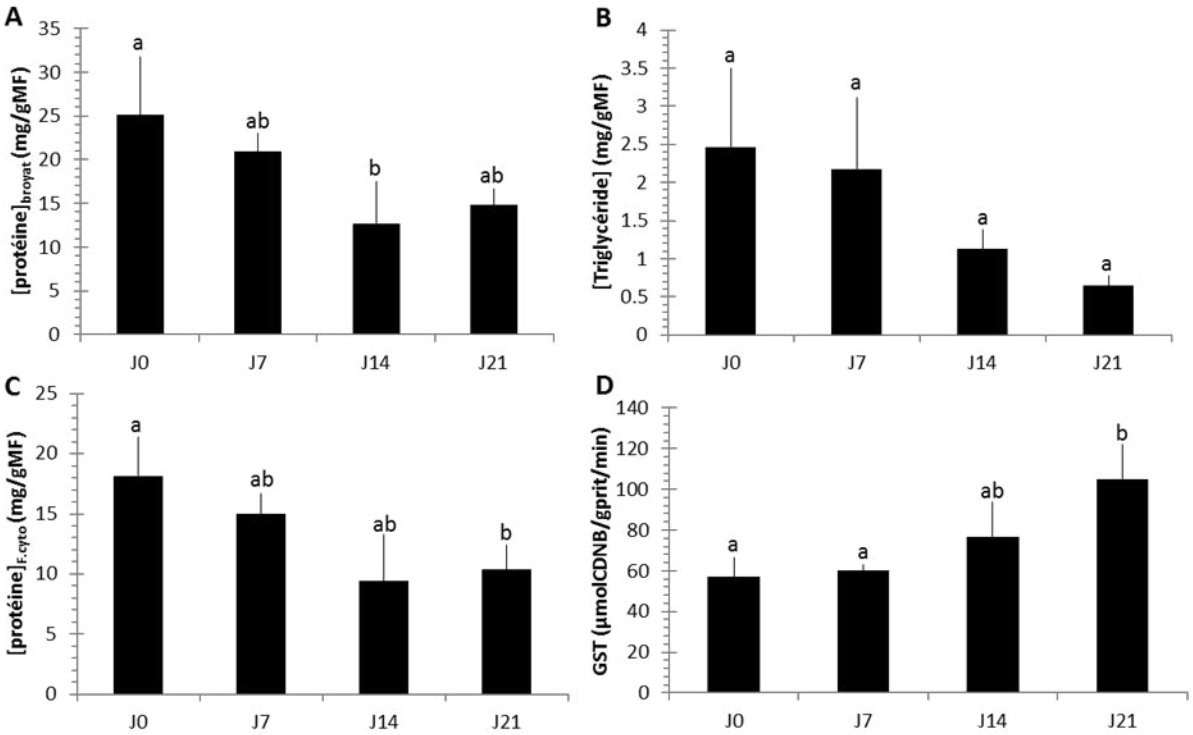
Dans les mésocosmes, l'introduction de communautés microbiennes a permis une complexification des interactions. Compte tenu des dimensions et de la configuration des dispositifs, les gammares et les feuilles d'aulne ont été regroupés dans des cages pour faciliter leur prélèvement en minimisant toute perturbation du système (remise en suspension du sédiment). Dans ces conditions, seul un transfert trophique de la contamination des gammares vers les dreissènes semble avoir été possible.

Les indicateurs de stress mesurés sur les organismes ont aussi été contraints par ce type de dispositif expérimental. Dans le cas présent, deux des indicateurs (consommation en oxygène et production de FPOM) étudiés chez les gammares en microcosmes et répondant bien à une contamination aux nAg n'ont pas pu être mis en place dans ces conditions puisque leur mesure, difficilement réalisable, aurait nécessité des ajustements importants du protocole d'expérimentation. En effet, concernant la mesure de la production de FPOM par les gammares, la récupération exhaustive des FPOM s'avère difficile voire impossible à mettre en place dans un dispositif composé de sédiment et de bivalves filtreurs. Pour la consommation en oxygène des gammares, la durée des mesures est trop longue pour s'adapter à ce genre d'étude. Une approche multibiomarqueur des effets biologiques nous est apparue comme étant un choix judicieux puisqu'elle permet la mesure d'un grand nombre de biomarqueurs sur un nombre restreint d'individus.

Une des limites de ces études en mésocosme concerne alors le choix des paramètres à étudier. Les objectifs premiers d'une étude doivent clairement être définis en amont pour s'assurer que le dispositif en mésocosme soit le plus adapté au questionnement (Pascoe et al., 2000).

Une autre limite inhérente à l'étude en conditions plus complexes concerne la difficulté d'interprétation des résultats en relation avec une maitrise difficile de la contamination ainsi qu'une faible réplicabilité des dispositifs (Bour et al., 2015). Un des constats les plus marquants des résultats obtenus dans les dispositifs en mésocosmes concerne les forts pourcentages de mortalité systématiquement observés, allant de 10 à plus de 90% après 21 jours. Cette mortalité anormale n'a pas été une conséquence des contaminations par les nanoparticules puisqu'elle a concerné uniformément l'ensemble des conditions, témoins y compris. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène comme par exemple une

température de l'eau trop élevée, un stress causé par la kaolinite en suspension et issue du sédiment ou un cannibalisme important entre gammares. D'autres facteurs de stress pourraient être le temps d'expérimentation, trop long pour les gammares, l'utilisation d'organismes encore immatures ou au contraire en fin de cycle de vie (environ 2 ans), ou encore un prélèvement dans le milieu à une période de l'année inadéquate comme par exemple en période de reproduction. L'étude de l'exposition en mésocosmes des gammares aux $nTiO_2$ est la seule qui présente de très forts taux de mortalité d'une part et des mesures d'activité des biomarqueurs (sub)cellulaires effectuées aux trois temps de prélèvement d'autre part. La figure 80 présente les résultats des mesures de concentrations en protéines (Figure 80A), et en triglycérides (Figure 80B) dans le broyat ainsi que des concentrations en protéines (Figure 80C) ainsi que les résultats d'activité enzymatique de la GST (Figure 80D) dans la fraction cytosolique.



<u>Figure 80 :</u> Moyennes (+écarts-types) des concentrations en protéines du broyat (A), en triglycérides (B) en protéines de la fraction cytosolique (C) et de l'activité enzymatique de la GST (D) mesurées sur un pool de 5 gammares avant (J0) et après 7, 14 et 21 jours d'exposition dans les dispositifs témoins de l'étude en mésocosme portant sur les $nTiO_2$. Tests statistiques : Anova à un facteur suivi de TukeyHSD. Les groupes de mêmes lettrines ne sont pas statistiquement différents

Les résultats concernant les réserves énergétiques montrent des baisses significatives des concentrations en protéines ainsi qu'une forte tendance à la baisse également pour les triglycérides (Tukey HSD entre J0 et J21 : p-value=0,056). Les mesures d'activité de la GST montrent, au contraire, une augmentation après 21 jours de l'activité de défense antitoxique des organismes. L'ensemble de ces résultats révèle la présence d'un stress chez les gammares résultant de l'exposition en mésocosme et la mise en place de mécanismes de défense coûteux en énergie. Ces mesures ont été effectuées sur des organismes encore en vie après 21 jours et donc potentiellement plus résistants au stress responsable des fortes mortalités observées.

Cependant, les causes exactes de ces mortalités excessives restent incertaines et révèlent toute la complexité d'une étude en mésocosme où malgré le suivi des paramètres physico-chimiques du milieu et l'étude de nombreux biomarqueurs chez les organismes, toute interprétation fiable est restée impossible. La seule interprétation plausible consisterait à dire que les dispositifs, les conditions et les temps d'expositions n'étaient pas adaptés à une étude sur les gammares.

Des études en mésocosmes restent indéniablement plus réalistes que celles effectuées en microcosmes, puisqu'elles permettent une approche plus représentative des conditions environnementales (Bour et al., 2015; Lähteenmäki et al., 2015; Teuben and Verhoef, 1992). Dans l'étude des nanoparticules, ce type d'approche permettant d'étudier une contamination chronique à de faibles concentrations semble être la mieux adaptée à un scénario de rejet. La complexité des dispositifs permet en partie de mimer les principaux processus de transformation et de dégradation des nanoparticules dans les écosystèmes d'eau douce comme la dissolution, l'hétéroagrégation, l'homoagrégation, la sédimentation ainsi que l'adsorption et l'absorption. Dans le cas présent, des modifications expérimentales et des améliorations des systèmes sont nécessaires pour permettre la réalisation d'étude sur les gammares. En effet des dispositifs avec une colonne d'eau plus basse et un sédiment à grains moins fins faciliteraient leur prélèvement. Ces derniers ne seraient plus enfermés dans des cages et pourraient directement interagir avec les dreissènes. Cette solution permettrait également d'éviter ou limiter le cannibalisme potentiel ou le stress dû à la kaolinite. La température devrait se situer entre 12 et 14 °C et des tests en amont devraient être effectués pour réévaluer les temps de prélèvements. Des temps de prélèvement plus rapprochés en début d'étude et plus éloignés en fin d'expérimentation pourraient permettre d'observer plus finement l'apparition des effets et la mise en place des systèmes de détoxification. Enfin plusieurs études à différents stades de développement des gammares semblent être intéressantes afin de révèler le cas échéant une relation entre le cycle de vie et la sensibilité des organismes confrontés à une contamination aux nanoparticules. Une sensibilité plus importante des juvéniles appartenant à l'espèce

G. pulex a, par exemple, plusieurs fois été observée suite à une contamination au cadmium (Alonso et al., 2010; McCahon and Pascoe, 1988).

Dans ces travaux de thèse, les études en microcosmes sont celles qui ont apporté le plus de résultats intéressants. Elles ont permis d'observer des effets patents à plusieurs niveaux d'organisation. Des interprétations cohérentes et des hypothèses plus larges sur des conséquences environnementales ont pu être émises.

I.4. Une étude des effets des nanoparticules à plusieurs niveaux d'organisation

Un des objectifs de ces travaux de thèse a été de s'intéresser à plusieurs niveaux d'organisation biologique par la mise en place d'approches intégrées menées à différentes échelles, incluant à la fois les organismes mais également les processus fonctionnels auxquels ils sont associés dans les milieux naturels. L'intérêt d'une telle démarche est d'avoir une vision d'ensemble des réponses des organismes face à un stress. Dans le cas des nanoparticules, pour lesquelles les études sur les Crustacés sont plutôt rares à ce jour, ce genre d'approche semble pertinent pour obtenir une image plus générale des effets. De plus, dans le cas d'études réalisées à de très faibles concentrations d'exposition, cette approche permet par ailleurs de déterminer les biomarqueurs les plus sensibles à la contamination. Des contraintes et limites inhérentes à ce type d'approche sont toutefois imposées. En effet, dans le cas d'étude multi-niveau, un représentant d'un niveau est choisi sans étudier ce niveau de manière exhaustive. Si l'intérêt de l'étude est d'observer chaque niveau d'organisation indépendamment les uns des autres, des biomarqueurs connus pour bien répondre à une contamination semblent être les mieux adaptés. Par contre s'il y a une volonté de faire un lien entre les différents niveaux d'organisation, des biomarqueurs cohérents doivent être choisis en conséquence. Par exemple, si dans un premier temps notre démarche a consisté à étudier des biomarqueurs propres à chaque niveau sans forcément chercher à établir un lien, la démarche s'est affinée au fil du temps en s'intéressant de plus en plus au métabolisme énergétique sur plusieurs niveaux. Les différents biomarqueurs étudiés sur les gammares et associés aux différents niveaux d'organisation sont présentés dans le tableau 25.

<u>Tableau 25 :</u> Bilan des réponses des biomarqueurs étudiés dans différentes conditions d'exposition (des microcosmes aux mésocosmes) chez les gammares (3 espèces et 3 populations) aux différents niveaux d'organisation (cellulaire, physiologique, individuel et fonctionnel), pour 3 compositions de nanoparticules testée (nAg, $nTiO_2$ et NTC) de taille et de formes différentes. Les flèches vertes indiquent une augmentation ou diminution des réponses suite à l'exposition aux nanoparticules à au moins une des concentrations d'exposition appliquées. Des croix rouges indiquent une absence de réponse aux conditions testées.

Niveaux d'organisation	Etudes des effets des nAg en microcosmes				Etudes en conditions intermédiaires	Etudes des effets des nanoparticules en mésocosmes		
	Espèces			Populations (x3)				
	G. fossarum	*G. pulex*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*	*G. roeseli*
	nAg (60 nm)	nAg (60 nm)	nAg (10-100 nm)	nAg (10 et 60 nm)	$nTiO_2$	nAg (plate) (sphère)	$nTiO_2$ (bâton) (cube)	NTC (sans MO) (avec MO)
Niveau cellulaire								
- Réponse antioxydante/antitoxique	✗	↗ (MXR)	✗	✗	✗	✗ ✗	✗ ✗	✗ ✗
- Dommage cellulaire	non mesuré	non mesuré	non mesuré	✗	✗	✗ ✗	✗ ✗	✗ ✗
- Réserve énergétique	non mesuré	non mesuré	✗	✗	✗	✗ ↘ (ETS)	✗ ✗	✗ ✗
Niveau physiologique								
- Osmolalité	✗	✗	✗	non mesuré	non mesuré	✗ ↘	✗ ↘	✗ ✗
- Consommation en oxygène	non mesuré	non mesuré	↗	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré
Niveau individuel								
-Ventilation	✗	✗	✗	non mesuré	non mesuré	✗ ✗	✗ ✗	✗ ✗
-Locomotion	✗	✗	↘	non mesuré	non mesuré	↘ ↘	↘ ↘	↘ ↘
Niveau Fonctionnel								
- Consommation	✗	✗	✗	↗	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré
- Production de FPOM	✗	✗	↘	✗	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré

Au niveau cellulaire, 14 biomarqueurs ont été testés dans l'ensemble des expérimentations pour évaluer les réponses antioxydantes, antitoxiques, les dommages cellulaires et les réserves énergétiques. Globalement, sur la base des biomarqueurs étudiés, l'exposition aux 3 types de nanoparticules (nAg, $nTiO_2$ et NTC), que ce soit dans des conditions en microcosmes ou en mésocosmes, n'a pas montré d'effets marqués au niveau cellulaire. En microcosmes, seule une augmentation de l'activité de transport MXR a été observée chez les gammares appartenant à l'espèce *G. pulex* exposés au nAg de 60 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$. Cette induction reflète la détection par l'organisme de l'exposition aux nAg et/ou argent dissous, et montre la mise en place à ces concentrations d'un processus de détoxication. Peu d'études se sont déjà intéressées à la réponse MXR des gammares (Horion et al., 2015; Timofeyev et al., 2007) et aucune à ce jour ne concerne les nanoparticules. En effet, pour les nanoparticules, à notre connaissance, seules deux études existent et ont, au contraire, montré des inhibitions de l'activité des pompes membranaires MXR chez l'oursin et la moule. Ce biomarqueur semble toutefois intéressant pour l'étude des nanoparticules et mériterait des études plus approfondies.

En mésocosmes, le seul biomarqueur à avoir répondu à l'exposition aux nanoparticules est l'activité de l'ETS avec en l'occurence une baisse observée *G. roeseli* exposés aux nAg sphériques à 50 $\mu g.L^{-1}$ après 21 jours. Cette observation suggère un effet des nAg sur le métabolisme énergétique des gammares, mais apporte cependant trop peu d'informations pour formuler des hypothèses fiables. Schmidlin et al. (2015) ont eux-aussi étudié cette activité ETS sur des gammares (*G. fossarum*) et ont également montré une réduction significative suite à une exposition au sulfate de cuivre.

Dans nos études, le niveau physiologique a aussi été appréhendé via l'étude de l'osmolalité et de la consommation en oxygène. Les mesures d'osmolalité ont été effectuées dans la majorité des expérimentations et des diminutions ont été observées uniquement chez *G. roeseli* après 21 jours d'exposition en mésocosmes aux nAg sphériques (50 $\mu.L^{-1}$) et après 14 jours aux $nTiO_2$ cubiques (0.8 $mg.L^{-1}$). Cet indicateur suggère des modifications de la régulation osmotique qu'il serait intéressant de préciser par des dosages des ions Na^+ et Cl^- hémolymphatiques. En effet, ces derniers sont connus pour contribuer à 90% aux valeurs d'osmolalité, masquant ainsi des variations plus subtiles de la régulation osmotique (Arce Funck et al., 2013; V. Felten et al., 2008b).

Dans ce manuscrit, une seule étude menée sur *G. roeseli* s'est intéressée à la respiration des gammares via des mesures de consommation en oxygène et a révélé des résultats très intéressants. En effet une forte corrélation (R^2=0,71) a été observée entre les mesures de consommation en oxygène des gammares et les concentrations en argent mesurées dans les organismes. Les effets des nAg sur la respiration des gammares ont, de plus, été observés dès la plus faible concentration testée de 0.5 $\mu g.L^{-1}$

pour les nAg de 10 nm, et montrent bien la sensibilité de ce biomarqueur dans ce contexte. Ce biomarqueur a plusieurs fois été étudié chez les gammares exposés à des métaux (Simcic et al., 2005; Sutcliffe, 1984), et une baisse de la consommation en oxygène a par exemple déjà été observée chez *G. pulex* exposé au cuivre, au mercure et à l'argent. Cependant des mesures effectuées sur des poissons (*Danio rerio* et *Perca fluvialitis*) exposés aux nAg (de 12 à 81 nm et de 63 $\mu g.L^{-1}$ à 14 $mg.L^{-1}$) n'ont pas révélé d'effet sur ce paramètre. Une hypothèse permettant d'expliquer l'augmentation de la respiration en réponse à la contamination est que les nAg induisent la production de ROS générant en conséquence une hypoxie chez les organismes contaminés (Eom et al., 2013).

Le niveau individuel, les biomarqueurs de comportement tels que l'activité locomotrice et la ventilation apportent une réponse rapide, non destructrice et pour de très faibles concentrations d'exposition (V. Felten et al., 2008b; Gerhardt, 1996). Cependant dans nos études, malgré les nombreuses mesures effectuées, aucun effet sur la ventilation des gammares n'a été observé. Par contre, en ce qui concerne la locomotion, des réponses sensibles aux faibles concentrations d'exposition ont été observées, mais uniquement chez *G. roeseli.* Ainsi, des diminutions ont été mesurées dès 0,5 $\mu g.L^{-1}$ d'expositions aux nAg (10, 40 et 60 nm) en microcosmes et en mésocosmes dès 38 $\mu g.L^{-1}$ de nAg sphérique, 50 $\mu g.L^{-1}$ de nAg plate, 0,5 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ cubique, 0,8 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ bâtonnet, et dès 0.5 $mg.L^{-1}$ de NTC avec ou sans matière organique. Ces baisses pourraient indiquer une stratégie de réallocation énergétique visant à permettre la mise en place de mécanismes de défense et de détoxication.

Au niveau fonctionnel, la consommation des feuilles et la production de FPOM par les gammares sont les deux processus qui ont été mesurés. Leur mise en place n'a été possible que dans les microcosmes, et des effets significatifs n'ont seulement été observés que chez *G. roeseli.* En effet dans l'expérience 1B « Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) », des baisses des productions de FPOM des gammares ont été observées dès 0,5 $\mu g.L^{-1}$ alors qu'aucune variation de leur consommation en feuilles n'a été mesurée. Des diminutions de production de FPOM chez *G. roeseli* exposés à des nAg de 10 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$ ont également été observées dans l'expérience 3 «Assessing the effects of silver nanoparticles on the ecophysiology of *Gammarus roeseli»*. Ces résultats nous amène à proposer deux hypothèses. Une diminution de la production de FPOM pourraient être le résultat d'une plus forte assimilation de la nourriture comme l'ont déjà suggéré (Zubrod et al., 2011) pour *G. fossarum* exposé à un fongicide. Une autre explication serait que ces faibles productions soient une conséquence d'une perturbation des fonctions digestives. En effet, des perturbations de l'activité

des enzymes digestives ont déjà été observées chez des Crustacés exposés à de faibles concentrations métalliques (De Coen and Janssen, 1997; Dedourge-Geffard et al., 2009). Quel que soit le mécanisme impliqué, la baisse de production de FPOM pourrait se traduire par des conséquences écosystémiques puisqu'elles servent de source de nourriture à de nombreuses espèces de collecteurs actifs et passifs permettant l'incorporation du carbone dans le réseau trophique (Cushing et al., 1993; Wallace and Webster, 1996). Une exposition des gammares à de faibles concentrations de nAg pourrait donc indirectement avoir des conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes d'eau douce en modifiant le cycle de la matière organique via une réduction des flux de FPOM.

Dans l'expérience 2 «Effets des nanoparticules d'argent sur 3 populations de gammares appartenant à l'espèce *G. roeseli*», un autre pattern de résultats a été observé sur ce niveau fonctionnel. Les productions de FPOM de *G. roeseli* n'ont pas été modifiées par l'exposition aux nAg, par contre l'activité de consommation a été augmentée chez les organismes prélevés sur le site de Marly et exposés aux nAg de 10 nm à 5 $\mu g.L^{-1}$. L'absence d'une augmentation de FPOM en relation avec l'augmentation de l'activité de consommation suggère également une réflexion autour des hypothèses d'assimilation ou de perturbation digestive citées précédemment. Quoi qu'il en soit, ces résultats ouvrent de nouvelles voies de réflexion et méritent donc d'être approfondis notamment en focalisant des recherches sur la physiologie digestive des gammares.

Finalement, à la lumière de l'ensemble des résultats, le niveau cellulaire classiquement étudié dans les études de nano-écotoxicité, ne semble pas, en tout cas de la façon dont nous l'avons abordé, être le mieux adapté à l'étude des effets des nanoparticules sur les gammares. Sur un grand nombre de biomarqueurs étudiés, dans différentes conditions expérimentales et pour plusieurs types de nanoparticules, seuls deux effets des nanoparticules ont été observés sur deux biomarqueurs différents (activité de transport MXR et activité ETS). L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les deux seules études ayant adopté une approche multibiomarqueur cellulaire similaire, chez *G. roeseli* exposé aux nanoparticules de dioxyde de cérium ($nCeO_2$; Garaud et al., 2015), et chez *G. fossarum* exposés aux nAg (Mehennaoui et al, en préparation). A l'inverse, les trois autres niveaux étudiés semblent apporter des informations pertinentes et complémentaires relatives aux effets des nanoparticules sur le métabolisme énergétique de *G. roeseli,* qui s'est avérée l'espèce la plus sensible. Des réductions de l'activité de locomotion liées aux expositions aux nanoparticules correspondent à des réponses rapidement mises en place dès la détection de la contamination. Elles pourraient suggérer une baisse d'activité coûteuse en énergie pour permettre son stockage ou sa réallocation pour la mise en place de mécanismes de détoxication. Au niveau (sub)cellulaire, l'induction d'activité des mécanismes de détoxication n'a

toutefois pas été observée en réponse à l'exposition aux nanoparticules. Ces mécanismes sont peut-être mis en place à de plus forte concentrations ou après une durée de contamination plus longue. Le stockage d'énergie serait alors prévisionnel et s'effectuerait dès les plus faibles concentrations d'exposition perçues par l'organisme. L'hypothèse d'un stockage d'énergie semble également plausible si l'on considère les résultats obtenus au niveau physiologique telle que l'augmentation de la consommation en oxygène mais également au niveau fonctionnel avec la baisse de production de FPOM. Finalement, une même hypothèse de mise en réserve énergétique peut être proposée suite aux résultats obtenus aux trois niveaux d'intégration étudiés et mériterait d'être étudiée plus en profondeur afin notamment de relier ces trois observations.

I.5. Intérêt d'une double approche écotoxicologique et écologique

Une double approche écotoxicologique et écologique associée à une étude en conditions environnementalement réalistes s'est avérée intéressante et pertinente pour envisager la réponse à la question des effets des nanoparticules sur les organismes aquatiques et sur les écosystèmes d'eau douce. En effet, il est intéressant, avec une telle approche, de pouvoir simultanément observer les résultats d'une contamination au niveau individuel et les conséquences qui pourraient en découler sur les écosystèmes d'autre part (niveau fonctionnel). Ce type d'approche qui demeure assez peu commune dans les études relatives aux effets de contaminants, l'est encore moins dans le domaine des nanoparticules. Il en ressort que pour le gammare, les mesures se rapportant aux aspects traditionnellement associés à l'écologie sont plutôt faciles à mettre en place puisqu'elles ne nécessitent guère que des filtrations et des mesures de masses. Elles sont donc également moins coûteuses, non destructrices, et apportent une idée concrète des effets de l'exposition des nAg sur les organismes, ainsi que sur leurs conséquences potentielles sur les écosystèmes d'eau douce.

En complément, des études écotoxicologiques plus poussées sur les mécanismes cellulaires ou physiologiques sous-jacents sont en revanche incontournables pour comprendre les effets observés aux niveaux supérieurs.

II. Des effets dépendants de la composition mais aussi de la taille et de la forme des nanoparticules : la représentation dose/effet est-elle systématiquement la plus cohérente ?

La toxicité des nanoparticules peut être directement conditionnée par leur devenir dans un système complexe. L'ensemble des processus de transformation et de dégradation chimique (dissolution, sulfuration, photodégradation) et physique (homo et hétéroagrégation) participe à leur bioaccessibilité et biodisponibilité pour les organismes, et leur étude se révèle donc être d'une grande importance dans les expérimentations en écotoxicologie aquatique. Or, ce qui fait la spécificité des nanoparticules repose sur des facteurs intrinsèques. Leur composition chimique, leur taille, leur forme, leur surface spécifique, leur charge, leur enrobage ou encore leur fonctionnalisation sont des paramètres pouvant eux-aussi influencer leur toxicité. Ces facteurs peuvent également influencer la transformation et le devenir des nanoparticules dans le milieu. En somme, les paramètres intrinsèques propres à la nanoparticule et les paramètres extrinsèques lié à son milieu environnement sont fortement interdépendants et participent ensemble au devenir et à la toxicité des nanoparticules. C'est pour cela que la caractérisation des nanoparticules dans le milieu est un des points cruciaux dans les études de nano-écotoxicité et la compréhension des effets observés. Elle permet de caractériser la pression de contamination à laquelle les organismes ont réellement été confrontés. Cependant elle se heurte encore à de nombreuses limites techniques. C'est le cas par exemple dans nos travaux de thèse où une volonté de travailler dans des conditions environnementalement réalistes a quelque peu freiné le déploiement d'une caractérisation poussée. Les mesures au Nanosight (Nanoparticle Tracking Analysis) des diamètres hydrodynamiques et des potentiels zeta des nAg dans une eau de rivière, qui plus est à de faibles concentrations d'exposition se sont révélées infructueuses en raison de nombreux artefacts causés par les autres éléments présents dans le milieu (matières en suspension, matière organique etc.). Des vérifications des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules des solutions stock ont toutefois pu être effectuées au microscope électronique à transmission (MET), au Nanosight ou par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Ces mesures ont notamment permis de vérifier que l'exposition des gammares avait bien été réalisée à partir de différentes tailles et formes de nanoparticules, afin d'évaluer l'existence d'effets dépendants de ces paramètres.

II.1. Des effets fonction de la taille, de la forme et de la composition des nanoparticules

Dans les expérimentations menées en microcosmes, plusieurs tailles de nanoparticules ont été testées (de 10 à 100 nm). Les mesures de diamètre hydrodynamique effectuées au Nanosight ont bien confirmé les tailles déclarées par les fournisseurs. Les effets observés notamment sur la consommation en oxygène et la production de FPOM ont révélé, pour les plus petites tailles testées de 10 nm, des effets plus marqués et induits par de plus faibles concentrations en nAg. Cette tendance n'a toutefois pas été observée pour tous les biomarqueurs qui ont répondu à l'exposition aux concentrations de nAg. Par exemple, chez *G. roeseli*, les baisses de locomotion n'ont pas répondu à cette tendance d'effets dépendants de la taille des nAg. De plus, l'augmentation de la consommation en feuilles des gammares de la population de Marly exposée au nAg de 60 nm (5 $\mu g.L^{-1}$) n'a pas été observée à la plus petite taille testée de 10 nm.

Dans leur étude, Auffan et al. (2009) expliquent l'existence de propriétés de surface et de réactivités dépendantes de la taille des nanoparticules qui favorisent l'adsorption de celles de moins de 30 nm. Ce constat a été corroboré par Morones et al. (2005) qui ont observé des interactions directes des nAg avec les membranes de bactéries Gram-négative favorisées par des petites tailles de 1 à 10 nm. Les auteurs ont également observé que seules ces petites tailles de nAg étaient ensuite internalisées dans la cellule. Les petites tailles de nanoparticules sont donc plus réactives et plus biodisponibles, ce qui suggère des effets toxiques dépendants de la taille (Auffan et al., 2009). Ce constat confirme le précepte désormais bien admis disant que plus les nanoparticules sont petites et plus elles sont toxiques (Bar-Ilan et al., 2009; Butler et al., 2015; Hoheisel et al., 2012).

Les résultats obtenus dans nos travaux de recherche sont majoritairement en accord avec cet effet toxique dépendant de la taille. Les plus marquants, observés chez *G. roeseli*, concernent les mesures effectuées sur un pool de 6 biomarqueurs et reflétant en partie le métabolisme énergétique des gammares. La figure 81 présentée ci-dessous reprend les résultats de l'analyse discriminante (présentée dans le chapitre 3, section IV). Par souci de clarté, les résultats correspondant aux organismes témoins et à ceux exposés à 5 $\mu g.L^{-1}$ de nAg de différentes tailles sont groupés dans deux ellipses aux contours plus épais. Les résultats correspondants aux cinq tailles de nAg testées à 5 $\mu g.L^{-1}$ sont également mis en évidence à l'aide d'ellipses colorées. Sur cette figure et selon l'axe 1, une homogénéité des témoins est observable. Les deux plus petites tailles de 10 et 20 nm de nAg testées sont celles qui présentent les résultats les plus éloignés des témoins. Au contraire, les réponses correspondant aux trois plus grandes

tailles de 40, 60 et 100 nm sont plus proches des réponses des témoins et sont fortement confondues entre elles. Ces résultats sont donc également cohérents la taille seuil située vers 30 nm proposée par Auffan et al. (2009) au-dessous de laquelle les effets sont plus marqués.

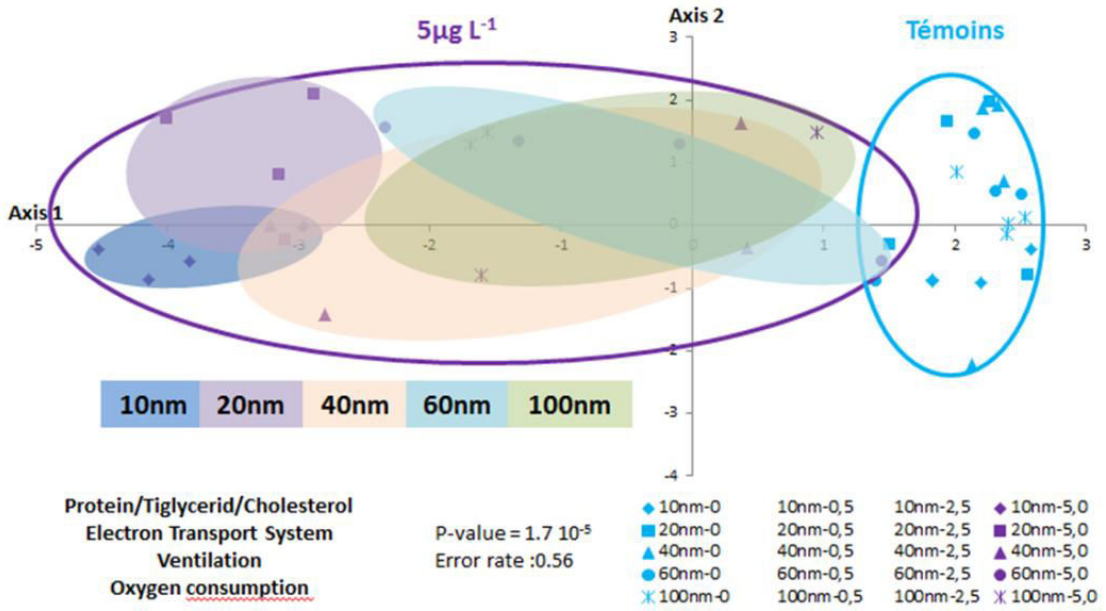


Figure 81 : Analyse discriminante couplant les réponses de 6 biomarqueurs mesurés sur G. roeseli, pour des gammares exposés à 4 concentrations (0, 0,5, 2,5 et 5 µg.L^{-1}) de 5 tailles de nAg (10, 20, 40, 60 et 100 nm) après 72h (n=4 ; Wilks p-value=1,7 10^{-5} ; taux d'erreur=0,56).

Alors que les expérimentations en microcosmes se sont uniquement intéressées à différentes tailles de nAg sphériques, les expérimentations en condition plus complexes ont quant à elles étudié différentes formes et compositions de nanoparticules. Les paramètres expérimentaux étant trop éloignés, leur comparaison semble inappropriée. Le même constat est établi pour les deux types d'expérimentations menées sur les nAg en microcosmes d'une part et en mésocomes d'autre part. Au contraire, les protocoles expérimentaux des trois mésocosmes étant communs, une interprétation sur les effets de la composition des nanoparticules aurait pu être proposée. Cependant, en raison des fortes mortalités observées dans chacun des dispositifs suggérant un protocole expérimental inadapté à l'étude sur les gammares, aucune interprétation fiable quant à un effet en relation avec la nature de la composition de la nanoparticule ne peut être proposée.

Concernant les effets relatifs à la forme des nanoparticules, et bien qu'ils aient été étudiés dans les mêmes conditions (forte mortalité), il est apparu que les nAg de forme sphérique et les nTiO_2 de forme cubique pourraient engendrer des effets plus marqués sur les gammares.

Enfin, les effets qui semblent liés à la taille où à la forme des nAg peuvent parfois être le résultat d'un phénomène de dissolution associé (Hoheisel et al., 2012). Il est à noter que pour la grande majorité des résultats observés, aucun phénomène de dissolution n'a été clairement observé dans nos milieux, à nos concentrations et pour les méthodes de mesures utilisées. Les paramètres physicochimiques et/ou les temps d'exposition n'ont sans doute pas favorisé ce processus. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car une adsorption de l'argent dissous sur la matière organique présente dans les milieux pourrait empêcher sa détection et son dosage précis comme cela avait été observé dans les études d'optimisation de la contamination présenté dans le chapitre 2 (Section III.1.4. Test à l'eau déminéralisée).

II.2. Effet en fonction de la masse, du nombre ou de la surface

La grande majorité des études menées sur les nanoparticules évaluent leurs effets en fonction de la concentration massique du matériel qui les compose. Or, comme le suggèrent les résultats de l'analyse discriminante présentés précédemment, pour une même concentration massique, les effets peuvent varier en fonction de la taille des nanoparticules, c'est-à-dire leur surface spécifique. Ce constat soulève l'intérêt d'étudier les effets des nanoparticules à partir d'une gamme de surfaces réactives plutôt que d'une gamme de concentrations massiques. Rappelons que le caractère innovant des nanoparticules et leur forte réactivité sont imputables à cette aire de surface spécifique. De plus en plus d'études, notamment celles s'intéressant aux effets dépendants de la taille, émettent ces mêmes recommandations (Bar-Ilan et al., 2009; Cowart et al., 2011; Xia et al., 2006). Certaines même présentent les résultats en fonction de ces surfaces calculées à partir d'images de microscopie électronique à transmission (Bar-Ilan et al., 2009).

En partant du postulat que l'effet observé n'est pas uniquement dû à la composition des nanoparticules (l'argent par exemple) mais plutôt à l'intrusion ou l'adsorption de structures nanoparticulaires empêchant le bon fonctionnement d'un mécanisme biologique, alors la représentation des résultats devrait être effectuée par rapport au nombre ou à la surface des nanoparticules. Cet aspect révèle une fois de plus la complexité des études de nano-écotoxicité.

Finalement, à l'heure actuelle l'étude des effets des nAg en fonction de leur concentration massique reste la démarche la plus adaptée au regard des techniques disponibles mais ces considérations relatives à la prise en compte de la surface réactive devraient à l'avenir être mieux prises en compte.

III. Les limites, points à développer et poursuites envisageables

III.1. Les limites techniques

Plusieurs limites techniques ont été signalées tout au long de ce manuscrit de thèse. Un des verrous majeurs concerne la caractérisation des nanoparticules dans des conditions d'exposition se rapprochant d'un certain réalisme environnemental.

Un des premières limites concerne la maîtrise des concentrations d'exposition et la mesure de l'argent dissous issu d'une dissolution oxydative des nAg. Ces limites sont en lien avec les techniques de préparation, de détection et de dosage des métaux dans des milieux hétérogènes composés notamment de matière organique. Dans l'étude des nanoparticules pour lesquelles les PEC sont encore très basses, les limites de détection des instruments de dosages classiques par spectrométrie de masse (ICP-MS) ou par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) sont trop élevées pour permettre des études à des concentrations réalistes ($ng.L^{-1}$)

Une nouvelle technique très prometteuse dans l'étude des nanoparticules est cependant en plein essor ; il s'agit de la sp-ICP-MS (single particle ICP-MS). Cette technique est capable d'étudier les nanoparticules dans des échantillons complexes et à de très faibles concentrations de l'ordre du $ng.L^{-1}$ permettant de travailler dans des gammes environnementalement réalistes (Mitrano et al., 2014). Une possibilité innovante de cette technique réside également dans l'évaluation quantitative des cinétiques de dissolution des nAg (Mitrano et al., 2014).

La microscopie hyperspectrale est une autre technique intéressante dans l'étude des nanoparticules puisqu'elle permet une observation optique associée à une analyse spectrale. Si des nanoparticules semblent être observées dans un échantillon, l'analyse spectrale peut le confirmer. Cette capacité d'imagerie hyperspectrale est notamment très intéressante pour l'étude de $nTiO_2$ et NTC pour lesquelles les techniques de dosages classiques ne sont pas encore adaptées.

III.2. Manques et poursuites envisageables

Un des aspects limitant la précision de l'étude de la contamination des gammares dans les tests d'écotoxicité concerne le dosage du contaminant qui ne peut être réalisé de manière fiable qu'à l'échelle d'un organisme entier. La cuticule des gammares représente une grande surface d'adsorption et une dissection des organismes pour prélever des tissus ne fournirait pas assez de matière. Afin de localiser la contamination et de savoir si les nanoparticules sont adsorbées et/ou absorbées, l'imagerie est un outil

pertinent qui permettrait de mieux interprétés les résultats obtenus. En effet, de l'imagerie en micro fluorescence a été effectuée sur un des gammares exposés 96 h à 1 $mg.L^{-1}$ de $nTiO_2$ (Expérience A, Chapitre 4, section I.) et a révélé la présence de titane dans le tube digestif du gammare. Des observations en MET seraient intéressantes pour localiser plus précisément les nanoparticules afin d'observer si elles sont libres dans le bol alimentaire, adsorbées aux parois du tube digestif, passées dans les espaces intercellulaires ou internalisées dans les cellules. Un outil récent et puissant en termes d'imagerie des nanoparticules, le NanoSIMS (spectrométrie de masse à ionisation secondaire) pourrait également être utilisé dans ce type d'étude. En effet, avec cet outil, Georgantzopoulou et al. (2013) ont pu observer la présence de nAg dans la lumière intestinale des daphnies qui semblaient passer à travers la barrière épithéliale.

Une des voies de détoxication bien connue des métaux (Amiard et al., 2006; Hamer, 1986) et dont les mesures n'ont pas encore été effectuées dans les études présentées dans ce manuscrit concerne les métallothionéines (MT). Des inductions des MT ont déjà été observées chez des crustacés suite à des contaminations métalliques (Amiard et al., 2006; Correia et al., 2002; Galloway et al., 2004) ainsi que chez des moules après une exposition au nAg (Gomes et al., 2015). Ces résultats pourront nous apporter des informations intéressantes notamment sur l'absorption de nAg ou d'argent dissous dans les cellules.

Enfin, pour affiner notre étude sur les effets des nAg sur le niveau fonctionnel, l'activité de production de FPOM du compartiment microbien serait à prendre en compte. Plusieurs tests ont d'ailleurs été élaborés en ce sens dans le courant de cette thèse, mais le protocole expérimental n'a pas été optimisé pour observer des effets. Des études plus poussées devraient être effectuées afin de déterminer si les baisses de production de FPOM observées chez les gammares sont également observables sur le compartiment microbien (changement de communautés, abondance, activités enzymatiques). Une perturbation des processus fonctionnels de ce compartiment pourrait entrainer des conséquences plus importantes encore sur le fonctionnement des écosystèmes.

Conclusion

Des scénarios de contamination environnementalement réalistes ont montré que les nAg peuvent entrainer un stress dépendant de leur petite taille et générant des effets sur plusieurs niveaux d'organisation biologique. Ainsi, une augmentation de la respiration des gammares, des diminutions de leur activité locomotrice, et une baisse de la production de FPOM ont été interprétées comme le résultat de perturbations du métabolisme énergétique alors même que des marqueurs comme les réserves énergétiques n'ont pas semblé affectés de manière significative. Les réponses observées semblent pourtant refléter la mise en place d'une stratégie d'économie et/ou de stockage d'énergie, qui interviendrait de manière précoce et s'effectuerait dès les plus faibles concentrations d'exposition perçues par l'organisme. Même si, dans ces conditions, les faibles concentrations ne semble pas affecter la survie des organismes, des effets sublétaux entrainant notamment des modifications de la redistribution de FPOM dans le réseau trophique pourraient avoir des conséquences indirectes sur le cycle de la matière organique et donc sur l'équilibre du fonctionnement des écosystèmes d'eau douce.Des expérimentations en mésocosmes, indéniablement plus réalistes que celles effectuées en microcosmes, ont permis une approche encore plus représentative des conditions environnementales en ajoutant notamment des interactions plurispécifiques. Cependant, toute la difficulté d'une telle démarche a pu être appréhendée dans ce travail de thèse, puisque des mortalités répétées et anormales sont survenues chez les gammares lors des expositions aux trois nanoparticules étudiées dans ces conditions (nAg, $nTiO_2$ et NTC). Cette mortalité ayant été observée chez les gammares témoins aussi bien que chez les exposés, il est apparu délicat d'interpréter les résultats obtenus et une réflexion autour des possibilités d'amélioration des dispositifs expérimentaux est engagée.

Finalement en considérant l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail doctoral, il peut être conclu qu'un rejet de nanoparticules d'argent est susceptible de générer des effets indirects sur le fonctionnement des écosystèmes en affectant la physiologie des gammares. Toutefois, et même si les conditions d'exposition pour lesquelles ces conclusions ont été émises se sont efforcées d'être les plus réalistes possibles, ces conditions n'ont pas pris en compte la totalité des paramètres reflétant la complexité des écosystèmes d'eau douce. Seules les expérimentations en mésocosmes permettent de s'en approcher au plus près et permettraient de confirmer ces observations. Il serait alors judicieux de mettre au point un protocole expérimental adapté à l'étude des gammares mais également à l'étude de leur activité fonctionnelle.

Face aux craintes sociétales soulevées actuellement par l'utilisation croissante des nanoparticules, et suite aux conclusions dégagées par ce travail doctoral, il semble que le rejet de nanoparticules dans les écosystèmes d'eau douce ne conduise pas à un scénario catastrophique, mais semble plutôt alerter sur la prise en considération d'une forme émergente de contamination dont il conviendra de mieux connaître les effets subtils afin de pouvoir mettre en place des politiques de gestion appropriées des risques environnementaux associés. Pour cela, les techniques de détection, de caractérisation, d'évaluation et d'interprétation des résultats doivent être améliorées et adaptées à ce contaminant émergent qui impose d'adopter une nouvelle démarche de réflexion, différente de celle classiquement employée en écotoxicologie. L'instrumentation associée à la caractérisation et à la quantification des nanoparticules en milieu complexe se développe actuellement et de nouvelles techniques très prometteuses permettront certainement de débloquer les verrous actuels et d'envisager une étude plus précise des effets de ces nanoparticules dans l'environnement.

Références bibliographiques

A

Abid, J.P., Wark, A.W., Brevet, P.F., Girault, H.H., 2002. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. Chem. Commun. 792–793. doi:10.1039/b200272h

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam Corbicula fluminea after heavy metals exposure. Aquat. Toxicol. 67, 347–357.

Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P.-M., 2010. High sensitivity of Gammarus sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1402–1407. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.011

Adams, L.K., Lyon, D.Y., Alvarez, P.J.J., 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions. Water Res. 40, 3527–3532. doi:10.1016/j.watres.2006.08.004

Addo Ntim, S., Thomas, T.A., Begley, T.H., Noonan, G.O., 2015. Characterisation and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. Food Addit. Contam. Part A 32, 1003–1011. doi:10.1080/19440049.2015.1029994

Ahamed, M., AlSalhi, M.S., Siddiqui, M.K.J., 2010. Silver nanoparticle applications and human health. Clin. Chim. Acta 411, 1841–1848. doi:10.1016/j.cca.2010.08.016

Alonso, Á., De Lange, H.J., Peeters, E.T., 2010. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods Gammarus pulex and G. fossarum. Ecotoxicology 19, 133–140.

Altmann, Jü., 2004. Military Uses of Nanotechnology: Perspectives and Concerns. Secur. Dialogue 35, 61–79. doi:10.1177/0967010604042536

Amiard, J., Amiardtriquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015

Anderson, N.H., Sedell, J.R., 1979. Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems. Annu. Rev. Entomol. 24, 351–377.

Arab, K., Steghens, J.-P., 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. Anal. Biochem. 325, 158–163. doi:10.1016/j.ab.2003.10.022

Arce Funck, J., 2014. Modulation d'un stress chimique par la contrainte alimentaire : approche intégrée de l'individu au fonctionnement de l'écosystème.

Arce Funck, J., Danger, M., Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., Guérold, F., Felten, V., 2013. Behavioural and physiological responses of Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. Aquat. Toxicol. 142-143, 73–84.

Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J., 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna. J. Nanobiotechnology 10, 14.

Asharani, P.V., Lian Wu, Y., Gong, Z., Valiyaveettil, S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology 19, 255102. doi:10.1088/0957-4484/19/25/255102

Auffan, M., Pedeutour, M., Rose, J., Masion, A., Ziarelli, F., Borschneck, D., Chaneac, C., Botta, C., Chaurand, P., Labille, J., Bottero, J.-Y., 2010. Structural Degradation at the Surface of a TiO2 -Based Nanomaterial Used in Cosmetics. Environ. Sci. Technol. 44, 2689–2694. doi:10.1021/es903757q

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. 4, 634–641. doi:10.1038/nnano.2009.242

B

Balbi, T., Smerilli, A., Fabbri, R., Ciacci, C., Montagna, M., Grasselli, E., Brunelli, A., Pojana, G., Marcomini, A., Gallo, G., Canesi, L., 2014. Co-exposure to n-TiO2 and Cd2+ results in interactive effects on biomarker responses but not in increased toxicity in the marine bivalve M. galloprovincialis. Sci. Total Environ. 493, 355–364. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.146

Bansal, V., Li, V., O'Mullane, A.P., Bhargava, S.K., 2010. Shape dependent electrocatalytic behaviour of silver nanoparticles. CrystEngComm 12, 4280. doi:10.1039/c0ce00215a

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran Daphnia magna exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 140, 175–186. doi:10.1016/j.cca.2005.01.013

Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 48, 357–389.

Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. Small 5, 1897–1910. doi:10.1002/smll.200801716

Barnard, A., Guo, H., 2012. The Global Distribution and movement of Naturally Occuring Inorganic Nanoparticles, in: Nature's Nanostructures. CRC Press, pp. 9–30.

Baudin, J.P., Garnier-Laplace, J., 1994. Accumulation, release, and tissue distribution of 110mAg from natural food (Gammarus pulex) by the common carp, Cyprinus carpio L. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 459–465.

Baughman, R.H., Zakhidov, A.A., de Heer, W.A., 2002. Carbon nanotubes–the route toward applications. Science 297, 787–792.

Becker, L., Bada, J.L., Winans, R.E., Hunt, J.E., Bunch, T.E., French, B.M., 1994. Fullerenes in the 1.85-billion-year-old Sudbury impact structure. Science 265, 642–645.

Becker, L., Poreda, R.J., Hunt, A.G., Bunch, T.E., Rampino, M., 2001. Impact Event at the Permian-Triassic Boundary: Evidence from Extraterrestrial Noble Gases in Fullerenes. Science 291, 1530–1533.

Behra, R., Sigg, L., Clift, M.J.D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. J. R. Soc. Interface 10, 20130396–20130396. doi:10.1098/rsif.2013.0396

Beisel, J.-N., Médoc, V., 2010. Bird and amphipod parasites illustrate a gradient from adaptation to exaptation in complex life cycle. Ethol. Ecol. Evol. 22, 265–270. doi:10.1080/03949370.2010.502321

Benn, T.M., Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ. Sci. Technol. 42, 4133–4139.

Berge, M., 2013. Le développement du nano-argent ; entre représentation hygiénistes, déterminisme technoscientifique et marché : analyse sociologique (Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en sociologie). Université du Québec à Montréal.

Bernhardt, E.S., Colman, B.P., Hochella, M.F., Cardinale, B.J., Nisbet, R.M., Richardson, C.J., Yin, L., 2010. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. J. Environ. Qual. 39, 1954–1965.

Bhushan, B., 2015. Governance, policy, and legislation of nanotechnology: a perspective. Microsyst. Technol. 21, 1137–1155. doi:10.1007/s00542-015-2511-x

Bianchini, A., Grosell, M., Gregory, S.M., Wood, C.M., 2002. Acute silver toxicity in aquatic animals is a function of sodium uptake rate. Environ. Sci. Technol. 36, 1763–1766.

Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E., 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (Perca fluviatilis). Aquat. Toxicol. 96, 159–165. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.019

Biswas, A., Bayer, I.S., Biris, A.S., Wang, T., Dervishi, E., Faupel, F., 2012. Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. Adv. Colloid Interface Sci. 170, 2–27. doi:10.1016/j.cis.2011.11.001

Boets, P., Lock, K., Goethals, P.L.M., Janssen, C.R., De Schamphelaere, K.A.C., 2012. A comparison of the short-term toxicity of cadmium to indigenous and alien gammarid species. Ecotoxicology 21, 1135–1144. doi:10.1007/s10646-012-0868-5

Borlakoglu, J.-T., Kickuth, R., 1990. Behavioral changes inGammarus pulex and its significance in the toxicity assessment of very low levels of environmental pollutants. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45, 258–265.

Borowsky, B., 1984. The use of the males' gnathopods during precopulation in some gammaridean amphipods. Crustaceana 47, 245–250.

Böttger, R., Feibicke, M., Schaller, J., Dudel, G., 2013. Effects of low-dosed imidacloprid pulses on the functional role of the caged amphipod Gammarus roeseli in stream mesocosms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 93, 93–100. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.04.006

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. J. Hazard. Mater. 283, 764–777. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.021

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. Carbon 54, 175–191. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024

Bowman, M.-C., Ballard, T.E., Ackerson, C.J., Feldheim, D.L., Margolis, D.M., Melander, C., 2008. Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. 130, 6896–6897. doi:10.1021/ja710321g

Brisson, A., Mornet, S., 2007. Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins, application to the high-density labelling of cell membranes. Google Patents.

Brunetti, G., Donner, E., Laera, G., Sekine, R., Scheckel, K.G., Khaksar, M., Vasilev, K., De Mastro, G., Lombi, E., 2015. Fate of zinc and silver engineered nanoparticles in sewerage networks. Water Res. 77, 72–84. doi:10.1016/j.watres.2015.03.003

Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013. A Mesocosm Study of Fate and Effects of CuO Nanoparticles on Endobenthic Species (Scrobicularia plana, Hediste diversicolor). Environ. Sci. Technol. 130110104824003. doi:10.1021/es303513r

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

Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Englert, D., Seitz, F., Rosenfeldt, R.R., Schulz, R., 2011. Effects of nano-TiO2 in combination with ambient UV-irradiation on a leaf shredding amphipod. Chemosphere 85, 1563–1567. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.060

Bury, N.R., Shaw, J., Glover, C., Hogstrand, C., 2002. Derivation of a toxicity-based model to predict how water chemistry influences silver toxicity to invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 133, 259–270.

Butler, K.S., Peeler, D.J., Casey, B.J., Dair, B.J., Elespuru, R.K., 2015. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. Mutagenesis 30, 577–591. doi:10.1093/mutage/gev020

C

Cammen, L.M., Corwin, S., Christensen, J.P., 1990. Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. Mar Ecol Prog Ser 65, 171–182.

Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., Pojana, G., 2010. Biomarkers in Mytilus galloprovincialis exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO2, Nano-SiO2). Aquat. Toxicol. 100, 168–177. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.009

Canesi, L., Frenzilli, G., Balbi, T., Bernardeschi, M., Ciacci, C., Corsolini, S., Della Torre, C., Fabbri, R., Faleri, C., Focardi, S., others, 2014. Interactive effects of nTiO 2 and 2, 3, 7, 8-TCDD on the marine bivalve Mytilus galloprovincialis. Aquat. Toxicol.

Capek, I., 2004. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. Adv. Colloid Interface Sci. 110, 49–74. doi:10.1016/j.cis.2004.02.003

Carlotti, M.E., Ugazio, E., Sapino, S., Fenoglio, I., Greco, G., Fubini, B., 2009. Role of particle coating in controlling skin damage photoinduced by titania nanoparticles. Free Radic. Res. 43, 312–322. doi:10.1080/10715760802716633

Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. J. Phys. Chem. B 112, 13608–13619.

Cedef, 2013. Dossier documentaire - Les nanotechnologies [WWW Document]. Ministère Financ. Comptes Publics-Ministère Léconomie Ind. Numér. URL http://www.economie.gouv.fr/cedef/dossier-documentaire-nanotechnologies (accessed 10.6.13).

Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes). Aquat. Toxicol. 94, 320–327.

Chen, H., Roco, M.C., Son, J., Jiang, S., Larson, C.A., Gao, Q., 2013. Global nanotechnology development from 1991 to 2012: patents, scientific publications, and effect of NSF funding. J. Nanoparticle Res. 15. doi:10.1007/s11051-013-1951-4

Chen, X., Mao, S.S., 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. Chem. Rev. 107, 2891–2959. doi:10.1021/cr0500535

Chevreux, E., Fage, L., 1925. Faune de France- Amphipodes, Collection Honoré de subventions de l'Académie des Sciences de Paris. Paris.

Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I., Hackley, V.A., 2011. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. Sci. Total Environ. 409, 2443–2450.

Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquat. Toxicol. 100, 151–159. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.012

Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.-J., Ross, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z., 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. Water Res. 42, 3066–3074. doi:10.1016/j.watres.2008.02.021

Choi, O., Hu, Z., 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. Environ. Sci. Technol. 42, 4583–4588.

Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T., 2008a. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology 17, 326–343. doi:10.1007/s10646-008-0213-1

Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T., 2008b. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology 17, 326–343. doi:10.1007/s10646-008-0213-1

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

Cobley, C.M., Rycenga, M., Zhou, F., Li, Z.-Y., Xia, Y., 2009. Etching and Growth: An Intertwined Pathway to Silver Nanocrystals with Exotic Shapes. Angew. Chem. Int. Ed. 48, 4824–4827. doi:10.1002/anie.200901447

Coleman, J.N., Khan, U., Blau, W.J., Gun'ko, Y.K., 2006. Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites. Carbon 44, 1624–1652. doi:10.1016/j.carbon.2006.02.038

Colman, B.P., Arnaout, C.L., Anciaux, S., Gunsch, C.K., Hochella, M.F., Kim, B., Lowry, G.V., McGill, B.M., Reinsch, B.C., Richardson, C.J., Unrine, J.M., Wright, J.P., Yin, L., Bernhardt, E.S., 2013. Low Concentrations of Silver Nanoparticles in Biosolids Cause Adverse Ecosystem Responses under Realistic Field Scenario. PLoS ONE 8, e57189. doi:10.1371/journal.pone.0057189

Colman, B.P., Wang, S.-Y., Auffan, M., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S., 2012. Antimicrobial effects of commercial silver nanoparticles are attenuated in natural streamwater and sediment. Ecotoxicology 21, 1867–1877. doi:10.1007/s10646-012-0920-5

Conlan, K.E., 1991. Precopulatory mating behavior and sexual dimorphism in the amphipod Crustacea. Hydrobiologia 223, 255–282.

Corot, C., Robert, P., Idee, J., Port, M., 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. Adv. Drug Deliv. Rev. 58, 1471–1504. doi:10.1016/j.addr.2006.09.013

Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod Gamamrus locusta. Mar. Environ. Res. 54, 357–360.

Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, Unio tumidus, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 106–121. doi:10.1006/eesa.1999.1842

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, Unio tumidus, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 122–131.

Couleau, N., Techer, D., Pagnout, C., Jomini, S., Foucaud, L., Laval-Gilly, P., Falla, J., Bennasroune, A., 2012. Hemocyte responses of Dreissena polymorpha following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. Sci. Total Environ. 438, 490–497. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.095

Cowart, D.A., Guida, S.M., Shah, S.I., Marsh, A.G., 2011. Effects of Ag nanoparticles on survival and oxygen consumption of zebra fish embryos, Danio rerio. J. Environ. Sci. Health Part A 46, 1122–1128. doi:10.1080/10934529.2011.590726

Crosera, M., Bovenzi, M., Maina, G., Adami, G., Zanette, C., Florio, C., Filon Larese, F., 2009. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. Int. Arch. Occup. Environ. Health 82, 1043–1055. doi:10.1007/s00420-009-0458-x

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

Cushing, C.E., Minshall, G.W., Newbold, J.D., 1993. Transport dynamics of fine particulate organic matter in two Idaho streams. Limnol. Oceanogr. 38, 1101–1101.

Czeczuga, B., 1975. Carotenoids in thirteen species of gammaridae from lake Bajkal. Comp. Biochem. Physiol. 50B, 259–268.

D

Danger, M., Arce Funck, J., Devin, S., Heberle, J., Felten, V., 2013. Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. Funct. Ecol. 27, 807–815.

Dangles, O., Guérold, F., 2001. Linking shredders and leaf litter processing: insights from an acidic stream study. Int. Rev. Hydrobiol. 86, 395–406.

Das, P., Xenopoulos, M.A., Metcalfe, C.D., 2013. Toxicity of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticle Suspensions to the Aquatic Invertebrate, Daphnia magna. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1–7.

Das, P., Xenopoulos, M.A., Williams, C.J., Hoque, M.E., Metcalfe, C.D., 2012. Effects of silver nanoparticles on bacterial activity in natural waters. Environ. Toxicol. Chem. 31, 122–130. doi:10.1002/etc.716

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997a. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 6, 43–55.

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997b. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing, II. Digestive enzyme activity in Daphnia magna exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. Chemosphere 35, 1053–1067.

Dedourge-Geffard, O., Charron, L., Hofbauer, C., Gaillet, V., Palais, F., Lacaze, E., Geffard, A., Geffard, O., 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (Gammarus fossarum) exposed to inland polluted waters. Ecotoxicol. Environ. Saf. 97, 139–146. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.07.016

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in Gammarus fossarum : An in situ experiment. Chemosphere 77, 1569–1576.

Dehedin, A., Piscart, C., Marmonier, P., 2013. Seasonal variations of the effect of temperature on lethal and sublethal toxicities of ammonia for three common freshwater shredders. Chemosphere 90, 1016–1022. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.07.055

Devin, S., Beisel, J.-N., 2006. Biological and ecological characteristics of invasive species: a gammarid study. Biol. Invasions 9, 13–24. doi:10.1007/s10530-006-9001-0

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

Dick, J.T., 1995. The cannibalistic behaviour of two Gammarus species (Crustacea: Amphipoda). J. Zool. 236, 697–706.

Direction générale de la prévention des risques, 2014. Eléments issus des déclarations des substances à l'état l'état n'anoparticulaire. Rapport d'étude 2014.

Dobrzycka-Krahel, A., Krzak, M., Szaniawska, A., 2014. A laboratory-based comparison of osmoregulatory ability at different water temperatures and salinities in the stenothermic isopod *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758) and the eurythermic amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) from the Baltic Sea. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 47, 29–39. doi:10.1080/10236244.2013.874120

Domingues, I., Santos, C.S.A., Ferreira, N.G.C., Machado, L., Oliveira, R., Ferreira, A., Lopes, I., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2015. Suitability of enzymatic markers to assess the environmental condition of natural populations of Gambusia affinis and Daphnia magna—a case study. Environ. Monit. Assess. 187. doi:10.1007/s10661-015-4429-2

Duran, M., 2007. Life Cycle of Gammarus pulex (L.) in the River Yeflil> rmak. Turk J Zool 31, 389–394.

Durán, N., Marcato, P.D., De Souza, G.I., Alves, O.L., Esposito, E., 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. J. Biomed. Nanotechnol. 3, 203–208.

E

Echegoyen, Y., Nerín, C., 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. Food Chem. Toxicol. 62, 16–22. doi:10.1016/j.fct.2013.08.014

Edgington, A.J., Roberts, A.P., Taylor, L.M., Alloy, M.M., Reppert, J., Rao, A.M., Mao, J., Klaine, S.J., 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

Einarson, S., 1993. Effects of temperature, seawater osmolality and season on oxygen consumption and osmoregulation of the amphipod Gammarus oceanicus. Mar. Biol. 117, 599–606.

El-Badawy, A., Feldhake, D., Venkatapathy, R., 2010. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More (No. 95). EPA United States Environmantal Protection Agency.

Elzey, S., Grassian, V.H., 2010. Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. J. Nanoparticle Res. 12, 1945–1958. doi:10.1007/s11051-009-9783-y

Eom, H.-J., Ahn, J.-M., Kim, Y., Choi, J., 2013. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)–flavin containing monooxygenase-2 (FMO-2) signaling acts in silver nanoparticles and silver ion toxicity in the nematode, Caenorhabditis elegans. Toxicol. Appl. Pharmacol. 270, 106–113. doi:10.1016/j.taap.2013.03.028

EPA, 2007. Nanotechnology White Paper (Environmental Protection Agency Report No. EPA 100/B-07/001). Washington.

Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 120, 23–28.

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. Environ. Sci. Technol. 42, 3914–3920.

Evanoff, D.D., Chumanov, G., 2005. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. ChemPhysChem 6, 1221–1231. doi:10.1002/cphc.200500113

F

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

Faria, M., Navas, J.M., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. Sci. Total Environ. 470-471, 379–389. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.055

Farkas, J., Christian, P., Alberto Gallego-Urread, J., Roos, N., Hassellövd, M., Tollefsena, K.E., Thomas, K.V., 2011a. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gill cells. Aquat. Toxicol. 101, 117–125.

Farkas, J., Peter, H., Christian, P., Gallego Urrea, J.A., Hassellöv, M., Tuoriniemi, J., Gustafsson, S., Olsson, E., Hylland, K., Thomas, K.V., 2011b. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. Environ. Int. 37, 1057–1062.

Fauss, E., 2008. The silver nanotechnology commercial inventory. University of Virginia.

Feckler, A., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R., Bundschuh, M., 2012. Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the Gammarus fossarum complex. Sci. Total Environ. 439, 158–164.

Federici, G., Shaw, B., Handy, R., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aquat. Toxicol. 84, 415–430. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.009

Felten, V., 2003. Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Université de Metz.

Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J., Geffard, O., 2008a. Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex exposed to acid stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 147, 189–197. doi:10.1016/j.cbpc.2007.09.006

Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008b. Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 86, 413–425.

Felten, V., Dolédec, S., Statzner, B., 2008. Coexistence of an invasive and a native gammarid across an experimental flow gradient: flow-refuge use, -mortality, and leaf-litter decay. Fundam. Appl. Limnol. Arch. Für Hydrobiol. 172, 37–48. doi:10.1127/1863-9135/2008/0172-0037

Feynman, R.P., 1959. There's Plenty of Room at the Bottom. Presented at the American Physical Society, California Institute of Technology (Cltech).

Fong, J., Wood, F., 2006. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. Int. J. Nanomedicine 1, 441–449.

Food and Drug Administration, 1999. Federal Register - Department of Health and Human Services, 21 CFR Part 310.

Fraser, T.W.K., Reinardy, H.C., Shaw, B.J., Henry, T.B., Handy, R.D., 2011. Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C 60 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Nanotoxicology 5, 98–108. doi:10.3109/17435390.2010.502978

Fung, M.C., Bowen, D.L., 1996. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. Clin. Toxicol. 34, 119–126.

G

Gaffet, E., 2011. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr.

Gaffet, E., 2008. Nanomatériaux: différentes voies de synthèse, propriétés, applications et marchés. Actual. Doss. En Santé Publique 64, 183.

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

Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J., Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. Environ. Pollut. 158, 1748–1755. doi:10.1016/j.envpol.2009.11.013

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. Environ. Sci. Technol. 38, 1723–1731.

Gao, J., Gu, H., Xu, B., 2009. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. Acc. Chem. Res. 42, 1097–1107. doi:10.1021/ar9000026

Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llaneza, V.L., Wang, Y., Bitton, G., Bonzongo, J.-C.J., 2009. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. Environ. Sci. Technol. 43, 3322–3328. doi:10.1021/es803315v

Garaud, M., 2015. Effets des nanoparticules manufacturées (nCeO2 et nAg) sur la biologie du bivalve d'eau douce Dreissena polymorpha. Université de Lorraine, Metz.

Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO2) sublethal effects on two freshwater invertebrates, Dreissena polymorpha and Gammarus roeseli. Aquat. Toxicol. 158, 63–74.

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

Georgantzopoulou, A., Balachandran, Y.L., Rosenkranz, P., Dusinska, M., Lankoff, A., Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Guignard, C., Audinot, J.-N., Girija, S., Hoffmann, L., Gutleb, A.C., 2013. Ag nanoparticles: size- and surface-dependent effects on model aquatic organisms and uptake evaluation with NanoSIMS. Nanotoxicology 7, 1168–1178. doi:10.3109/17435390.2012.715312

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

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

Gergs, R., Rothhaupt, K.-O., 2008a. Effects of zebra mussels on a native amphipod and the invasive Dikerogammarus villosus: the influence of biodeposition and structural complexity. J. North Am. Benthol. Soc. 27, 541–548. doi:10.1899/07-151.1

Gergs, R., Rothhaupt, K.-O., 2008b. Feeding rates, assimilation efficiencies and growth of two amphipod species on biodeposited material from zebra mussels. Freshw. Biol. 53, 2494–2503. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02077.x

Gerhardt, A., 1996. Behavioural early warning responses to polluted water. Environ. Sci. Pollut. Res. 3, 63–70.

Gessner, M.O., Chauvet, E., 1994. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. Ecology 75, 1807–1817.

Giles, J., 2004. Nanotech takes small step towards burying "grey goo." Nature 429, 591.

Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, P.C., Mirkin, C.A., 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. Angew. Chem. Int. Ed. 49, 3280–3294.

Gismondi, E., 2012. Étude des systèmes de défenses antitoxiques chez l'amphipode Gammarus roeseli: effets du parasitisme et d'une exposition au cadmium. Université de Lorraine.

Gismondi, E., Beisel, J.-N., Cossu-Leguille, C., 2012. Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of Gammarus roeseli. Environ. Res. 118, 47–52. doi:10.1016/j.envres.2012.06.004

Gledhill, T., Sutcliffe, D.W., Williams, J.W., 1993. British Freshwater Crustacea Malacostraca: A Key with Ecological Notes, J.M.ELLIOTT. ed.

Gohil, H., Ogram, A., Thomas, J., 2014. Stimulation of anaerobic biodegradation of DDT and its metabolites in a muck soil: laboratory microcosm and mesocosm studies. Biodegradation 25, 633–642. doi:10.1007/s10532-014-9687-0

Gomes, S., Scott-Fordsmand, J., Amorim, M., 2015. Cellular Energy Allocation to Assess the Impact of Nanomaterials on Soil Invertebrates (Enchytraeids): The Effect of Cu and Ag. Int. J. Environ. Res. Public. Health 12, 6858–6878. doi:10.3390/ijerph120606858

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel Mytilus galloprovincialis. Mar. Environ. Res. 101, 208–214. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.004

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

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environ. Sci. Technol. 43, 9216–9222.

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. Environ. Pollut. 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Grabowski, M., Bacela, K., Konopacka, A., 2007. How to be an invasive gammarid (Amphipoda: Gammaroidea)–comparison of life history traits. Hydrobiologia 590, 75–84.

Grassé, P.-P., Poisson, R.A., Tuzet, O., 1961. Zoologie-I : Invertébrés, Masson et Cie éditeurs. ed, Précis de Sciences Biologiques. Paris.

Griffitt, R.J., Brown-Peterson, N.J., Savin, D.A., Manning, C.S., Boube, I., Ryan, R.A., Brouwer, M., 2012. Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (Cyprinodon variegatus). Environ. Toxicol. Chem. 31, 160–167. doi:10.1002/etc.709

Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles.

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

Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. Chemosphere 119, 608–619. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.049

Grombe, R., Allmaier, G., Charoud-Got, J., Dudkiewicz, A., Emteborg, H., Hofmann, T., Larsen, E.H., Lehner, A., Llinàs, M., Loeschner, K., Mølhave, K., Peters, R.J., Seghers, J., Solans, C., von der Kammer, F., Wagner, S., Weigel, S., Linsinger, T.P.J., 2015. Feasibility of the development of reference materials for the detection of Ag nanoparticles in food: neat dispersions and spiked chicken meat. Accreditation Qual. Assur. 20, 3–16. doi:10.1007/s00769-014-1100-5

Grombe, R., Charoud-Got, J., Emteborg, H., Linsinger, T.P.J., Seghers, J., Wagner, S., von der Kammer, F., Hofmann, T., Dudkiewicz, A., Llinas, M., Solans, C., Lehner, A., Allmaier, G., 2014. Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup. Anal. Bioanal. Chem. doi:10.1007/s00216-013-7554-1

Grosell, M., Brauner, C.J., Kelly, S.P., McGeer, J.C., Bianchini, A., Wood, C.M., 2002a. Physiological responses to acute silver exposure in the freshwater crayfish (Cambarus diogenes diogenes)—a model invertebrate? Environ. Toxicol. Chem. 21, 369–374.

Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002b. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 133, 287–303. doi:10.1016/S1532-0456(02)00085-6

Grunwald, A., 2005. Nanotechnology—A new field of ethical inquiry? Sci. Eng. Ethics 11, 187–201.

Guerlet, E., Ledy, K., Giambérini, L., 2008. Is the freshwater gammarid, Dikerogammarus villosus, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers? Chemosphere 72, 697–702. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.013

Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H., Jan, K.-Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 213, 66–73. doi:10.1016/j.tox.2005.05.007

Güven, K., Özbay, C., Ünlü, E., Satar, A., 1999. Acute Lethal Toxicity and Accumulation of Copper in Gammarus pulex (L.) (Amphipoda). Tr J Biol. 23, 513–521.

H

Hagger, J.A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M.B., Galloway, T.S., 2010. The influence of seasonality on biomarker responses in Mytilus edulis. Ecotoxicology 19, 953–962. doi:10.1007/s10646-010-0477-0

Hamer, D.H., 1986. Metallothionein1, 2. Annu. Rev. Biochem. 55, 913–951.

Hassellöv, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. Ecotoxicology 17, 344–361. doi:10.1007/s10646-008-0225-x

Heckmann, L.-H., Friberg, N., 2005. Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. Environ. Toxicol. Chem. 24, 582–590.

Hendren, C.O., Badireddy, A.R., Casman, E., Wiesner, M.R., 2013. Modeling nanomaterial fate in wastewater treatment: Monte Carlo simulation of silver nanoparticles (nano-Ag). Sci. Total Environ. 449, 418–425. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.078

Hervant, F., Mathieu, J., Barré, H., Simon, K., Pinon, C., 1997. Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 118, 1277–1283.

Hill, H.G.M., d'Hendecourt, L.B., Perron, C., Jones, A.P., 1997. Infrared spectroscopy of interstellar nanodiamonds from the Orgueil meteorite. Meteorit. Planet. Sci. 32, 713–718.

Hochella, M.F., Lower, S.K., Maurice, P.A., Penn, R.L., Sahai, N., Sparks, D.L., Twining, B.S., 2008. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. Science 319, 1631–1635.

Hochella, M.F., Spencer, M.G., Jones, K.L., 2015. Nanotechnology: nature's gift or scientists' brainchild? Env. Sci Nano 2, 114–119. doi:10.1039/C4EN00145A

Hogstrand, C., Wood, C.M., 1998. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. Environ. Toxicol. Chem. 17, 547–561.

Hoheisel, S.M., Diamond, S., Mount, D., 2012. Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in Daphnia magna and Pimephales promelas. Environ. Toxicol. Chem. 31, 2557–2563.

Holbrook, R.D., Rykaczewski, K., Staymates, M.E., 2014. Dynamics of silver nanoparticle release from wound dressings revealed via in situ nanoscale imaging. J. Mater. Sci. Mater. Med. 25, 2481–2489. doi:10.1007/s10856-014-5265-6

Horion, S., Thomé, J.-P., Gismondi, É., 2015. Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod Gammarus pulex exposed to BDE-47 and BDE-99. Ecotoxicology 24, 959–966. doi:10.1007/s10646-015-1438-4

Huang, J., Bu, L., Xie, J., Chen, K., Cheng, Z., Li, X., Chen, X., 2010. Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iron Oxide Nanoparticles. ACS Nano 4, 7151–7160. doi:10.1021/nn101643u

Huber, D., 2005. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. Small 1, 482–501. doi:10.1002/smll.200500006

Hughes, D.A., 1970. Some Factors Affecting Drift and Upstream Movements of Gammarus Pulex. Ecology 51, 301–305.

Hullmann, A., Meyer, M., 2003. Publications and patents in nanotechnology. Scientometrics 58, 507–527.

Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F., 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrugresistance and bacterial transport. Nature 346, 362–365.

I

Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. Nature 354, 56–58.

ISO, 2015. ISO/TS 80004-2:2015 [WWW Document]. Plateforme Consult. En Ligne OPB. URL https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:fr:sec:2.1

Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in Gammarus fossarum (Crustacea, Amphipoda). Chemosphere 81, 701–710. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.063

J

Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K.A., Vogel, U., Wallin, H. akan, 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chem Cent J 7, 154.

Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J., Oetken, M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran Daphnia magna over six generations. Environ. Pollut. 186, 180–186. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.008

Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A., 2008. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. Acc. Chem. Res. 41, 1578–1586. doi:10.1021/ar7002804

Jiang, P., Li, S.-Y., Xie, S.-S., Gao, Y., Song, L., 2004. Machinable Long PVP-Stabilized Silver Nanowires. Chem. - Eur. J. 10, 4817–4821. doi:10.1002/chem.200400318

Johnson, A.C., Bowes, M.J., Crossley, A., Jarvie, H.P., Jurkschat, K., Jürgens, M.D., Lawlor, A.J., Park, B., Rowland, P., Spurgeon, D., Svendsen, C., Thompson, I.P., Barnes, R.J., Williams, R.J., Xu, N., 2011. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO2 nanoparticles in UK field scenarios. Sci. Total Environ. 409, 2503–2510. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.040

Jomini, S., Clivot, H., Bauda, P., Pagnout, C., 2015. Impact of manufactured TiO2 nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. Environ. Pollut. 202, 196–204. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.022

Jovanović, B., 2015. Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: Developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests: TiO2 nanoparticles phototoxicity. Environ. Toxicol. Chem. 34, 1070–1077. doi:10.1002/etc.2891

K

Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M., 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. Environ. Pollut. 158, 2900–2905.

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

Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H., 2011. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. Environ. Sci. Technol. 45, 3902–3908.

Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977a. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda) Part I. Gammarus pulex-group and related species. Bijdr. Tot Dierkd. 1–97.

Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977b. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part II. Gammarus roeseli-group and related species. Bijdr. Tot Dierkd. 47, 165–196.

Kaur, J., Tikoo, K., 2013. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. Food Chem. Toxicol. 51, 1–14.

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

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967.

Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002a. Predation on mayfly nymph, Baetis rhodani, by native and introduced Gammarus: direct effects and the facilitation of predation by salmonids. Freshw. Biol. 47, 1257–1268. doi:10.1046/j.1365-2427.2002.00864.x

Kelly, D.W., Dick, J.T., Montgomery, W.I., 2002b. The functional role of Gammarus (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia 485, 199–203.

Kennedy, A.J., Hull, M.S., Bednar, A.J., Goss, J.D., Gunter, J.C., Bouldin, J.L., Vikesland, P.J., Steevens, J.A., 2010. Fractionating Nanosilver: Importance for Determining Toxicity to Aquatic Test Organisms. Environ. Sci. Technol. 44, 9571–9577.

Kennedy, A.J., Hull, M.S., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A., 2008. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1932–1941.

Kent, R.D., Oser, J.G., Vikesland, P.J., 2014. Controlled Evaluation of Silver Nanoparticle Sulfidation in a Full-Scale Wastewater Treatment Plant. Environ. Sci. Technol. 48, 8564–8572. doi:10.1021/es404989t

Khosravi, K., Hoque, M.E., Dimock, B., Hintelmann, H., Metcalfe, C.D., 2012. A novel approach for determining total titanium from titanium dioxide nanoparticles suspended in water and biosolids by digestion with ammonium persulfate. Anal. Chim. Acta 713, 86–91. doi:10.1016/j.aca.2011.11.048

Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M., Hochella, M.F., 2010. Discovery and Characterization of Silver Sulfide Nanoparticles in Final Sewage Sludge Products. Environ. Sci. Technol. 44, 7509–7514.

Kim, K.T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.-H., Kim, S.D., 2010. Oxidative stress responses of Daphnia magna exposed to TiO2 nanoparticles according to size fraction. Sci. Total Environ. 408, 2268–2272. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.041

Kim, K.-T., Klaine, S.J., Kim, S.D., 2014. Acute and Chronic Response of Daphnia magna Exposed to TiO2 Nanoparticles in Agitation System. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 456–460. doi:10.1007/s00128-014-1295-5

Kim, K.T., Klaine, S.J., Lin, S., Ke, P.C., Kim, S.D., 2010. Acute toxicity of a mixture of copper and single-walled carbon nanotubes to Daphnia magna. Environ. Toxicol. Chem. 29, 122–126. doi:10.1002/etc.8

Kiser, M.A., Westerhoff, P., Benn, T., Wang, Y., Pérez-rivera, J., Hristovski, K., 2009. Fate of Engineered Nanomaterials in Wastewater Treatment Plants. Environ. Sci. Technol. 43, 6757–6763.

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Koller, M., Epple, M., 2010. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. Chem. Mater. 22, 4548–4554.

Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Carley, S., Handy, R.D., Kapustka, L., Nowack, B., von der Kammer, F., 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. Environ. Toxicol. Chem. 31, 3–14. doi:10.1002/etc.733

Klaper, R., Arndt, D., Setyowati, K., Chen, J., Goetz, F., 2010. Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquat. Toxicol. 100, 211–217. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.023

Kobak, J., Poznańska, M., Kakareko, T., 2012. Behavioural changes of zebra mussel Dreissena polymorpha (Bivalvia) induced by Ponto-Caspian gammarids. Biol. Invasions 14, 1851–1863. doi:10.1007/s10530-012-0197-x

Kobak, J., Żytkowicz, J., 2007. Preferences of invasive Ponto-Caspian and native European gammarids for zebra mussel (Dreissena polymorpha, Bivalvia) shell habitat. Hydrobiologia 589, 43–54. doi:10.1007/s10750-007-0716-4

Kulacki, K.J., Cardinale, B.J., Keller, A.A., Bier, R., Dickson, H., 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. Environ. Toxicol. Chem. 31, 2414–2422. doi:10.1002/etc.1962

Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W., Maniratanachote, R., 2010. Research Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. Part. Fibre Toxicol. 7:8, 1–9.

Künniger, T., Gerecke, A.C., Ulrich, A., Huch, A., Vonbank, R., Heeb, M., Wichser, A., Haag, R., Kunz, P., Faller, M., 2014. Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden façades. Environ. Pollut. 184, 464–471. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.030

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. Gammarus spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205. Springer New York, New York, NY, pp. 1–76.

L

Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., 2010. Aging of TiO2 nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. Environ. Pollut. 158, 3482–3489. doi:10.1016/j.envpol.2010.02.012

Labille, J., Harns, C., Bottero, J.-Y., Brant, J., 2015. Heteroaggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles with Natural Clay Colloids. Environ. Sci. Technol. 49, 6608–6616. doi:10.1021/acs.est.5b00357

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en ecotoxicologies - Aspects fondamentaux, Masson. ed.

Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology 3, 193–208.

Lähteenmäki, S., Slade, E.M., Hardwick, B., Schiffler, G., Louzada, J., Barlow, J., Roslin, T., 2015. MESOCLOSURES - increasing realism in mesocosm studies of ecosystem functioning. Methods Ecol. Evol. 6, 916–924. doi:10.1111/2041-210X.12367

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schnekenburger, J., Wiench, K., Wohlleben, W., 2010. Testing Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety. Adv. Mater. 22, 2601–2627. doi:10.1002/adma.200902658

Lapresta-Fernandez, A., Fernandez, A., Blasco, J., 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. Trends Anal. Chem. 32, 40–59.

Lawrence, A.J., Poulter, C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod Gammarus duebeni. Water Res. 32, 569–578.

Lebrun, J.D., Perret, M., Geffard, A., Gourlay-Francé, C., 2012. Modelling copper bioaccumulation in Gammarus pulex and alterations of digestive metabolism. Ecotoxicology 21, 2022–2030. doi:10.1007/s10646-012-0955-7

Lee, Y.-J., Kim, J., Oh, J., Bae, S., Lee, S., Hong, I.S., Kim, S.-H., 2012. Ion-release kinetics and ecotoxicityeffects of silver nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. 31, 155–159.

Legeay, A., Achard-Joris, M., Baudrimont, M., Massabuau, J.-C., Bourdineaud, J.-P., 2005. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam Corbicula fluminea. Aquat. Toxicol. 74, 242–253. doi:10.1016/j.aquatox.2005.05.015

Legifrance, 2010. Code de l'environnement - Article L523-2.

Liao, D.L., Liao, B.Q., 2007. Shape, size and photocatalytic activity control of TiO2 nanoparticles with surfactants. J. Photochem. Photobiol. Chem. 187, 363–369. doi:10.1016/j.jphotochem.2006.11.003

Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209–245.

Limbach, L.K., Bereiter, R., Müller, E., Krebs, R., Gälli, R., Stark, W.J., 2008. Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. Environ. Sci. Technol. 42, 5828–5833.

Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environ. Sci. Technol. 44, 2169–2175.

Liu, X., Jiang, S., Chen, H., Larson, C.A., Roco, M.C., 2014. Nanotechnology knowledge diffusion: measuring the impact of the research networking and a strategy for improvement. J. Nanoparticle Res. 16. doi:10.1007/s11051-014-2613-x

Lombi, E., Donner, E., Taheri, S., Tavakkoli, E., Jämting, Å.K., McClure, S., Naidu, R., Miller, B.W., Scheckel, K.G., Vasilev, K., 2013. Transformation of four silver/silver chloride nanoparticles during anaerobic treatment of wastewater and post-processing of sewage sludge. Environ. Pollut. 176, 193–197. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.029

Loo, C., Lowery, A., Halas, N., West, J., Drezek, R., 2005. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. Nano Lett. 5, 709–711. doi:10.1021/nl050127s

Losert, S., Hess, A., Ilari, G., von Goetz, N., Hungerbuehler, K., 2015. Online characterization of nano-aerosols released by commercial spray products using SMPS–ICPMS coupling. J. Nanoparticle Res. 17, 1–14. doi:10.1007/s11051-015-3078-2

Lovell, A., 2013. Inventory Finds Increase in Consumer Products Containing Nanoscale Materials- Re-launched inventory seeks input to address scientific uncertainty. [WWW Document]. Sci. Technol. Innov. Program.

Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., 2007. Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). Environ. Sci. Technol. 41, 4465–4470.

Lowry, G.V., Espinasse, B.P., Badireddy, A.R., Richardson, C.J., Reinsch, B.C., Bryant, L.D., Bone, A.J., Deonarine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B.P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E.S., Matson, C.W., Wiesner, M.R., 2012a. Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. Environ. Sci. Technol. 46, 7027–7036. doi:10.1021/es204608d

Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte, S.C., Lead, J.R., 2012b. Transformations of Nanomaterials in the Environment. Environ. Sci. Technol. 46, 6893–6899. doi:10.1021/es300839e

Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB-and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. 294, R1919–R1929.

Luedeking, A., Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel Mytilus edulis. Aquat. Toxicol. 69, 1–10.

Luo, C., Zhang, Y., Zeng, X., Zeng, Y., Wang, Y., 2005. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. J. Colloid Interface Sci. 288, 444–448. doi:10.1016/j.jcis.2005.03.005

Luoma, S.N., 2008. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? (No. PEN 15).

M

MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1999. The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 74, 375–395.

MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater Gammarus spp.(Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 72, 349–364.

Ma, H., Brennan, A., Diamond, S.A., 2012. Phototoxicity of TiO2 nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: Daphnia magna and Japanese medaka. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1621–1629. doi:10.1002/etc.1858

Maltby, L., 1994. Stress, shredders and streams: using Gammarus energetics to assess water quality. Freshw. Biol. Assoc. 98–110.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels Mytilus edulis collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat. Toxicol. 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.003

Mansfield, C.M., Alloy, M.M., Hamilton, J., Verbeck, G.F., Newton, K., Klaine, S.J., Roberts, A.P., 2015. Photo-induced toxicity of titanium dioxide nanoparticles to Daphnia magna under natural sunlight. Chemosphere 120, 206–210. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.075

Marambio-Jones, C., Hoek, E.M., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanoparticle Res. 12, 1531–1551.

Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. Anal. Chem. 85, 3036–3049. doi:10.1021/ac303636s

Mayer, G., Maas, A., Waloszek, D., 2012. Mouthpart Morphology of Three Sympatric Native and Nonnative Gammaridean Species: Gammarus pulex, G. fossarum, and Echinogammarus berilloni (Crustacea: Amphipoda). Int. J. Zool. 2012, 1–23. doi:10.1155/2012/493420

McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988. Use of Gammarus pulex (L.) in Safety Evaluation Tests: Culture and Selectionof a Sensitive Life Stage. Ecotoxicol. Environ. Saf. 15, 245–252.

McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2085–2092.

Menard, A., Drobne, D., Jemec, A., 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO2. Review of in vivo data. Environ. Pollut. 159, 677–684. doi:10.1016/j.envpol.2010.11.027

Meyran, J.-C., Gielly, L., Taberlet, P., 1998. Environmental calcium and mitochondrial DNA polumorphism among local populations of Gammarus fossarum (Crustacea, Amphipoda). Mol. Ecol. 7, 1391–1400.

Meyran, J.-C., Monnerot, M., Taberlet, P., 1997. Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus Gammarus (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 8, 1–10.

Mitrano, D.M., Ranville, J.F., Bednar, A., Kazor, K., Hering, A.S., Higgins, C.P., 2014. Tracking dissolution of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations in laboratory, natural, and processed waters using single particle ICP-MS (spICP-MS). Environ. Sci. Nano 1, 248. doi:10.1039/c3en00108c

Mitrano, D.M., Rimmele, E., Wichser, A., Erni, R., Height, M., Nowack, B., 2014. Presence of Nanoparticles in Wash Water from Conventional Silver and Nano-silver Textiles. ACS Nano 8, 7208–7219. doi:10.1021/nn502228w

Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol. Adv. 31, 346–356. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.003

Mnyusiwalla, A., Daar, A.S., Singer, P.A., 2003. “Mind the gap”: science and ethics in nanotechnology. Nanotechnology.

Mohammadikish, M., Davar, F., Loghman-Estarki, M.R., 2015. Various morphologies of nano/micro PbS via green hydrothermal method. J. Mater. Sci. Mater. Electron. 26, 2937–2946. doi:10.1007/s10854-015-2780-2

Moniruzzaman, M., Winey, K.I., 2006. Polymer Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes. Macromolecules 39, 5194–5205. doi:10.1021/ma060733p

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 552, 247–268. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16, 2346–2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059

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

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, É., Gauthier, L., 2009. Écotoxicité des nanotubes de carbone dans l’environnement: contexte et état de l’art. Environ. Risques Santé 8, 47–55.

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

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

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

Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environ. Sci. Technol. 42, 4447–4453.

Muscat, J., Swamy, V., Harrison, N.M., 2002. First-principles calculations of the phase stability of TiO2. Phys. Rev. B 65. doi:10.1103/PhysRevB.65.224112

Mwangi, J.N., Wang, N., Ingersoll, C.G., Hardesty, D.K., Brunson, E.L., Li, H., Deng, B., 2012. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1823–1830. doi:10.1002/etc.1888

N

Narayanan, K.B., Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv. Colloid Interface Sci. 156, 1–13. doi:10.1016/j.cis.2010.02.001

National Science Foundation, 2014. Market report on emerging nanotechnology now available [WWW Document]. Natl. Sci. Found. Discov. Begin. URL http://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=130586&org=NSF (accessed 10.6.15).

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372–386.

Navel, S., Simon, L., Lécuyer, C., Fourel, F., Mermillod-Blondin, F., 2011. The shredding activity of gammarids facilitates the processing of organic matter by the subterranean amphipod Niphargus rhenorhodanensis. Freshw. Biol. 56, 481–490.

Naylor, C., Pindar, L., Calow, P., 1990. Inter- and intraspecifc variation in sensitivity to toxins; The effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans Asellus aquaticus (L.) and Gammarus pulex (L.). Water Res. 24, 757–762.

Ni, M., Leung, M.K.H., Leung, D.Y.C., Sumathy, K., 2007. A review and recent developments in photocatalytic water-splitting using TiO2 for hydrogen production. Renew. Sustain. Energy Rev. 11, 401–425. doi:10.1016/j.rser.2005.01.009

Nohynek, G.J., Dufour, E.K., Roberts, M.S., 2008. Nanotechnology, Cosmetics and the Skin : Is there a health risk? Skin Pharmacol. Physiol. 21, 136–149.

Nohynek, G.J., Lademann, J., Ribaud, C., Roberts, M.S., 2007. Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety. Crit. Rev. Toxicol. 37, 251–277. doi:10.1080/10408440601177780

Noss, C., Dabrunz, A., Rosenfeldt, R.R., Lorke, A., Schulz, R., 2013. Three-Dimensional Analysis of the Swimming Behavior of Daphnia magna Exposed to Nanosized Titanium Dioxide. PLoS ONE 8, e80960. doi:10.1371/journal.pone.0080960

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

Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A.A., Klaine, S.J., 2012. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. Environ. Toxicol. Chem. 31, 50–59.

O

O'Dowd, C.D., Smith, M.H., Consterdine, I.E., Lowe, J.A., 1997. Marine aerosol, sea-salt, and the marine sulphur cycle : a short review. Atmos. Environ. 31, 73–80.

Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. Mar. Biol. 27–36.

Ozgul Ozalp, F., Kutlu, M., Iscan, A., 2011. The Effects of Thallium Acetate on Hepatopancreatic Cells of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda). Ekoloji 20, 15–20. doi:10.5053/ekoloji.2011.813

P

Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P., 2012. Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward Escherichia coli. Colloids Surf. B Biointerfaces 92, 315–321. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.012

Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaut, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. Aquat. Toxicol. 155, 52–61. doi:10.1016/j.aquatox.2014.06.008

Pain, S., Devin, S., Parant, M., 2007. Biomarker versus environmental factors: Seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. Sci. Total Environ. 373, 103–112.

Pain, S., Parant, M., 2003. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. C. R. Biol. 326, 659–672.

Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06

Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevěčná, T., Zbořil, R., 2006. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. J. Phys. Chem. B 110, 16248–16253. doi:10.1021/jp063826h

Pantani, C., Pannunzio, G., De Cristofaro, M., Novelli, A.A., Salvatori, M., 1997. Comparative acute toxicity of some pesticides, metals, and surfactants to Gammarus italicus Goedm. and Echinogammarus tibaldii Pink. and Stock (Crustacea: Amphipoda). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59, 963–967.

Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R., Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J.-P., Peither, A., Neumeier, B., Velletti, A.-R., 2000. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. Water Res. 34, 2323–2329.

Peeters, E.T., Gardeniers, J.J.P., 1998. Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids. Freshw. Biol. 39, 605–615.

Perelaer, J., Hendriks, C.E., de Laat, A.W.M., Schubert, U.S., 2009. One-step inkjet printing of conductive silver tracks on polymer substrates. Nanotechnology 20, 1–5. doi:10.1088/0957-4484/20/16/165303

Perera, S., Bhushan, B., Bandara, R., Rajapakse, G., Rajapakse, S., Bandara, C., 2013. Morphological, antimicrobial, durability, and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 436, 975–989.

Peretyazhko, T.S., Zhang, Q., Colvin, L., 2014. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. Environ. Sci. Technol. 48, 11954–11961.

Petersen, E.J., Akkanen, J., Kukkonen, J.V., Weber Jr, W.J., 2009. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by Daphnia magna. Environ. Sci. Technol. 43, 2969–2975.

Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O'Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., Chen, K.L., 2011. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. Environ. Sci. Technol. 45, 9837–9856. doi:10.1021/es201579y

Piccapietra, F., Allué, C.G., Sigg, L., Behra, R., 2012. Intracellular Silver Accumulation in Chlamydomonas reinhardtii upon Exposure to Carbonate Coated Silver Nanoparticles and Silver Nitrate. Environ. Sci. Technol. 46, 7390–7397. doi:10.1021/es300734m

Plyuto, Y., Berquier, J.-M., Jacquiod, C., Ricolleau, C., 1999. Ag nanoparticles synthesised in template-structured mesoporous silica films on a glass substrate. Chem Commun 1653–1654.

Pöckl, M., 1992. Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods Gammarus fossarum and G. roeseli. Freshw. Biol. 27, 211–225.

Pöckl, M., Webb, B.W., Sutcliffe, D.W., 2003. Life history and reproductive capacity of Gammarus fossarum and G. roeseli (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. Freshw. Biol. 48, 53–66.

Pourzahedi, L., Eckelman, M.J., 2015. Environmental Life Cycle Assessment of Nanosilver-Enabled Bandages. Environ. Sci. Technol. 49, 361–368. doi:10.1021/es504655y

R

Rafols, I., Porter, A.L., Leydesdorff, L., 2010. Science overlay maps: A new tool for research policy and library management. J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol. 61, 1871–1887. doi:10.1002/asi.21368

Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Toxicol. Chem. 18, 89–108.

Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S.L., 2003. Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. 125, 13940–13941. doi:10.1021/ja029267j

Rejeski, D., 2009. CPSC FY2010 Agenda and Priorities, Consumer Product Safety Commission [WWW Document]. URL https://www.recalls.gov/PageFiles/90427/2011priorities.pdf (accessed 6.7.15).

Reyes-Coronado, D., Rodríguez-Gattorno, G., Espinosa-Pesqueira, M.E., Cab, C., de Coss, R., Oskam, G., 2008. Phase-pure TiO2 nanoparticles: anatase, brookite and rutile. Nanotechnology 19, 145605–145615. doi:10.1088/0957-4484/19/14/145605

Rezic, I., 2011. Determination of engineered nanoparticles on textiles and in textile wastewaters. Trends Anal. Chem. 30, 1159–1167. doi:10.1016/j.trac.2011.02.017

Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J.P., Soares, A.M.V.M., 1999. Novel Bioassay Based on Acetylcholinesterase and Lactate Dehydrogenase Activities to Evaluate the Toxicity of Chemicals to Soil Isopods. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 287–293. doi:10.1006/eesa.1999.1837

Ricciardi, A., Rasmussen, J.B., 1998. Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55, 1759–1765. doi:10.1139/cjfas-55-7-1759

Riu, J., Maroto, A., Rius, F., 2006. Nanosensors in environmental analysis. Talanta 69, 288–301. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.045

Rocha, T.L., Gomes, T., Sousa, V.S., Mestre, N.C., Bebianno, M.J., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. Mar. Environ. Res. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.013

Roco, M.C., 2011. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. J. Nanoparticle Res. 13, 427–445. doi:10.1007/s11051-010-0192-z

Roussel, H., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., 2008. Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. Environ. Toxicol. Chem. 27, 637–644.

S

Sargent, J.F., 2014. The National Nanotechnology Initiative: Overview, Reauthorization, and Appropriations Issues (CRS Report), Congressional Research Service. The National Nanotechnology Initiative.

Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S.W., Cho, C.-W., Kim, S., Yun, Y.-S., 2009. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. Colloids Surf. B Biointerfaces 73, 332–338. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.06.005

Schmidlin, L., von Fumetti, S., Nagel, P., 2015a. Temperature effects on the feeding and electron transport system (ETS) activity of Gammarus fossarum. Aquat. Ecol. 49, 71–80. doi:10.1007/s10452-015-9505-8

Schmidlin, L., von Fumetti, S., Nagel, P., 2015b. Effects of increased temperatures on Gammarus fossarum under the influence of copper sulphate. Ecotoxicology 24, 433–444. doi:10.1007/s10646-014-1392-6

Schmidlin, L., von Fumetti, S., Nagel, P., 2015c. Copper sulphate reduces the metabolic activity of Gammarus fossarum in laboratory and field experiments. Aquat. Toxicol. 161, 138–145. doi:10.1016/j.aquatox.2015.02.005

Schmidt, W., Power, E., Quinn, B., 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (Mytilus spp.). Mar. Pollut. Bull. 74, 50–55. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.033

Schmoll, P., 2007. L'invention du risque nanotechnologique. Rev. Sci. Soc. Le risque. Entre fascination et précaution, 182–187.

Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Schlager, J.J., Dai, L., Hussain, S.M., 2008. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? Nanotechnology 19, 235104–235117. doi:10.1088/0957-4484/19/23/235104

Schummer, J., 2006. Cultural diversity in nanotechnology ethics. Interdiscip. Sci. Rev. 31, 217–230. doi:10.1179/030801806X113757

Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., others, 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicol. Sci. 115, 521–534.

Seitz, F., Rosenfeldt, R.R., Schneider, S., Schulz, R., Bundschuh, M., 2014. Size-, surface- and crystalline structure composition-related effects of titanium dioxide nanoparticles during their aquatic life cycle. Sci. Total Environ. 493, 891–897. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.092

Sharma, V.K., Yngard, R.A., Lin, Y., 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Adv. Colloid Interface Sci. 145, 83–96. doi:10.1016/j.cis.2008.09.002

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 123, 193–199.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Part Fibre Toxicol 10, 1–33.

Shi, L., Shan, J., Ju, Y., Aikens, P., Prud'homme, R.K., 2012. Nanoparticles as delivery vehicles for sunscreen agents. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 396, 122–129. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.053

Simcic, T., Brancelj, A., 2006. Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in Gammarus fossarum, Asellus aquaticus and Niphargus sphagnicolus. Freshw. Biol. 51, 686–694. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01522.x

Simcic, T., Lukancic, S., Brancelj, A., 2005. Comparative study of electron transport system activity and oxygen consumption of amphipods from caves and surface habitats. Freshw. Biol. 50, 494–501. doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01339.x

Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., Kurelec, B., 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 126, 175–186.

Smith, C., Shaw, B., Handy, R., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquat. Toxicol. 82, 94–109. doi:10.1016/j.aquatox.2007.02.003

Sobolev, K., Gutiérrez, M.F., 2005. How nanotechnology can change the concrete world. Am. Ceram. Soc. Bull. 84, 14.

Som, C., Wick, P., Krug, H., Nowack, B., 2011. Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. Environ. Int. 37, 1131–1142. doi:10.1016/j.envint.2011.02.013

Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of Gammarus roeseli (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. Environ. Pollut. 158, 1288–1295.
Sornom, P., Gismondi, E., Vellinger, C., Devin, S., Férard, J.-F., Beisel, J.-N., 2012. Effects of Sublethal Cadmium Exposure on Antipredator Behavioural and Antitoxic Responses in the Invasive Amphipod Dikerogammarus villosus. PLoS ONE 7, e42435. doi:10.1371/journal.pone.0042435
Sroda, S., 2010. Développement d'une batterie de biomarqueurs chez différentes espèces de gammares d'eau douce : Gammarus roeseli, Gammarus fossarum et Dikerogammarus villosus. Université de Metz.
Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? Ecotoxicology 20, 264–273. doi:10.1007/s10646-010-0578-9
Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2010. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater.pdf.
Stebounova, L.V., Guio, E., Grassian, V.H., 2011. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. J. Nanoparticle Res. 13, 233–244.
Stewart, T.W., Haynes, J.M., 1994. Benthic Macroinvertebrate Communities of Southwestern Lake Ontario Following Invasion of Dreissena. J Gt. Lakes Res 20, 479–493.
Stix, G., 2001. Little big science. Sci. Am. 285, 26–31.
Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environ. Pollut. 185, 69–76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004
Sun, Y., Xia, Y., 2002. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. Science 298, 2176–2179.
Sutcliffe, D.W., 2010. Reproduction in Gammarus (Crustacea, Amphipoda): basic processes, in: Freshwater Forum.
Sutcliffe, D.W., 1984. Quantitative aspects of oxygen uptake by Gammarus (Crustacea, Amphipoda): a critical review. Freshw. Biol. 14, 443–489.

T

Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. Invertébrés d'eau douce-systématique, biologie, écologie, CNRS Editions. ed.
Tay, B.Y., Edirisinghe, M.J., 2002. Dispersion and stability of silver inks. J. Mater. Sci. 37, 4653–4661.
Taylor, D.A., 2002. Dust in the wind. Environ. Health Perspect. 110, A80.
Taylor, E.J., Maund, S.J., Pascoe, D., 1991. Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebratesChironomus riparius Meigen (Insecta: Diptera) andGammarus pulex (L.)(Crustacea: Amphipoda). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 371–376.
Taylor, E.J., Rees, E.M., Pascoe, D., 1994. Mortality and a drift-related response of the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.) exposed to natural sediments, acidification and copper. Aquat. Toxicol. 29, 83–101.
Taylor, E.., Maund, S.J., Bennett, D., Pascoe, D., 1994. Effects of 3,4-Dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. Ecotoxicol. Environ. Saf. 29, 80–85.
Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2014. Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. Environ. Sci. Technol. 48, 9004–9013. doi:10.1021/es501641b
Teuben, A., Verhoef, H.A., 1992. Relevance of micro- and mesocosm experiments for studying soil ecosystem processes. Soil Biol. Biochem. 24, 1179–1183.

The Project on Emerging Nanotechnologies, n.d. Analysis: This is the first publicly available on-line inventory of nanotechnology-based consumer products. [WWW Document]. URL http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/

Thostenson, E.T., Ren, Z., Chou, T.-W., 2001. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. Compos. Sci. Technol. 61, 1899–1912.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Bedulina, D.S., Menzel, R., Steinberg, C.E.W., 2007. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods Eulimnogammarus cyaneus and E. verrucosus. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 146, 496–503. doi:10.1016/j.cbpb.2006.11.017

Tolaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P., Suidan, M., 2010. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. Sci. Total Environ. 408, 999–1006. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.003

Toman, M.J., Dall, P.C., 1998. Respiratory levels and adaptations in four freshwater species of Gammarus (Crustacea: Amphipoda). Int. Rev. Hydrobiol. 83, 251–263

V

Väinölä, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K., Sket, B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia 595, 241–255.

Van Dokkum, H.P., Slijkerman, D.M.E., Rossi, L., Costantini, M.L., 2002. Variation in the decomposition of Phragmites australis litter in a monomictic lake: the role of gammarids. Hydrobiologia 482, 69–77.

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environ. Int. 28, 711–717.

Vellinger, C., 2012. Effets d'expositions métalliques simples ou multiples à différentes températures chez Gammarus pulex: Approche multi-marqueurs et perspectives en bioévaluation. Université de Lorraine.

Vellinger, C., Gismondi, E., Felten, V., Rousselle, P., Mehennaoui, K., Parant, M., Usseglio-Polatera, P., 2013. Single and combined effects of cadmium and arsenate in Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses. Aquat. Toxicol. 140-141, 106–116. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.010

Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., 2012. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (Gammarus pulex). Environ. Pollut. 160, 66–73.

Véron, O., Blondeau, J.-P., Meneses, D., Vignolle, C.A., 2013. Characterization of silver or copper nanoparticles embedded in Soda-lime glass after a staining process. Surf. Coat. Technol. 48–57.

Vidal, M.-L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of Corbicula fluminea (Müller). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 131, 133–151.

von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. Environ. Toxicol. Chem. 31, 32–49. doi:10.1002/etc.723

W

Wadhera, A., Fung, M., 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver [WWW Document]. Dermatol. Online J. URL https://escholarship.org/uc/item/0832g6d3&rct (accessed 8.13.15).

Wallace, J.B., Webster, J.R., 1996. The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. Annu. Rev. Entomol. 41, 115–139.

Wallace, J.B., Webster, J.R., Cuffney, T.F., 1982. Stream detritus dynamics: regulation by invertebrate consumers. Oecologia 53, 197–200.

Walser, T., Demou, E., Lang, D.J., Hellweg, S., 2011. Prospective Environmental Life Cycle Assessment of Nanosilver T-Shirts. Environ. Sci. Technol. 45, 4570–4578. doi:10.1021/es2001248

Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Wang, X., Ding, S., 2005. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. Mater. Chem. Phys. 94, 449–453.

Wang, J., 2005. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. Electroanalysis 17, 7–14.

Wang, Z.L., 2000. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. J. Phys. Chem. B 104, 1153–1175. doi:10.1021/jp993593c

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N., 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. Environ. Sci. Technol. 46, 2242–2250. doi:10.1021/es204168d

Welch, C.M., Compton, R.G., 2006. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. Anal. Bioanal. Chem. 384, 601–619. doi:10.1007/s00216-005-0230-3

Westram, A.M., Jokela, J., Keller, I., 2013. Hidden Biodiversity in an Ecologically Important Freshwater Amphipod: Differences in Genetic Structure between Two Cryptic Species. PLoS ONE 8, e69576. doi:10.1371/journal.pone.0069576

Whitesides, G.M., 2003. The'right'size in nanobiotechnology. Nat. Biotechnol. 21, 1161–1165.

Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., Landsiedel, R., 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO2 and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate Daphnia magna. Chemosphere 76, 1356–1365. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.025

Wijnhoven, S., Van Riel, M.C., Van der Velde, G., 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. Aquat. Ecol. 37, 151–158.

Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B., Xia, Y., 2005. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. Chem. - Eur. J. 11, 454–463. doi:10.1002/chem.200400927

Wood, C.M., Playle, R.C., Hogstrand, C., 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. Environ. Toxicol. Chem. 18, 71–83.

X

Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., Nel, A.E., 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett. 6, 1794–1807. doi:10.1021/nl061025k

Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W., 2011. Effects of nano-scale TiO2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. Sci. Total Environ. 409, 1444–1452. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.015

Z

Zhang, H., Banfield, J.F., 2000. Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior during Growth of Nanocrystalline Aggregates: Insights from TiO_2. J. Phys. Chem. B 104, 3481–3487. doi:10.1021/jp000499j

Zhang, S., 2003. Building from the bottom up. Mater. Today 6, 20–27.

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO2 nanoparticle aggregates in Daphnia magna. Chemosphere 78, 209–215. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.013

Zubrod, J.P., Baudy, P., Schulz, R., Bundschuh, M., 2014. Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder< i> Gammarus fossarum</i>. Aquat. Toxicol. 150, 133–143.

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Feckler, A., Englert, D., Schulz, R., 2011. Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. Environ. Toxicol. Chem. 30, 2718–2724.

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Schulz, R., 2010. Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of< i> Gammarus fossarum</i>(Crustacea; Amphipoda). Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1674–1680.

ANNEXES

Annexe 1 : Données physicochimiques des cours d'eau étudiés : qualité générale et données élémentaires de conductivité et de matière en suspension de 2005 à 2013. Données acquises via l'agence de l'eau Rhin-Meuse et disponibles sur la plateforme S.I.E.R.M. (Système d'information sur l'Eau Rhin-Meuse).

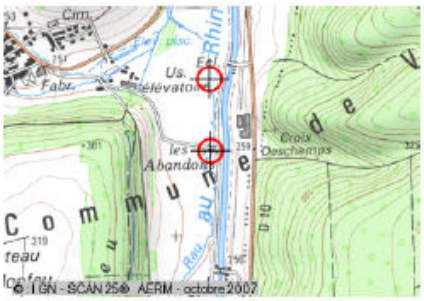
http://rhin-meuse.eaufrance.fr/qualit-coursdeau

- A : Descriptif de la Méholle à Void-vacon
- B : Descriptif de la Nied Française à Lemud
- C : Descriptif de la Nied Française à Baudrecourt
- D : Descriptif de la Seille à Metz

A : Descriptif de la Méholle à Void-vacon

LA MEHOLLE À VOID-VACON (02107900)

Descriptif de la station



Coordonnées (x,y, L93)-PK:	892258 m, 6843657 m - - Ruisseau la Meholle
Commune (Insee, Nom):	(55573)VOID-VACON
Classe de dureté:	Classe 5
Catégorie piscicole:	Première catégorie
Exception typologique:	
Code hydrographique Masse d'eau:	B211030C - MEHOLLE (FRB1R507)
Réseau(x) d'appartenance:	0200000009 - RNB RM (01/01/1997-31/12/2006) 0200000040 - RERRM (01/01/2005-31/12/2008) 0200000047 - RSPL (01/01/2003-31/12/2006) 0200000054 - RCSRMDR-CE (01/01/2012- En cours) 0200000055 - RCSRMDM-CE (01/01/2007- En cours) 0200000059 - RSPRM (01/01/2007- En cours) 0200000062 - RIERM-CE (19/09/2005- En cours) 0200000092 - RRESUPNLOR (21/09/2009- En cours)
Suivis réalisés:	Mesures Qualité SEQ-EAU QSUP Mesures hydro-piscicoles Mesures hydrobio Diatomées Mesures hydrobio Invertébrés Mesures phys-chim-µbio-µp QSUP

la meholle À void-vacon

Fiche de synthèse :

Qualité Générale
Paramètres

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Qualité Générale	1A	1B	1A	2	1B	1B	1B	1A
• O2 dissous % (percentile 90)	92	84	91	76	87	83	70	91
• O2 dissous mini. en mg/l	9,6	9,4	9,9	7,9	9,1	8,8	7,3	10
• DBO5 (percentile 90)	0,8	2	2,3	5,9	2,1	1,7	1,8	1,6
• DCO (percentile 90)	6	8	7	12	8	9	6	7
• NH4+ (percentile 90)	0,05	0,04	0,05	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05

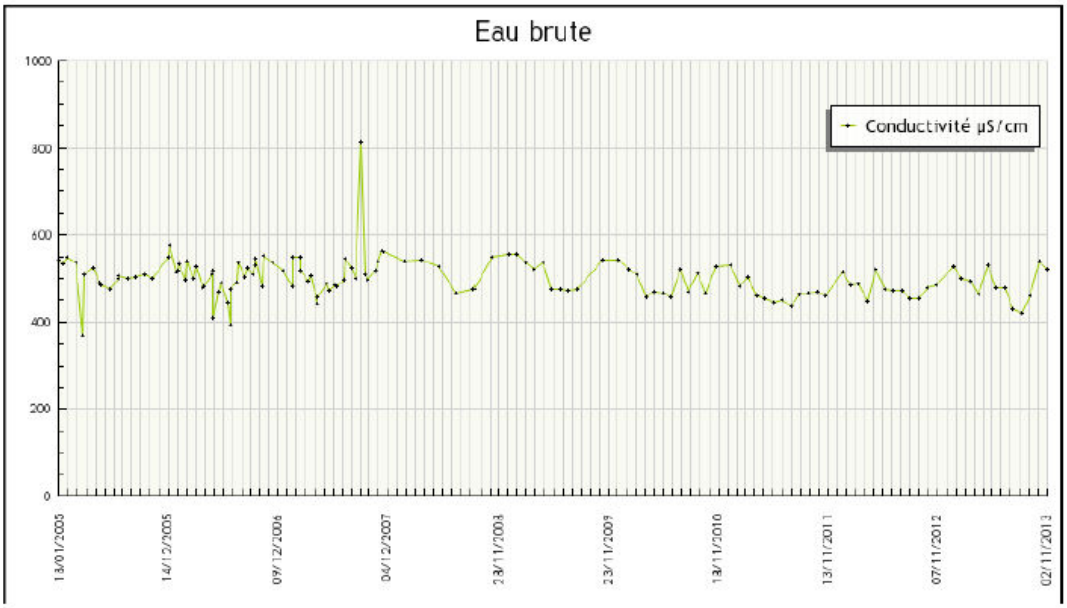
Légende

Classe de qualité	Qualité Générale	Oxygène dissous en mg/l	Oxygène dissous en % de saturation	DBO5 en mg/l d'O2	DCO en mg/l d'O2	NH4+ en mg/l
Très bonne	1A	>= 7	>=90	<=3	<=20	<=0,1
Bonne	1B	5 à 7	70 à 90	3 à 5	20 à 25	0,1 à 0,5
Passable	2	3 à 5	50 à 70	5 à 10	25 à 40	0,5 à 2
Mauvaise	3	Milieu à maintenir aérobie en permanence		10 à 25	40 à 80	2 à 8
Pollution excessive	M	Observation de Milieu anaérobie		>25	>80	>8

LA MEHOLLE À VOID-VACON(02107900)

Choix du paramètre Conductivité
Choix du support Eau brute

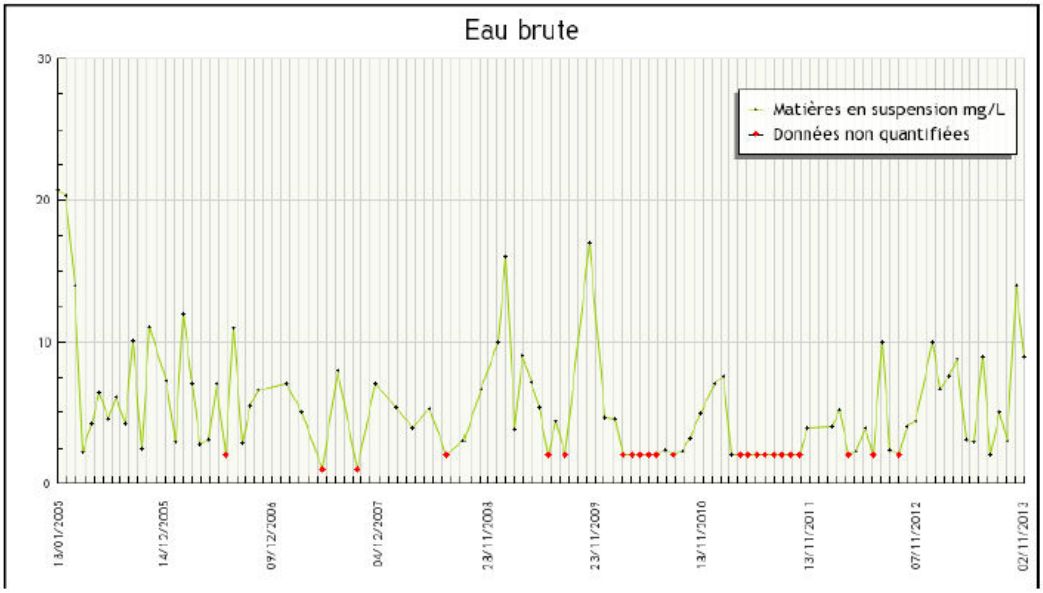
Données élémentaires



LA MEHOLLE À VOID-VACON(02107900)

Choix du paramètre Matières en suspension
Choix du support Eau brute

Données élémentaires



B : Descriptif de la Nied Française à Lemud

LA NIED FRANCAISE À LEMUD (02104800)

Descriptif de la station

Coordonnées (x,y, L93)-PK:	946303 m, 6887420 m - - La Nied Francaise
Commune (Insee, Nom):	(57055)BAZONCOURT
Classe de dureté:	Classe 5
Catégorie piscicole:	Deuxième catégorie
Exception typologique:	
Code hydrographique Masse d'eau:	A973012A - NIED FRANCAISE 2 (FRCR417)
Réseau(x) d'appartenance:	0200000009 - RNB RM (01/01/1991-31/12/2006) 0200000059 - RSPRM (01/01/2007- En cours) 0200000063 - RCORMDR-CE (01/01/2014- En cours) 0200000074 - REIRM-CE (01/01/2013-31/12/2013) 0200000092 - RRESUPNLOR (01/01/2015- En cours)
Suivis réalisés:	Mesures Qualité SEQ-EAU QSUP Mesures hydrobio Diatomées Mesures hydrobio Invertébrés Mesures phys-chim-µbio-µp QSUP

la nied francaise À lemud

Fiche de synthèse :

Qualité Générale
Paramètres

	2006	2009	2010	2011	2012	2013
Qualité Générale	2	1B	2	2	2	2
• O2 dissous % (percentile 90)	64	72	56	64	55	69
• O2 dissous mini. en mg/l	5,7	7,6	5,3	6	5,7	6,8
• DBO5 (percentile 90)	3,6	3,2	3,4	3,3	2,8	3,3
• DCO (percentile 90)	19	23	21	13	35	24
• NH4+ (percentile 90)	0,32	0,18	0,41	0,21	0,72	0,21

Légende

Classe de qualité	Qualité Générale	Oxygène dissous en mg/l	Oxygène dissous en % de saturation	DBO5 en mg/l d'O2	DCO en mg/l d'O2	NH4+ en mg/l
Trés bonne	1A	>= 7	>=90	<=3	<=20	<=0,1
Bonne	1B	5 à 7	70 à 90	3 à 5	20 à 25	0,1 à 0,5
Passable	2	3 à 5	50 à 70	5 à 10	25 à 40	0,5 à 2
Mauvaise	3	Milieu à maintenir aérobie en permanence		10 à 25	40 à 80	2 à 8
Pollution excessive	M	Observation de Milieu anaérobie		>25	>80	>8

LA NIED FRANCAISE À LEMUD(02104800)

Choix du paramètre Conductivité
Choix du support Eau brute

Données élémentaires

LA NIED FRANCAISE À LEMUD(02104800)

Choix du paramètre Matières en suspension
Choix du support Eau brute

Données élémentaires

C : Descriptif de la Nied Française à Baudrecourt

LA NIED FRANCAISE À BAUDRECOURT (02104400)

Descriptif de la station

Coordonnées (x,y, L93)-PK:	952460 m, 6878837 m - - La Nied Francaise
Commune (Insee, Nom):	(57054)BAUDRECOURT
Classe de dureté:	Classe 5
Catégorie piscicole:	Deuxième catégorie
Exception typologique:	
Code hydrographique Masse d'eau:	A970012A - NIED FRANCAISE 1 (FRCR416)
Réseau(x) d'appartenance:	0200000009 - RNB RM (01/01/1991-31/12/2006) 0200000058 - RESALTT (01/01/1991- En cours) 0200000063 - RCORMDR-CE (01/01/2007- En cours) 0200000074 - REIRM-CE (01/01/2013-31/12/2013) 0200000092 - RRESUPNLOR (21/09/2009- En cours)
Suivis réalisés:	Mesures Qualité SEQ-EAU QSUP Mesures hydrobio Diatomées Mesures hydrobio Invertébrés Mesures phys-chim-µbio-µp QSUP

Fiche de synthèse :

Qualité Générale
Paramètres

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Qualité Générale	2	1B	1B	2	2	2	2	2
• O2 dissous % (percentile 90)	59	77	77	69	68	55	66	70
• O2 dissous mini. en mg/l	5,5	7,6	7,5	5,9	6,8	5,2	6,8	5,2
• DBO5 (percentile 90)	2,4	3,9	3,1	4	2,4	2,2	2,1	3,3
• DCO (percentile 90)	15	14	22	25	17	11	10	38
• NH4+ (percentile 90)	0,16	0,11	0,22	0,14	0,16	0,11	0,1	0,1

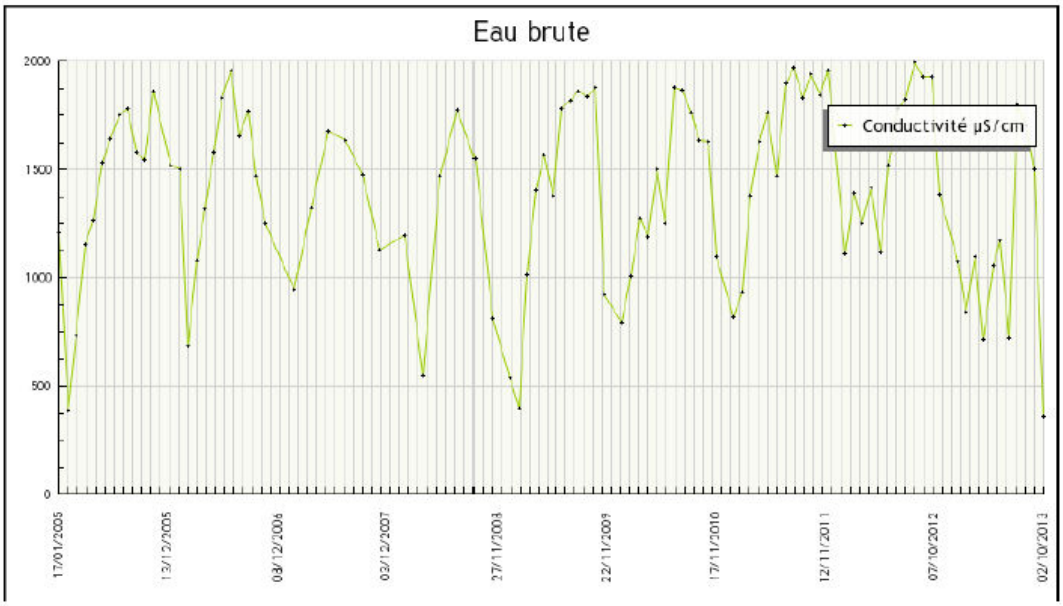
Légende

Classe de qualité	Qualité Générale	Oxygène dissous en mg/l	Oxygène dissous en % de saturation	DBO5 en mg/l d'O2	DCO en mg/l d'O2	NH4+ en mg/l
Trés bonne	1A	>= 7	>=90	<=3	<=20	<=0,1
Bonne	1B	5 à 7	70 à 90	3 à 5	20 à 25	0,1 à 0,5
Passable	2	3 à 5	50 à 70	5 à 10	25 à 40	0,5 à 2
Mauvaise	3	Milieu à maintenir aérobie en permanence		10 à 25	40 à 80	2 à 8
Pollution excessive	M	Observation de Milieu anaérobie		>25	>80	>8

LA NIED FRANCAISE À BAUDRECOURT(02104400)

Choix du paramètre Conductivité
Choix du support Eau brute

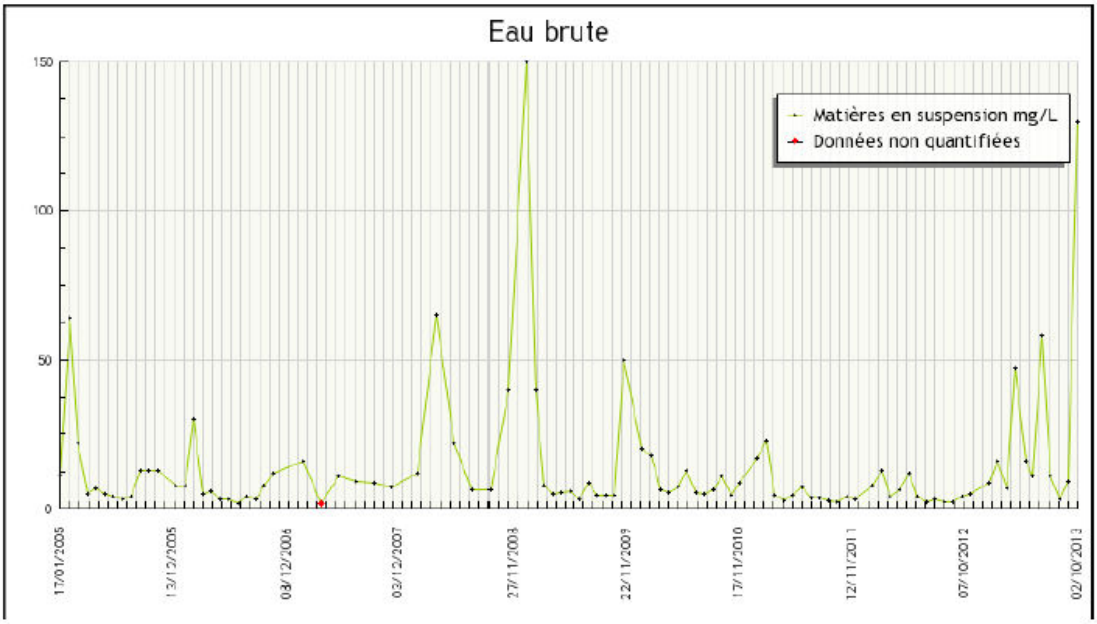
Données élémentaires



LA NIED FRANCAISE À BAUDRECOURT(02104400)

Choix du paramètre Matières en suspension
Choix du support Eau brute

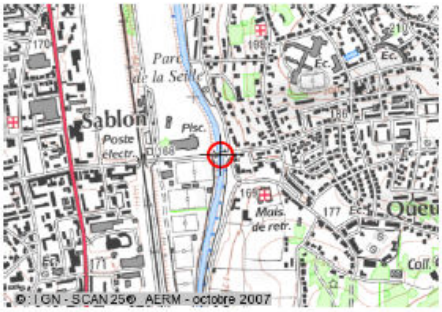
Données élémentaires



D : Descriptif de la Seille à Metz

LA SEILLE À METZ (02082900)

Descriptif de la station



Coordonnées (x,y, L93)-PK:	932760 m, 6893669 m - - La Seille
Commune (Insee, Nom):	(57463)METZ
Classe de dureté:	Classe 5
Catégorie piscicole:	Deuxième catégorie
Exception typologique:	
Code hydrographique Masse d'eau:	A788010A - SEILLE 4 (FRCR335)
Réseau(x) d'appartenance:	0200000009 - RNB RM (01/01/1971-31/12/2006) 0200000058 - RESALTT (01/01/1971- En cours) 0200000059 - RSPRM (01/01/2007- En cours) 0200000063 - RCORMDR-CE (01/01/2014- En cours) 0200000092 - RRESUPNLOR (21/09/2009- En cours)
Suivis réalisés:	Mesures Qualité SEQ-EAU QSUP Mesures hydrobio Diatomées Mesures hydrobio Invertébrés Mesures phys-chim-µbio-µp QSUP

la seille À metz

Fiche de synthèse :

Qualité Générale
Paramètres

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Qualité Générale	2	2	3	2	1B	2	2	2
• O2 dissous % (percentile 90)	83	86	81	59	79	71	64	78
• O2 dissous mini. en mg/l	6,2	7,7	7,3	5,1	6,1	7,3	5,9	8,1
• DBO5 (percentile 90)	4,3	5,6	8	5,6	3,6	5,6	3,9	3,2
• DCO (percentile 90)	37	33	54	33	24	32	23	26
• NH4+ (percentile 90)	0,46	0,28	0,6	0,29	0,36	0,25	0,48	0,14

Légende

Classe de qualité	Qualité Générale	Oxygène dissous en mg/l	Oxygène dissous en % de saturation	DBO5 en mg/l d'O2	DCO en mg/l d'O2	NH4+ en mg/l
Trés bonne	1A	>= 7	>=90	<=3	<=20	<=0,1
Bonne	1B	5 à 7	70 à 90	3 à 5	20 à 25	0,1 à 0,5
Passable	2	3 à 5	50 à 70	5 à 10	25 à 40	0,5 à 2
Mauvaise	3	Milieu à maintenir aérobie en permanence		10 à 25	40 à 80	2 à 8
Pollution excessive	M	Observation de Milieu anaérobie		>25	>80	>8

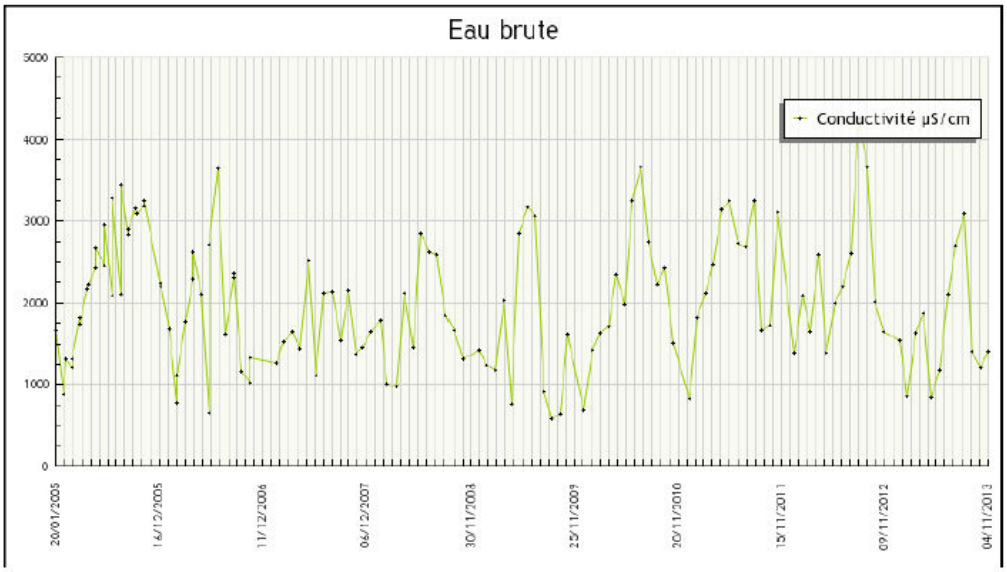
Légende

Classe de qualité	Valeurs
Trés bonne	5
Bonne	4
Passable	3
Mauvaise	2
Pollution excessive	1

LA SEILLE À METZ(02082900)

Choix du paramètre Conductivité
Choix du support Eau brute

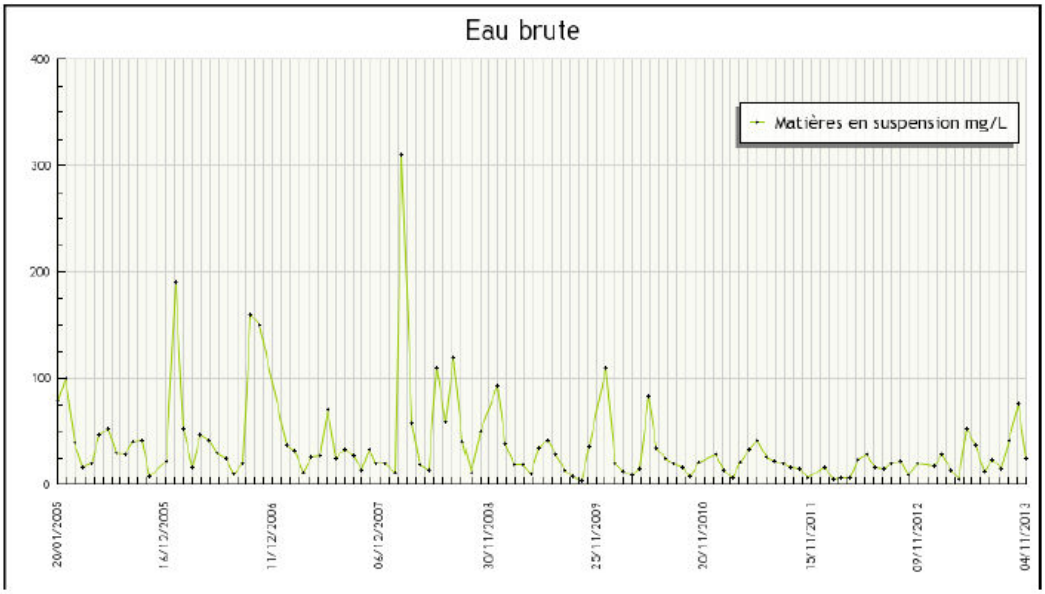
Données élémentaires



LA SEILLE À METZ(02082900)

Choix du paramètre Matières en suspension
Choix du support Eau brute

Données élémentaires



Annexe 2 : Rapports d'analyse des distributions de taille (Nanosight) des nanoparticules dans les solutions stock diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée (Nanocomposix)

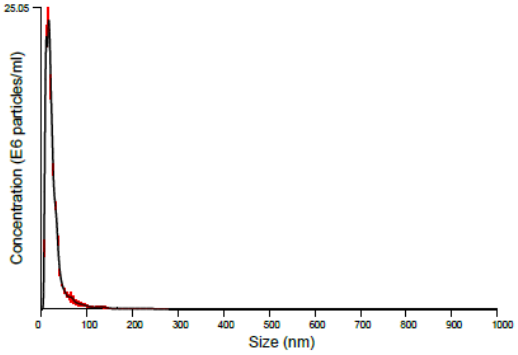
- A - 10 nm
- B - 20 nm
- C - 40 nm
- D - 60 nm
- E - 100 nm

A : nAg de 10 nanomètre de diamètre diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée

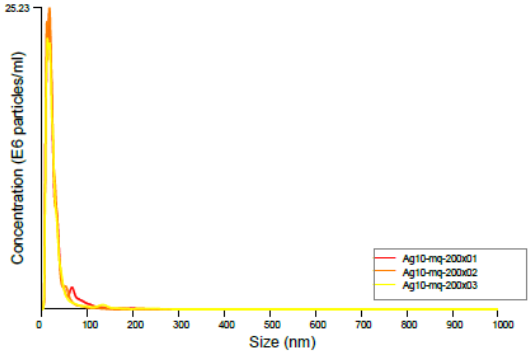
NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033

BATCH ANALYSIS REPORT



Averaged Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean



Size / Concentration

Included files:	Ag10-mq-200x01
	Ag10-mq-200x02
	Ag10-mq-200x03
Date/Time of Report	17/02/2015 14:37:42

BATCH AVERAGE RESULTS:

Size Distribution:	Mean: 25 +/- 1.3 nm
	Mode: 14 +/- 1.3 nm
	SD: 20 +/- 2.9 nm
Total Concentration:	24.27 +/- 0.47 particles/frame
	5.50 +/- 0.15 E8 particles/ml
Total Completed Tracks:	3978
Average Drift Velocity:	1218 nm/s

CAPTURE SETTINGS

Camera Type:	sCMOS
Shutter length:	Varied
Shutter setting:	800
Camera gain:	350
Frame rate:	Varied

ANALYSIS SETTINGS

Background Extract:	On
Detection Threshold:	2 - Multi
Blur:	AUTO
Min track length:	AUTO
Min expected size:	AUTO
Temperature:	25.7, 25.7, 25.7 ºC
Viscosity:	0.87, 0.87, 0.87 cP

WARNINGS

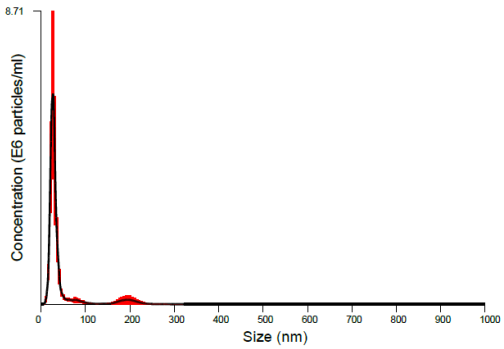
Vibration detected during analysis

B : nAg de 20 nanomètre de diamètre diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée

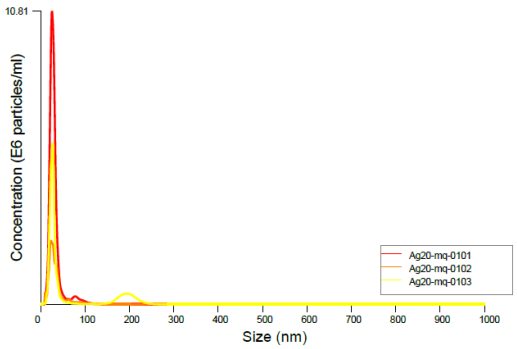
NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033

BATCH ANALYSIS REPORT



Averaged Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean



Size / Concentration

Included files:	Ag20-mq-0101
	Ag20-mq-0102
	Ag20-mq-0103
Date/Time of Report	17/02/2015 11:44:26

BATCH AVERAGE RESULTS:

Size Distribution:	Mean: 42 +/- 9.6 nm
	Mode: 24 +/- 1.2 nm
	SD: 36 +/- 16.0 nm
Total Concentration:	5.12 +/- 1.72 particles/frame
	1.09 +/- 0.35 E8 particles/ml
Total Completed Tracks:	947
Average Drift Velocity:	422 nm/s

CAPTURE SETTINGS

Camera Type:	sCMOS
Shutter length:	Varied
Shutter setting:	Varied
Camera gain:	Varied
Frame rate:	Varied

ANALYSIS SETTINGS

Background Extract:	On
Detection Threshold:	3 - Multi
Blur:	AUTO
Min track length:	AUTO
Min expected size:	AUTO
Temperature:	25.1, 25.1, 25.1 ºC
Viscosity:	0.89, 0.89, 0.89 cP

WARNINGS

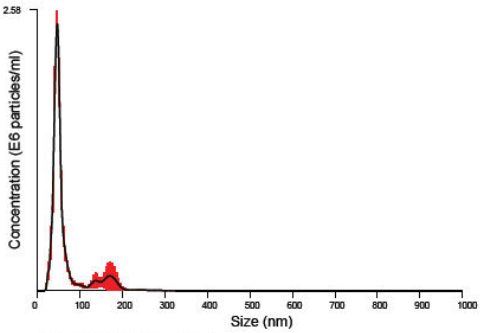
Vibration detected during analysis

C : nAg de 40 nanomètre de diamètre diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée

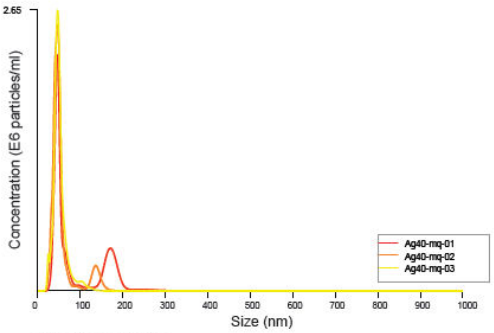
NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033

BATCH ANALYSIS REPORT



Averaged Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean



Size / Concentration

Included files:	Ag40-mq-01
	Ag40-mq-02
	Ag40-mq-03
Date/Time of Report	17/02/2015 10:58:24

BATCH AVERAGE RESULTS:

Size Distribution:	Mean: 63 +/- 10.6 nm
	Mode: 46 +/- 0.3 nm
	SD: 34 +/- 12.3 nm
Total Concentration:	2.75 +/- 0.06 particles/frame
	0.59 +/- 0.01 E8 particles/ml
Total Completed Tracks:	551
Average Drift Velocity:	554 nm/s

CAPTURE SETTINGS

Camera Type:	sCMOS
Shutter length:	14.9927 ms
Shutter setting:	600
Camera gain:	250
Frame rate:	Varied

ANALYSIS SETTINGS

Background Extract:	On
Detection Threshold:	3 - Multi
Blur:	AUTO
Min track length:	AUTO
Min expected size:	AUTO
Temperature:	24.1, 24.1, 24.2 °C
Viscosity:	0.91, 0.91, 0.91 cP

WARNINGS

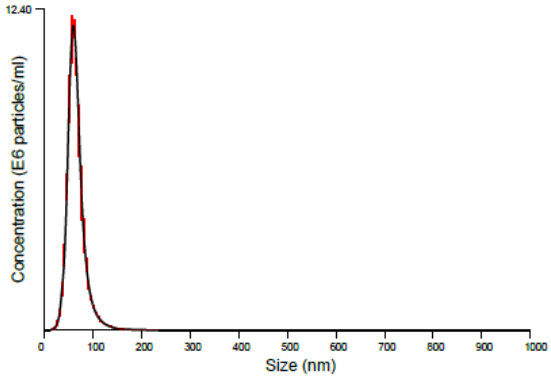
Vibration detected during analysis
Auto max jump failed in some analyses
Settings changed during some analyses

D : nAg de 60 nanomètre de diamètre diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée

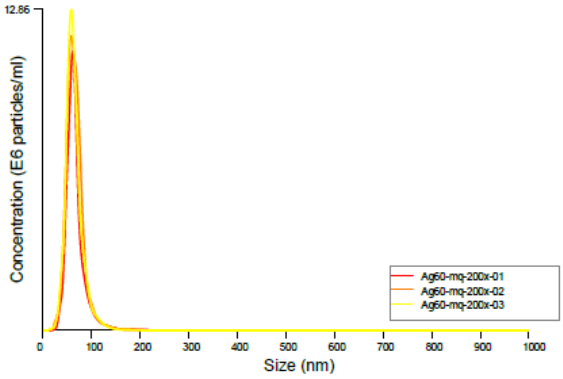
NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033

BATCH ANALYSIS REPORT



Averaged Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean



Size / Concentration

Included files:	Ag60-mq-200x-01
	Ag60-mq-200x-02
	Ag60-mq-200x-03
Date/Time of Report	17/02/2015 14:09:30

BATCH AVERAGE RESULTS:

Size Distribution:	Mean: 64 +/- 0.5 nm
	Mode: 58 +/- 1.0 nm
	SD: 17 +/- 0.3 nm
Total Concentration:	18.52 +/- 1.41 particles/frame
	3.93 +/- 0.32 E8 particles/ml
Total Completed Tracks:	3248
Average Drift Velocity:	245 nm/s

CAPTURE SETTINGS

Camera Type:	sCMOS
Shutter length:	Varied
Shutter setting:	50
Camera gain:	100
Frame rate:	Varied

ANALYSIS SETTINGS

Background Extract:	On
Detection Threshold:	4 - Multi
Blur:	AUTO
Min track length:	AUTO
Min expected size:	AUTO
Temperature:	23.0, 23.0, 23.0 ºC
Viscosity:	0.93, 0.93, 0.93 cP

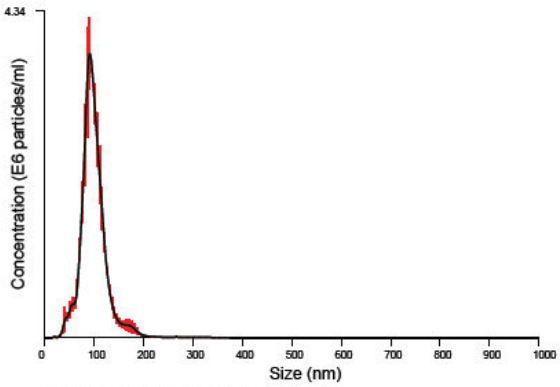
WARNINGS

E : nAg de 100 nanomètre de diamètre diluées 200 fois dans de l'eau déminéralisée

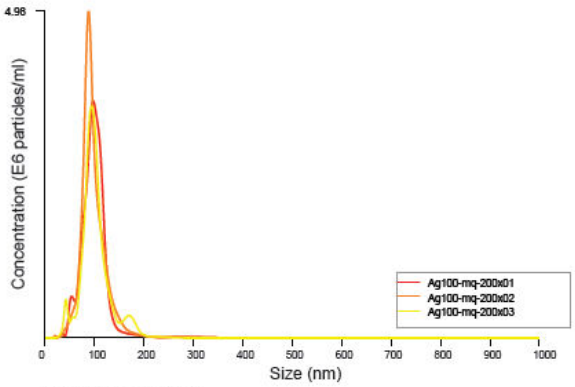
NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033

BATCH ANALYSIS REPORT



Averaged Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean



Size / Concentration

Included files:	Ag100-mq-200x01
	Ag100-mq-200x02
	Ag100-mq-200x03
Date/Time of Report	17/02/2015 14:26:25

BATCH AVERAGE RESULTS:

Size Distribution:	Mean: 98 +/- 1.3 nm
	Mode: 92 +/- 2.6 nm
	SD: 25 +/- 1.5 nm
Total Concentration:	7.60 +/- 0.31 particles/frame
	1.69 +/- 0.07 E8 particles/ml
Total Completed Tracks:	946
Average Drift Velocity:	361 nm/s

CAPTURE SETTINGS

Camera Type:	sCMOS
Shutter length:	Varied
Shutter setting:	50
Camera gain:	100
Frame rate:	Varied

ANALYSIS SETTINGS

Background Extract:	On
Detection Threshold:	2 - Multi
Blur:	AUTO
Min track length:	AUTO
Min expected size:	AUTO
Temperature:	25.8, 25.8, 25.8 ºC
Viscosity:	0.87, 0.87, 0.87 cP

WARNINGS

Annexe 3 : Protocole établi sur la dreissène par Garaud et al. (2015) et décrits en détails dans son manuscrit. Protocole tiré d'une publication de Garaud et al. en préparation.

Biomarkers measurement

Antioxidant and antitoxic defences

Total Antioxidant Capacity (TAC), Total Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione-S-Transferase (GST) and catalase (CAT) activities were measured on the cytosolic fraction, while the Acid Phosphatase activity (ACP) was measured on the whole homogenate of the digestive gland using automated colorimetric methods adapted and developed on the Konelab 20-XTi (Thermo Scientific).

TAC was measured following the method developed by Erel (2004). 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{*+}$) bleaching upon reduction by antioxidants in the cytosolic fraction was measured at 660nm after a 342 s incubation time. A Trolox standard calibration curve (0.01-1.5 mmol/L) was constructed and TAC was expressed in µmol Trolox equivalent/g protein/min (µmolTeq/gprot/min).

GPx activity was measured following the method from Paglia and Valentine (1967) adapted for its automation on the Konelab. Cytosolic fraction was diluted to 1/10 (v/v) in a total reactional volume of 160 µL 50 mM phosphate buffer (pH = 7,6) containing reduced glutathione (GSH, 2 mM), NADPH (0.36 mM), glutathione reductase (1 U/mL) and cumene hydroperoxyde (1,125 mM) as substrate. NADPH consumption was followed at 340 nm for 126 s and GPx activities were expressed in µmol NADPH/g protein/min (µmolNADPH/gprot/min; ε NADPH = 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$).

GST activity was measured on the Konelab automat by monitoring at 340 nm during 4 min the GST-catalyzed conjugation of 1-chloro2,4-dinitobenzene (CDNB; 1 mM) with GSH (1 mM) in phosphate buffer (0.1 M; pH 6.5) with 1/40 (v/v) of cytosolic fraction introduced in the reactive mixture. GST activity was expressed in µmol CDNB/g proteins/min (µmolCDNB/gprot/min).

Catalase activity was measured on a classic spectrophotometer according to Beers and Sizer (1952). Cytosolic fraction was diluted to 1/4 in 50 mM phosphate buffer (pH=7,6). The decomposition of hydrogen peroxide (30 mM) catalysed by catalase was followed at 240 nm during 30 seconds with 1/10 (v/v) of diluted cytosolic fraction introduced into the reactive mixture. Enzyme activity was expressed in mmol H_2O_2/g proteins/min (mmolH_2O_2/gprot/in; ε H_2O_2 = 40 $M^{-1}.cm^{-1}$)

Whole homogenate **ACP activity** was measured on the Konelab automat by monitoring 4-nitrophenyl phosphate (1.67 g/L) hydrolysis by acid phosphatase of diluted (1/18 v/v) whole homogenate in a total reactional volume of 90 µL 41.7 mM citrate buffer (pH=4.8) supplemented with 0.16% Triton X-100. The reaction was stopped and the p-nitrophenol realeased was revealed after 15 min by the addition of 125 µL NaOH 138.7 mM. A p-nitrophenol standard calibration curve was constructed ACP activity was expressed in µmol p-nitrophenol/g proteins/h (µmolp-nit/gprot/h).

Protein concentration was determined by the Pyrogallol red colorimetric method using ready-to-use U/CSF protein reagents and Scal bovine-based serum as reference (Thermo-Scientific).

Cellular damage assessment

Lipid hydroperoxide concentration ([LOOH]) in the whole homogenate was measured on the Konelab following the automated method developed by Arab and Steghens (2004) with minor modifications on the final Xylenol Orange (XO) concentration (240 mM) and on the working wavelength (620nm). Fe^{2+} oxidation into Fe^{3+} by LOOH contained in the whole homogenate was revealed by Fe^{3+} complexation with XO. XO-Fe^{3+} complex absorbance was measured at 620 nm after a 20 min incubation time. A *Tert*-butyl hydroperoxide (TBH) standard calibration curve (6.25-200 µmol/L) was constructed and LOOH contents were expressed in µmol TBH/g proteins (µmolTBH/gprot).

Caspase 3 activity

Caspase-3 (CSP-3) activity was measured in the cytosolic fraction following an automated method developed on the Konelab. The absborbance of pNA released by the cleavage of z-DEVD-pNA (25 µM) by CSP-3 in Tris buffer (10 mM, pH=7.4) supplemented with DTT (5 mM) and EDTA (2 mM) was followed for 1h at 405 nm with 1/7 (v/v) of diluted cytosolic fraction introduced into the reactive mixture. CSP-3 activity was expressed in µmolpNA/g proteins/h (µmolpNa/gprot/h, εpNA=10500 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 405 nm).

Energetic parameters

Protein, **triglyceride** and **cholesterol** concentrations ([prot], [trigly.] and [chol.]) were measured using Thermo-Scientifc Konelab ready-to-use reagents and methods adapted to mussel digestive gland whole homogenate. Scal bovine-based serum (Thermo-Scientific) was used to create calibration curves and energetic reserve contents were expressed in mg/g fresh weight (mg/gfw).

Electron Transport System (ETS) mitochondrial activity was measured on the whole homogenate following the original method from Owens and King (1975) modified by De Coen and Janssen (1997) and automated on the Konelab. ETS activity was measured by monitoring at 480 nm for 12 min the formazan produced by p-iodonitrotetrazolium (0.133 g/L) reduction as final electron acceptor of the mitochondrial respiratory chain in 80 mM phosphate buffer (pH=8.5) containing $MgSO_4$ (15 µM), Triton X-100 (0.16%), PVP (0.3 g/L), NADH (1 mM) and NADPH (0.15 mM) with 1/35 (v/v) of diluted whole homogenate. ETS activity was calculated according to De Coen and Janssen (1997) and expressed in µmol O_2/g fresh weight/h (µmolO_2/gfw/h).

Lactate Dehydrogenase (LDH) activity was measured using Thermo-Scientifc Konelab ready-to-use reagents and methods (LDH IFCC) adapted to mussel digestive gland cytosolic fraction. LDH activity was expressed µmol NADH/g proteins/h (µmolNADH/gprot/h).

Arab, K., Steghens, J.-P., 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. Anal. Biochem. 325, 158–163. doi:10.1016/j.ab.2003.10.022

Beer, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195, 133–140.

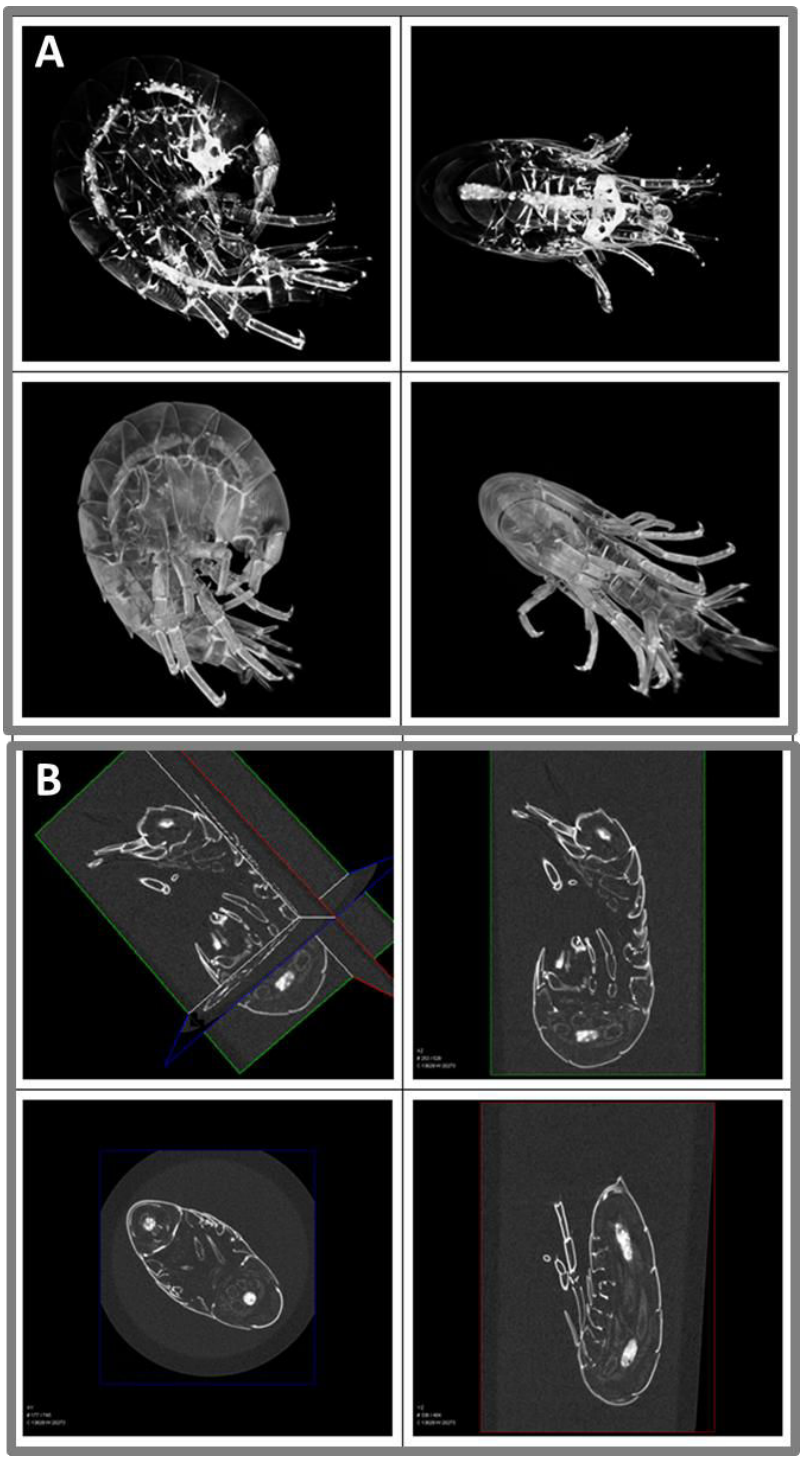
Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin. Biochem. 37, 277–285. doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015

De Coen, W.M.D., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 6, 43–55. doi:10.1023/A:1008228517955

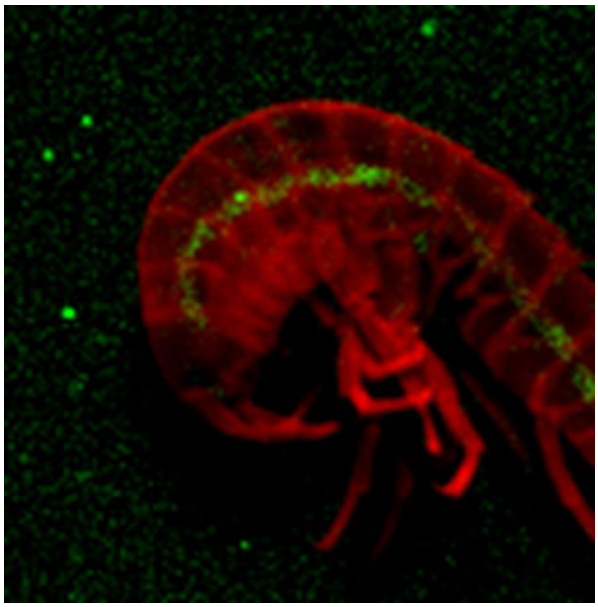
Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. Mar. Biol. 30, 27–36. doi:10.1007/BF00393750

Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 158–169.

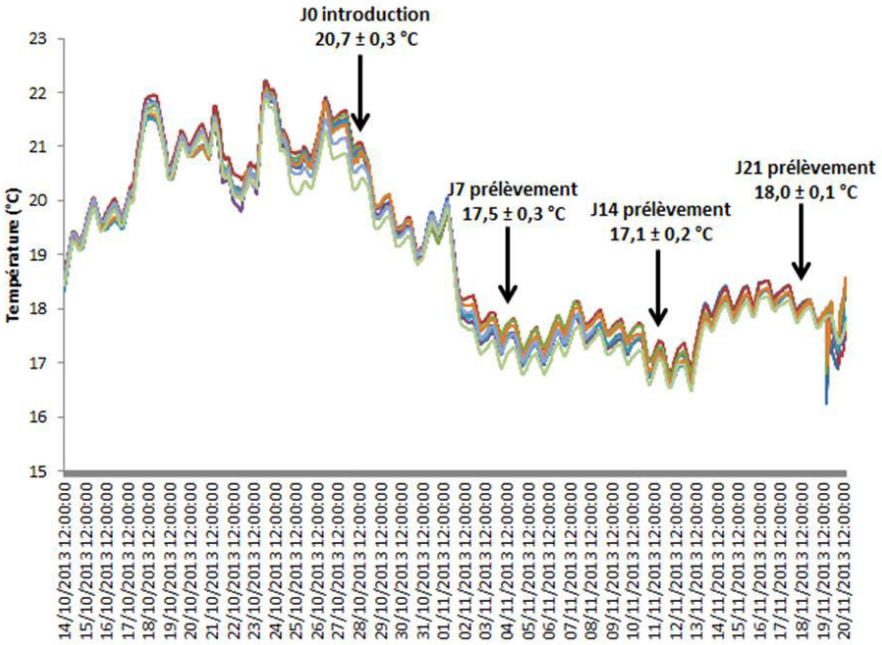
<u>Annexe 4 :</u> *Images en micro-tomographie de G. roeseli après 4 jours d'exposition à 1 mg.L^{-1} de nTiO$_2$. A : Image en 3D de l'organismes entier et B : images acquises en plan coupé. Imagerie effectuée par L. Giambérini et P. Chaurand au CEREGE (Aix-en-Provence).*



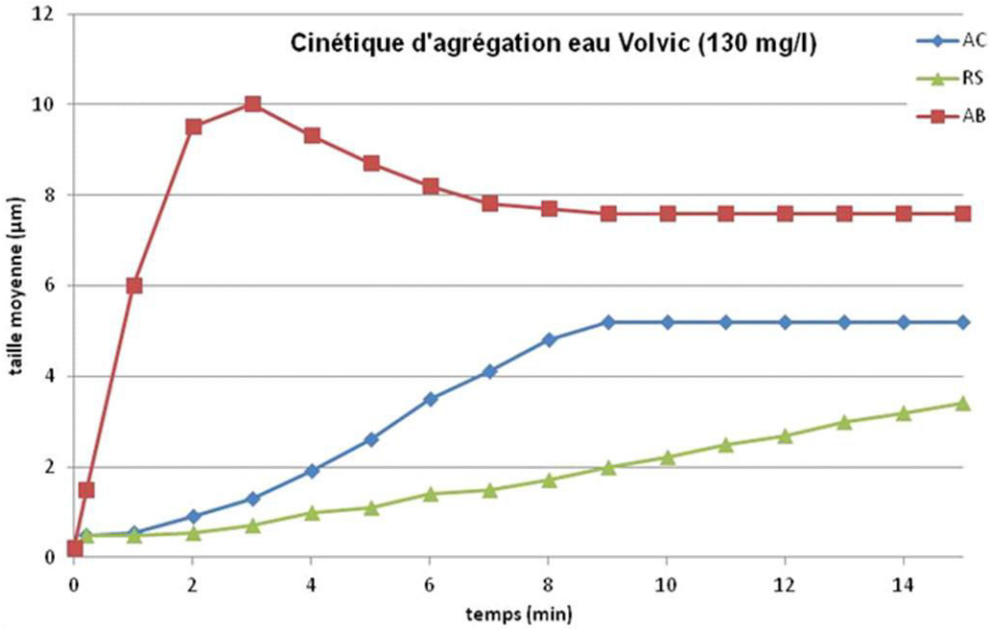
<u>Annexe 5 :</u> *Images en micro-fluorescence X à haute résolution en énergie (micro-HR-XRF) de G. roeseli après 4 jours d'exposition à 1 mg.L^{-1} de nTiO$_2$.Imagerie effectuée par L. Giambérini et P. Chaurand au CEREGE (Aix-en-Provence).*



Annexe 6 : *Cinétique de la température moyenne mesurée dans la colonne d'eau des 9 mésocosmes tout au long de l'expérimentation relative aux nAg. Les temps J0 d'introduction des gammares et les temps J7, J14 et J21 de prélèvement sont représentés par une flèche.*



Annexe 7 : *Cinétique d'agrégation dans de l'eau Volvic de 3 types de $nTiO_2$, anatase cubique (AB), rutile standard (RS) et anatase bâtonnet (AB) pendant 14 minutes. Données acquises par C. Pagnout*.



Effets (sub)individuels et fonctionnels des nanoparticules sur les Crustacés Gammaridae d'eau douce.

Qu'il s'agisse de crèmes solaires, d'additifs à carburant ou d'emballages alimentaires, ces produits d'utilisation courante contiennent des nanoparticules, et l'ensemble des processus de leur production, utilisation et vieillissement conduit à un relargage direct ou non dans les milieux aquatiques. Le rejet accru de nanoparticules dans les écosystèmes d'eau douce est donc à prendre en considération et soulève la question de leurs effets potentiels sur les organismes y vivant.
Le programme collaboratif ANR P2N – MESONNET (2011 – 2015) s'est attaché à décrire le devenir des nanoparticules (transfert et transformation dans les milieux et dans les organismes vivants) ainsi qu'à déterminer leur écotoxicité. Le travail présenté dans ce manuscrit a pris part à cette évaluation en étudiant les effets de nanoparticules d'argent, de titane et de carbone (nanotubes) sur des Crustacés Amphipodes appartenant au genre *Gammarus*. L'approche expérimentale mise en œuvre a cherché à évaluer, en laboratoire, l'effet sur les gammares de l'exposition aux nanoparticules en focalisant sur des biomarqueurs mesurés au niveau (sub)individuel (cellulaire, physiologique, comportemental) et sur des paramètres ayant trait à leur rôle fonctionnel dans les écosystèmes. La démarche s'est voulue la plus proche possible des conditions naturelles en envisageant des scénarios de contamination environnementalement réalistes : exposition dans un milieu complexe (eau prélevée dans le milieu naturel) à de faibles concentrations en nanoparticules et en présence de nourriture.
Dans ce contexte, l'étude des effets des nAg sur trois espèces de gammares a révélé une plus forte sensibilité de *G. roeseli,* chez lequel l'exposition a engendré une réduction de l'activité locomotrice et de la production de fines particules de matière organique (FPOM). Sur le plan physiologique, une augmentation de la consommation en oxygène a été observée chez des gammares exposés aux nAg, et ce, malgré une stabilité de réponse des marqueurs du métabolisme énergétique étudiés. La consommation en oxygène s'est avérée corrélée aux concentrations en argent mesurées dans les organismes, ainsi qu'à la taille des nanoparticules testées. L'influence de la forme des nanoparticules (nAg : triangulaires plates et sphériques ; $nTiO_2$: cubiques ou en bâtonnets) et de la présence de matière organique (NTC) a été étudiée en mésocosmes, en ciblant principalement des indicateurs cellulaires (réserve énergétique, réponse antioxydante, dommage...) et individuels (osmorégulation, ventilation et locomotion). Les résultats obtenus suggèrent des effets dépendants de la forme des nanoparticules.L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt d'une double approche, écologique et écotoxicologique, permettant de mieux appréhender les effets des nanoparticules sur les écosystèmes d'eau douce.
Mots clé : Nanoparticules – Gammaridae – Biomarqueurs (sub)individuels – Biomarqueurs fonctionnels - Ecotoxicologie - Ecologie

---

(Sub)individual and functional effects of nanoparticles on freshwater Crustaceans Gammaridae.

Products incorporating nanoparticles are now ubiquitous in our everyday life. For example, sunscreens, fuel additives or food packaging materials contain nanoparticles which could be released in the aquatic environment during the entire life cycle of the nanoproduct, from its production to its use and aging. Therefore an increase of nanoparticle emissions in the aquatic ecosystems needs to be considered and raises the question about their potential effects on living organisms.
The collaborative program ANR P2N – MESONNET (2011- 2015) was focused on the evaluation of the nanoparticle fate (transfer and transformation in media and living organisms) and on their ecotoxicity. The present work took part in this assessment by studying the effects of nanoparticles of silver, titanium and carbon (nanotube) on the Crustaceans Amphipod *Gammarus sp*.. The experimental approach was designed to assess, in laboratory conditions, the effect of nanoparticles on the gammarids, focusing on biomarker measurements at the (sub)individual level (cellular, physiological, behavioral) and on some parameters related to their functional roles. Experiments were designed as close as possible to natural conditions using environmentally realistic contamination scenario: exposure in a complex media (natural water from river) to low nanoparticle concentrations and with food.
In this context, the effects of nAg were investigated in three gammarids species and results revealed a higher sensibility of *G. roeseli*, for which exposure induced a decrease of the locomotor activity and of the production of fine particles of organic matter (FPOM). At the physiological level, an increase of the oxygen consumption was observed in gammarids exposed to nAg, despite a stability observed for the studied markers of energetic metabolism. The oxygen consumption was correlated with the silver concentration measured in the organisms, and also with the tested nanoparticle sizes. The influence of the nanoparticle forms (nAg: plate triangular and spherical; $nTiO_2$: cubic and rod-shaped) and of the organic matter (CNT) was studied in mesocosms by focusing mainly on cellular indicators (energetic storage, antioxidant response, damage…) and individual ones (osmoregulation, ventilation and locomotion). The obtained results suggest form-dependent effects of nanoparticles.
This work shows the interest of a coupled approach using ecological and ecotoxicological endpoints to better understand the effects of nanoparticles on freshwater ecosystems.
Key words: Nanoparticles – Gammaridae - (Sub)individual biomarkers – Functional biomarkers - Ecotoxicology – Ecology