



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 Science et Ingénierie
des Ressources Naturelles (SIRENa)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention
du titre de Docteur de l'Université de Lorraine
Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Vanessa KOEHLE-DIVO

**Effets de nanomatériaux chez deux espèces de bivalves le long d'un
gradient de salinité : approches intégrées physiologiques et moléculaires**

Soutenue le 20 septembre 2019 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : **Eric PINELLI**, Professeur, ENSAT (Toulouse)
Frédéric SILVESTRE, Professeur associé, Université de Namur (Namur)

Examineurs : **Catherine MOUNEYRAC**, Professeur, Université Catholique de l'Ouest-MMS (Angers)
Mélanie AUFFAN, Directeur de recherches, CNRS CEREGE (Aix-en-Provence)

Directrice de thèse : **Laure GIAMBERINI**, Professeur, Université de Lorraine-LIEC (Metz)

Co-directrice de thèse : **Sandrine PAIN-DEVIN**, Maître de Conférences, Université de Lorraine-LIEC (Metz)

Co-encadrante de thèse : **Bénédicte SOHM**, Ingénieur de Recherche, Université de Lorraine-LIEC (Metz)

« L'absence de preuve n'est pas la preuve de l'absence. »

(Michel Juvet)

Remerciements

Le travail de thèse est long et fatigant, mais il a été très enrichissant aussi bien professionnellement que personnellement. Il m'a permis d'affronter mes peurs et ma timidité, de me prendre en main en devenant plus autonome et d'approfondir énormément mes connaissances dans de nombreux domaines. Rien de cela n'aurait été possible sans l'aide et l'attention apportée par mon entourage. Quelques pages de remerciement ne représentent pas grand-chose pour exprimer ma reconnaissance mais restent néanmoins indispensables et très difficiles à poser à l'écrit.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à ma directrice **Laure Giambérini**, ma co-directrice **Sandrine Pain-Devin** et à ma co-encadrante de thèse **Bénédicte Sohm** pour leur attention et la confiance qu'elles ont mis en moi. Ce travail de thèse n'aurait jamais été envisagé sans l'intervention de Laure à mon arrivée en master, qui par sa gentillesse et sa bienveillance à l'égard des autres m'a permis de vaincre ma timidité pour plonger à ses côtés dans la découverte de l'écotoxicologie. Un grand merci également à Sandrine et Bénédicte qui sont toutes deux extrêmement ouvertes à la discussion et à l'aide d'autrui même lorsque leurs emplois du temps sont remplis. Je n'aurais pu souhaiter un meilleur trio pour m'encadrer et m'aider à évoluer car leurs différences en font des personnes complémentaires. Je ne saurais exprimer adéquatement toute ma reconnaissance à leur égard et me sens honorée d'avoir été accompagnée de personnes dotées d'un si grand savoir-faire et d'un si grand cœur.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury, les rapporteurs **Eric Pinelli** et **Frédéric Silvestre**, et à **Mélanie Auffan** et **Catherine Mouneyrac** qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également **Catherine Mouneyrac**, **Mélanie Auffan** et **Amélie Châtel**, qui font partie de mon comité de pilotage de thèse. Leur soutien et leur aide apportée au cours de ma thèse m'ont été précieux et je suis également très reconnaissante d'avoir pu faire un bout de chemin à leurs côtés.

Je remercie aussi la direction du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) pour m'avoir accueillie. Merci également à la direction du laboratoire Mer Molécules et Santé de Nantes-Angers (MMS) qui m'a permis d'effectuer une expérience au

sein de leurs locaux. Je remercie également les membres du Centre Européen de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement (CEREGE) pour leur accueil lors de mon passage à Aix-en-Provence.

Je tiens également à remercier les personnes sans qui cette thèse aurait été bien plus difficile. Je remercie **Philippe Wagner** pour son aide lors des sorties terrain. Merci aussi à **Philippe Rousselle** et **Jean-François Poinssaint** pour leur aide apportée tout au long de cette thèse. Sans leurs talents de bricoleurs, la mise en place et le nettoyage des mésocosmes auraient été bien plus compliqués. Merci aussi Philippe pour ton aide avec les sondes de mesures et pour bien vouloir partager ta passion de l'astronomie. Je remercie aussi **Simon Devin** pour tout le temps qu'il m'a consacré afin de m'éclairer dans le domaine des statistiques. Je remercie aussi **Marilyne Goergen** pour sa patience et pour l'aide qu'elle m'a apportée les nombreuses fois que je suis venue la solliciter. Je remercie également **Romuald Charpentier**, son successeur, pour son aide et pour nos discussions très enrichissantes lorsque les couloirs sont encore vides. Je souhaite également remercier **Nathalie Nauer** pour l'attention qu'elle porte à tous les membres du laboratoire. Nos discussions m'ont bien aidée et rassurée tout au long de ma thèse et ses multiples attentions, sa gentillesse sans limite et son envie de faire plaisir contribuent au bien de tous et donnent l'envie de suivre son exemple. Je remercie également **Laetitia Minguez** et **Kahina Mehennaoui** pour leur aide, leur bonne humeur et les nombreuses discussions que nous avons eues. Merci aussi à **Justine Flayac**, **Clément Bojic** et **Danièle Pauly** pour l'aide qu'ils m'ont apporté. Je me dois également de remercier particulièrement Danièle pour avoir bien voulu m'apprendre les bonnes pratiques de laboratoire à mon arrivée. Son sens de l'ordre et son souci de propreté en toute occasion étaient très impressionnants mais particulièrement utiles pour travailler dans de bonnes conditions. Je n'ai certainement pas cité la totalité des personnes que j'aimerais remercier, mais quoi qu'il en soit, je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LIEC, et plus particulièrement les personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce projet de thèse, que ce soit à travers leur aide pour la mise en place de mes expériences, ou simplement *via* nos discussions qui ont été plus ou moins enrichissantes mais qui m'ont surtout permis de décompresser. Chaque sourire, chaque petite attention est déjà un cadeau qui contribue au bien de tous et je vous en remercie.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire MMS à Angers qui m'a accueillie et aidée à plusieurs reprises dans cette thèse. Je remercie encore **Catherine Mouneyrac** pour

son aide et son encadrement lors de mon séjour. Merci à **Mélanie Bruneau** pour sa disponibilité et sa sympathie. Elle a été une sorte de guide qui m'a aiguillé sur les pratiques de ce laboratoire et m'a beaucoup aidé dans la mise en place et la gestion de mes expériences. Je remercie également **Hanane Ettjani-Perrin, Amélie Châtel, Isabelle Métais, Sofiene Tlili et Mohammed Mouloud** pour leur aide apportée. Merci aussi à **Messika Revel, Andrew Barrick** et aux stagiaires présents lors de ce séjour pour m'avoir non seulement permis de partager quelques pauses à vos côtés, mais également pour les quelques petites sorties à Angers qui ont contribué à me faire découvrir davantage cette magnifique ville. Merci aussi à tous les membres du personnel qui ont contribué à cette intégration au sein de ces locaux. Je remercie également l'équipe de Nantes et notamment **Mme Simonato** pour son aide dans mes démarches administratives lors de ce séjour.

Je tiens également à remercier du fond du cœur tous les membres du **foyer Merici** qui m'ont accueillie lors de ce séjour à Angers. La chaleur de ce foyer et la bienveillance qui y règne m'a permis de me sentir particulièrement bien dans cette ville dans laquelle tout m'était encore totalement inconnu. Je remercie particulièrement **Sœur Marie-Simone** pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir et la bienveillance dont elle fait preuve. Merci également aux filles qui m'ont tenu compagnie et avec lesquelles nous avons passé de très bons moments.

Mes remerciements vont aussi aux personnes qui se sont impliquées dans les animations du LIEC. Ces expériences au sein de l'équipe de l'animation scientifique et dans la mise en place du séminaire annuel du LIEC de 2018 ont été particulièrement enrichissantes pour moi. Elles m'ont non seulement permis de renforcer ma confiance en moi-même, mais m'ont aussi permis d'acquérir des connaissances sur la gestion et la mise en place d'évènements qui ne sont pas uniquement valables dans ce domaine professionnel.

Je remercie également les étudiants stagiaires que j'ai pu encadrer au cours de ma thèse : **Nicolas, Maxime et Aline**. Cette expérience d'encadrement en apprend beaucoup, aussi bien aux stagiaires qu'à la personne qui encadre, et est par conséquent particulièrement bénéfique tant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie également **Camélia** qui a partagé mon bureau pendant la durée de son stage et dont les discussions ont été très riches et plaisantes.

Je tiens à remercier l'ensemble des doctorant(e)s et post-doctorant(e)s pour les moments partagés dans ma vie personnelle et professionnelle. Merci à **Emilie, Andreïna, Clément, Imad, Anne, Ablin, Jérémy, Joey, Olivier, Pierre, Alice, Marine, Carole, Kevin, David, Vincent, Albin, Cyrielle, Ana...**

Je souhaite remercier tout particulièrement les personnes les plus chères en mon cœur, c'est-à-dire : ma famille. Un grand MERCI à mes parents, **Louis et Nathalie**, qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse. Sans leur éducation, leur participation, leur soutien ou leur amour, je ne serais probablement jamais arrivée à cette étape. Je souhaite également remercier de tout cœur mon frère, **Mathieu**, qui a également choisi la voie des longues études. Finalement, il y aura deux « Docteur Koehlé-Divo » : qui l'eut cru ? Je remercie aussi sa femme **Virginie** et mon adorable neveu, **Thomas**. Merci également à mes grand-mères **Raymonde** et **Dorothée** et à **Freddy**, qui pour moi est un peu comme mon grand-père. Je pense également à **Jean-Marie**, mon grand-père, qui aurait certainement été heureux de voir qu'il avait raison : « Vanessa deviendra docteur plus tard, tu verras ! ». Je remercie également mon parrain **Thierry**, sa femme **Mireille** et ses adorables enfants **Nathan, Léo et Clara**. Je remercie également tous les autres membres de ma famille qu'il me serait difficile de citer en intégralité ici. Je souhaite également remercier **Samuel**, qui a depuis le début accepté mes horaires parfois très longs, mes absences et mon stress. Sa patience est d'or et sa présence est un soulagement pour mon cœur.

Merci encore à tous.

Table des matières

INTRODUCTION	1
Chapitre I : Contexte scientifique	5
A. Les nanomatériaux manufacturés.....	5
1. Origines et définitions	5
2. Production, développement et utilisations des nanomatériaux manufacturés	7
3. Devenir des nanomatériaux dans l'environnement aquatique	9
4. Ecotoxicité des nanomatériaux envers les organismes aquatiques	12
B. Cas des nanomatériaux de dioxyde de cérium :	19
1. Secteur d'utilisation	19
2. Devenir et comportement dans l'environnement	19
3. Toxicité envers les organismes aquatiques.....	20
C. Cas des nanomatériaux d'oxyde de cuivre	21
1. Secteur d'utilisation	21
2. Comportement dans l'environnement	22
3. Toxicité envers les organismes aquatiques.....	23
Chapitre II : Démarche scientifique	25
A. Complexification de l'exposition.....	25
B. Approche multi-marqueurs	30
C. Description des marqueurs étudiés aux différents niveaux	35
1. Marqueurs de stress oxydant	36
1.a. Superoxyde dismutase	36
1.b. Catalase	37
1.c. Glutathione peroxidase	37
1.d. Thiorédoxine reductase	38
1.e. Capacité antioxydante totale	38
2. Mécanismes de détoxification	38
2.a. Protéines de choc thermique :	38
2.b. Métallothionéines	39
2.c. Glutathion-S-transférase	40
2.d. Phosphatase acide.....	40
2.e. Mécanismes d'efflux	41
2.f. Autophagie	41
3. Dommages cellulaires	42
3.a. Peroxydation lipidique	42
3.b. Apoptose	42
3.c. Génotoxicité.....	43
4. Métabolisme énergétique	43

4.a. Triglycérides.....	44
4.b. Système de transport d'électrons	44
4.c. Lactate déshydrogénase	44
5. Osmorégulation	45
6. Marqueurs physiologiques et comportementaux	45
6.a. Enfouissement des organismes.....	45
6.b. Taux de filtration	46
6.c. Etat général de santé des organismes	46
D. Modèles biologiques	47
1. Physiologie des bivalves	47
2. <i>Corbicula fluminea</i>	49
2.a. Taxonomie:	49
2.b. Répartition géographique et sites de prélèvement	49
2.c. Anatomie et écologie.....	50
2.d. Reproduction.....	51
3. <i>Scrobicularia plana</i>	51
3.a. Taxonomie	51
3.b. Répartition géographique et sites de prélèvement.....	51
3.c. Anatomie et écologie.....	52
3.d. Reproduction.....	53
Chapitre III : Evaluation du devenir et des effets des CeO₂ NM	55
Partie 1: Genotoxicity and physiological effects of CeO ₂ NPs on a freshwater bivalve (<i>Corbicula fluminea</i>).....	59
Partie 2: <i>Corbicula fluminea</i> gene expression modulated by CeO ₂ nanomaterials and salinity	69
Chapitre IV : Evaluation du devenir et des effets des CuO NM	91
Partie 1: A multilevel approach for an integrative assessment of CuO NP effects on <i>Corbicula fluminea</i>	95
Partie 2: From freshwater to estuarine environment: similar trends for different fates of commercial CuO NMs	125
Chapitre V: Discussion générale	163
Conclusion et perspectives.....	183
Références bibliographiques	187

Liste des figures

Figure 1 : Echelle de taille du vivant (adapté de www.assef-asso.fr).....	5
Figure 2 : Définitions relatives aux nanomatériaux selon l'Organisation internationale de normalisation (ISO, 2015) et l'Anses (2015).....	6
Figure 3: Présentation des deux techniques de fabrication des nanomatériaux manufacturés (adaptée de Runowski et al., 2014).....	7
Figure 4 : Illustration des modifications de l'aire de surface en fonction de la taille des nanomatériaux à masse constante (adapté de Klaine et al., 2012).....	8
Figure 5 : Secteurs utilisant des nanoproduits (adapté de Vance et al., 2015).	8
Figure 6 : Comportement et devenir des NMM dans l'environnement aquatique. (Figure adaptée de Rocha et al., 2015). MON = matière organique naturelle	10
Figure 7 : Nombre de publications sur l'évaluation de la toxicité des nanomatériaux (recherche WoS du 20/09/2018). A) Nombre de publications en fonction du niveau biologique chez les espèces aquatiques et B) uniquement chez les eucaryotes. C) Nombre de publications en fonction du niveau biologique chez les mollusques. D) Répartition des publications présentant une approche moléculaire concernant les espèces de bivalves.	13
Figure 8 : Proportion d'utilisation de nanomatériaux de dioxyde de cérium en fonction des différents secteurs (adapté de Wang et Nowack, 2018b).	19
Figure 9 : les eaux naturelles contiennent une multitude d'espèces nanométriques différentes, y compris de différentes formes de NMM (Nowack et al., 2015). Abréviations : E-NM : nanomatériaux manufacturés, BNM : NM dérivé du matériau brut, A-NM : NM érodé, N-NM : NM naturel, C-NM : NM généré par combustion, SPM : matière particulaire en suspension.	26
Figure 10 : Avantages et inconvénients des approches expérimentales selon le degré de complexité des milieux d'exposition. Les approches expérimentales développées dans cette thèse sont encadrées en rouge.	27
Figure 11 : Designs expérimentaux pour une exposition intérieure en mésocosmes. L'image de gauche représente le design imaginé par Auffan et al. (2015). L'image de droite comprend les adaptations au système des marées réalisées par Carole Bertrand (2016) dans le cadre de l'ANR NanoSALT.....	28
Figure 12 : Avantages et inconvénients du suivi de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (à partir de Adams et al., 1989 et Mussali-Galante et al., 2013)... ..	30
Figure 13 : Organisation hiérarchique des procédés biochimiques (adapté de Newman & Clements, 2008).	32

Figure 14 : Réaction de la PCR en temps réel (adapté de Bigot et al., 2008). Un cycle se compose d'une phase de dénaturation (A), d'hybridation (B) et d'élongation (C). La fluorescence détectée est proportionnelle au nombre de copies du gène cible. 33

Figure 15 : Schéma illustrant le mode d'action possible des nanomatériaux manufacturés (NMM) sur les marqueurs étudiés. Les marqueurs impliqués dans divers procédés ont été affichés via différentes couleurs en fonction du niveau d'étude réalisée : approche moléculaire (orange), approche cellulaire (bleu), les deux (vert). TAC= capacité antioxydante totale; SOD = superoxyde dismutase ; Se-GPx = glutathion peroxydase sélénium dépendante ; Trxr = thiorédoxine réductase ; GST= glutathion-S-transférase ; MT= métallothionéines ; HSP= protéine de choc thermique ; LOOH= hydroperoxyde lipidique ; LDH= lactate déshydrogénase ; ETS= système de transport d'électrons ; ACP = phosphatase acide ; Gabarap= gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein ; Pgp= P-glycoprotéine ; MRP1= multi drug associated protein 1 ; Casp-3= caspase-3 ; RE = réticulum endoplasmique ; ROS = espèce réactive de l'oxygène. 35

Figure 16 : Coupe longitudinale de bivalve (Vidal, 2001). 47

Figure 17 : Sites de prélèvement de *C. fluminea*. 50

Figure 18 : Différenciation de deux espèces de Corbiculidés. A gauche est présentée un individu de l'espèce *C. fluminalis* tandis que *C. fluminea* est présentée à droite. (Individus prélevés dans La Maxe (Moselle, France). 50

Figure 19 : Site de prélèvement de *S. plana*. 52

Figure 20 : A Positionnement de *S. plana* dans le sédiment, B et C Activité du siphon inhalant pendant la prise de nourriture sur le sédiment (Hugues, 1969). 52

Figure 21 : Schéma conceptuel de l'Adverse Outcomes Pathways (AOP) (à partir de OECD, 2012). 168

Liste des tableaux

Tableau I : Publications portant sur l'expression de gènes chez les bivalves (WoS du 21/09/18).	18
Tableau II : Conditions expérimentales mises en place au cours de cette thèse.	29
Tableau III : Synthèse des résultats acquis lors des expositions aux CeO ₂ NM et NAP chez <i>C. fluminea</i> (Cf) et chez <i>S. plana</i> (Sp). Le symbole « Ø » correspond à l'absence d'effets significativement différents. Les données des observations réalisées à la salinité optimale des organismes ont été mises en vert tandis que celles relatives aux expositions au stress salin ont été colorées en rouge. L'absence d'indication signifie une absence de mesures.	175
Tableau IV : Synthèse des résultats acquis lors des expositions aux CuO NM et NAP chez <i>C. fluminea</i> (Cf) et chez <i>S. plana</i> (Sp). Le symbole « Ø » correspond à l'absence d'effets significativement différents. L'absence d'indication signifie une absence de mesures.	176
Tableau V : Biomarqueurs ayant permis la création des modèles PLS-DA. Seules les variables ayant un rôle significatif dans la création des modèles (VIP pour Variable Importance in the Projection) ont été prises en compte (VIP > 0.8). Pour chaque échelle de mesure, les réponses fortement impactées par les CeO ₂ NM (bleu), par les CuO NM (rouge) ou par les deux NM (vert) ont été mises en couleur. TL : tail length, représente les dommages à ADN.	177

Liste des abréviations

AchE	Acétylcholinestérase
ACP	Phosphatase acide
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	Analyse de variances
ANR	Agence Nationale de la recherche
AOP	adverse outcome pathways
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
Casp-3	caspase-3
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CEREGE	Centre de recherche et d'enseignement de géosciences de l'environnement
CuZnSOD	Superoxyde dismutase cuivre-zinc
Cyt C	Cytochrome C
ETS	Electron transport system
ETS	Système de transport d'électrons (Electron Transport System)
GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein
GPx	Glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion-S-transférase
GSTpi	glutathion-S-transférase isoforme pi
HSP	protéine de choc thermique (Heat shock protein)
HSP70	protéine de choc thermique (Heat shock protein) de 70 kdaltons
HSP90	protéine de choc thermique (Heat shock protein) de 90 kdaltons
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ISO	Organisation internationale de normalisation
JRC	Joint research center
LDH	lactate dehydrogenase
LOOH	hydroperoxyde lipidique
LPO	peroxydation lipidique
MF	Masse fraiche
MnSOD	Superoxyde dismutase manganèse-dépendante

MON	Matière Organique Naturelle
Mrp	Multidrug Resistance-associated Protein
MS	Masse sèche
MT	Métallothionéines
MXR	Multi Xenobiotic Resistance
Na/K ATPase	Pompe sodium-potassium
NAP	Nanoproduits commercialisés
NM	Nanomatériau
NM-212	Nanomatériau de dioxyde de cérium de référence JRC
NMM	nanomatériau manufacturé
NOAA	Nano-Objets, leurs Agglomérats et leurs Aggrégats
OECD ou OCDE	l'Organisation de Coopération et de Développement Economique
PCN	point de charge nulle
PEC	Predictive Environmental Concentration ou concentration environnementale prédite
Pgp	glycoprotéine P (p-glycoprotein)
PLS-DA	Régression des moindres carrés partiels couplé à l'analyse discriminante
Prot	protéines
psu	practical salinity unit
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RPB	Règlementation sur les produits biocides
RT	transcription inverse (reverse transcription)
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
Se-GPx	Glutathion peroxydase sélénium dépendant
SOD	Superoxyde dismutase
TAC	capacité antioxydantes totale (total antioxydant capacity)
TAC	Capacité antioxydante totale
Tri	triglycérides
Trxr	Thiorédoxine réductase
UV	ultra violets
VIP	Variable Importance in the Projection

Informations personnelles

Nom : Vanessa Koehlé-Divo

E-mail : vanessa.koehledivo@gmail.com

Date de naissance : 19-02-1991

Lieu de naissance : Metz, France

Formations :

10/2015 - 10/2019 **Doctorat en Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes**

Effets de nanomatériaux chez deux espèces de bivalves le long d'un gradient de salinité :
approches intégrées physiologiques et moléculaires

Université de Lorraine, Metz (57), France

09/2013 - 09/2015 **Master Environnement Ecotoxicologie Ecosystèmes**

Université de Lorraine, Metz (57), France

09/2010 - 09/2013 **Licence Sciences du Vivant**

Université de Lorraine, Metz (57), France

Publications internationales

Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S., Giambérini, L., 2018. Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology* 198, 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>

Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, S., Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Sohm, B., 2019. *Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04927-3>

Koehlé-Divo, V., Sohm, B., Giambérini, L., Devin, S., Auffan, M., Mouneyrac, C., Pain-Devin, S., Assessment of CuO NP effects on *Corbicula fluminea*: physiological, biochemical and molecular integrated approach, soumis   Environmental Pollution.

Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, Sohm, B., Devin, S., Mouneyrac, C., Auffan, M., Châtel, A., Giambérini, L. Multiscale assessment of CuO NM effects on freshwater and estuarine bivalves, *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*: an indoor mesocosm study, in preparation

Communications orales:

Vanessa Koehlé-Divo, Sandrine Pain-Devin, Bénédicte Sohm, Simon Devin, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Laure Giambérini, 2018, « *Corbicula fluminea* exposure to copper oxide nanoparticles: an integrated mesocosm study », SETAC Europe 28th annual meeting, Rome, Italie.

Vanessa Koehlé-Divo, Bénédicte Sohm, Carole Bertrand, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Sandrine Pain-Devin, Laure Giambérini, 2017, "Mesocosm study : Integrated molecular approach in *Corbicula fluminea* exposed to nCeO₂", CEINT Internal Meeting, Durham, United State of America.

Laure Giamberini, Carole Bertrand, Vanessa Koehlé-Divo, Bénédicte Sohm, Simon Devin, Christophe Pagnout, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac and Sandrine Pain-Devin. 2017. Multibiomarker assessment of cross effects of salinity and cerium nanomaterials on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. The International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE). Zurich, 16-20 July

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Laure Giambérini, 2017. Biological effects of CeO₂ nanomaterials on a freshwater bivalve: *Corbicula fluminea*. DocDay (LIEC) Nancy, France, 25 April.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Laure Giambérini, 2017. Effets biologiques des nanomatériaux d'oxyde de cérium sur le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*. Séminaire annuel 2017 (RP2E), Nancy, France, 2 January.

Carole Bertrand, Simon Devin, Catherine Mouneyrac, Mélanie Auffan, Amélie Châtel, Vanessa Koehlé-Divo, Christophe Pagnout, Simon Pain-Devin, Anne Pariat, Hanane Perrein-Ettajani, Laurence Poirier, Aurore Zalouk-Vergnoux, Laure Giambérini, 2016,"Cross effects of salinity and ceria nanoparticles on two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*: multibiomarker assessment", SETAC Europe 26th annual meeting, Nantes, France.

Communications affichées :

Vanessa Koehlé-Divo, Bénédicte Sohm, Carole Bertrand, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Sandrine Pain-Devin and Laure Giambérini. "*Corbicula fluminea* gene expression modulated by nCeO₂ exposure and salinity". DocDay, Metz, France, 14 June 2018.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Bertrand, Sandrine Pain-Devin, Bénédicte Sohm, Catherine Mouneyrac, Laure Giambérini. "*Corbicula fluminea* gene expression modulated by nCeO₂ exposure and salinity". S minaire annuel 2018 (RP2E), Nancy, France, 13 February 2018.

Vanessa Koehlé-Divo, Bénédicte Sohm, Carole Bertrand, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Sandrine Pain-Devin and Laure Giambérini. Integrated molecular approach in *C. fluminea* exposed to nCeO₂: a mesocosm study. SETAC North America 38th Annual Meeting Minneapolis, Minnesota, USA, 12-16 November 2017.

Vanessa Koehle-Divo, Carole Bertrand, Sandrine Pain-Devin, Bénédicte Sohm, Simon Devin, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Laure Giambérini. "*Corbicula fluminea* gene expression modulated by nCeO₂ exposure and salinity", SETAC Europe 27th annual meeting, Bruxelles, Belgium, 7-11 May 2017.

Vanessa Koehlé-Divo, Bénédicte Sohm, Carole Bertrand, Mélanie Auffan, Catherine Mouneyrac, Simon Devin, Laure Giambérini. "Mesocosm study: Integrated molecular approach in *C. fluminea* exposed to nCeO₂", Center for Environmental Implications of NanoTechnology (CEINT) internal meeting, Raleigh-Durham, North Carolina, United State of America, 27-28 April 2017.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Bénédicte Sohm, Catherine Mouneyrac, Simon Devin and Laure Giambérini. "Biological effects of CeO₂ nanomaterials on a freshwater bivalve: *Corbicula fluminea*". DocDay (LIEC) Nancy, France, 25 April 2017.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Bénédicte Sohm, Catherine Mouneyrac, Simon Devin and Laure Giambérini. "Effets biologiques des nanomatériaux d'oxyde de cérium sur le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*". Séminaire annuel 2017 (RP2E), Nancy, France, 2 January 2017.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Bénédicte Sohm, Catherine Mouneyrac, Simon Devin and Laure Giambérini. "Genotoxic and physiological effects of nCeO₂ on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)". SEFA, Reims, France, 29-30 June 2016.

Vanessa Koehlé-Divo, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Bénédicte Sohm, Catherine Mouneyrac, Simon Devin and Laure Giamberini. "Genotoxic and physiological effects of nCeO₂ on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)". DocDay, Metz, France 19 April 2016.

Vanessa Koehlé-Divo, Cécile Simonin, Carole Bertrand, Carole Cossu-Leguille, Sandrine Pain-Devin, Bénédicte Sohm and Laure Giambérini. "Genotoxic and physiological effects of nCeO₂ on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)", SETAC Europe 26th Annual Meeting, Nantes, 22-26 May 2016.

Vanessa Koehlé-Divo, Cécile Simonin, Sandrine Pain-Devin, Carole Bertrand, Carole Cossu-Leguille, Bénédicte Sohm, Laure Giambérini, "Genotoxic and physiological effects of nCeO₂ on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)". International Workshop: Engineered Nanoparticles in Environmental Systems: Fate, Transport, Effects and Analytics, Landau, Germany, 20-21 October 2016.

Autres informations:

Langues: Anglais (B2) Allemand (A2), Espagnol (A1), Luxembourgeois (A1)

Informatique: Pack Microsoft Office, logiciels R et R studio, StepOne Software Plus v2.3

Permis : Permis B

INTRODUCTION

Les avancées technologiques de ces dernières décennies ont permis d'accroître la synthèse et l'utilisation des matériaux à l'échelle du nanomètre (10^{-9} mètres) et ont ainsi mené à l'essor des nanotechnologies. Les progrès associés à ces technologies ont conduit à l'incorporation de matériaux de très petite taille dans les produits d'usage courant à disposition du public. De nos jours, les nanomatériaux (NM) sont retrouvés dans de très nombreux secteurs (optique, électronique, agro-alimentaire, médical) pour les propriétés remarquables qui leur sont associées. Le nombre de produits en contenant est passé de 54 en 2005 à 1814 en 2014 et ne cesse de croître depuis (Vance et al., 2015). L'incorporation de NM dans les produits entraîne un possible rejet dans l'environnement tout au long de leur cycle de vie, depuis leur synthèse, leur transport, leur stockage, leur utilisation et même lors de leur fin de vie (mise en décharge, recyclage). Pourtant, les méthodes analytiques actuelles ne sont pas encore adaptées à la mesure de leur concentration dans l'environnement qui est en conséquence prédite par des efforts de modélisation. Les NM vont se retrouver et s'accumuler dans les différents compartiments environnementaux (aérien, terrestre, aquatique), dans lesquels l'augmentation de leur concentration pourrait mener à des effets néfastes sur les écosystèmes. L'écosystème aquatique étant l'ultime réceptacle des nombreux contaminants (Amiard-Triquet et al., 2015), ce compartiment serait plus à risque sur le long terme. La complexité des milieux aquatiques naturels (pH, ions, salinité, UV, oxygène...) ainsi que les transformations subies par les NM tout au long de leur cycle de vie sont des paramètres à prendre en compte dans la compréhension de leur devenir et de leur comportement, car ils vont impacter leur biodisponibilité et leur toxicité envers les organismes aquatiques. Malgré la littérature abondante mais parfois contradictoire, il demeure nécessaire de continuer à évaluer le risque posé par les NM pour l'homme et l'environnement particulièrement dans la cadre de situations d'exposition complexes proche du milieu naturel.

Dans ce contexte, trois laboratoires Français situés à Metz (LIEC), à Angers-Nantes (MMS) et à Aix en Provence (CEREGE) se sont associés afin de développer le programme de recherche ANR NanoSALT (2013-2017). Ce projet consiste à (i) mettre en place des protocoles de vieillissement de nanoproduits (NAP) et d'étudier leurs transformations physico-chimiques à différentes salinités, (ii) estimer leurs effets et devenir le long d'un gradient de salinité dans différents scénarios d'exposition (microcosmes et mésocosmes) et (iii) évaluer leurs effets

écophysiologiques et écotoxicologiques chez deux espèces de bivalves endobenthiques (*Corbicula fluminea* et *Scrobicularia plana*) à travers un gradient de salinité. Une première thèse (Carole Bertrand, 2013-2016) a été effectuée dans le cadre de ce projet afin de déterminer les effets écotoxicologiques des NM et NAP d'argent (Ag) et de dioxyde de cérium (CeO₂) à différentes étapes de leur cycle de vie. La combinaison de marqueurs biochimiques et comportementaux a été utilisée afin d'évaluer ces effets et s'est révélée particulièrement pertinente dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental posé par les NM et NAP. La présente thèse reprend la suite de ces premiers travaux en abordant à nouveaux les CeO₂ NM et NAP avec de nouveaux outils d'investigation à l'échelle moléculaire (outils « -omiques ») chez *C. fluminea*. Cette démarche a ensuite été appliquée au cas des NM et NAP d'oxyde de cuivre (CuO). L'ajout d'un niveau de mesures biologiques à cette échelle devrait permettre une détection plus précoce des effets et fournir des explications mécanistiques plus poussées de leur mode d'action toxique. Actuellement, peu d'études ont adopté une approche utilisant les outils -omiques pour évaluer les effets des NM chez des espèces non séquencées telle que *C. fluminea*. L'objectif de ce travail de thèse est alors d'évaluer le devenir et les effets de NM et de NAP à différentes salinités à travers l'utilisation d'approches intégrées physiologiques et cellulaires pour les deux espèces (*C. fluminea* et *S. plana*), et complétées par une approche moléculaire chez *C. fluminea*.

Les effets des CeO₂ NM et des CuO NM ont dans un premier temps été évalués suite à des expositions relativement simples en microcosmes (colonne d'eau) sur du court terme (< 6 jours), puis lors d'expositions plus complexes à travers la mise en place de mésocosmes (colonne d'eau, sédiment, biote), sur des temps pouvant atteindre un mois et à travers l'utilisation de différentes formes de NM (NM ou NAP). Les concentrations sélectionnées (µg/L) sont proches de celles estimées pour l'environnement tout en restant quantifiables dans les différents dispositifs ou bien tentent de mimer des scénarios potentiellement à risque.

Ce manuscrit de thèse est structuré en cinq chapitres. Le chapitre I présente le contexte scientifique et permet d'introduire la problématique globale associée aux NM ainsi que le devenir et les effets des CeO₂ NM et des CuO NM dans les écosystèmes aquatiques.

Le chapitre II présente la démarche scientifique adoptée et apporte des informations sur les espèces et sur les différents marqueurs étudiés au cours de cette thèse.

L'ensemble des résultats est présenté dans les Chapitres III et IV qui sont articulés autour des manuscrits publiés, soumis ou en cours de rédaction et qui correspondent aux observations relatives aux CeO₂ NM et aux CuO NM respectivement.

Dans le chapitre III consacré aux CeO₂ NM, la première partie vise à évaluer les effets de différentes concentrations de CeO₂ NM chez *C. fluminea* exposée sur du court terme en microcosmes (Publication n°1). La seconde partie est consacrée à l'évaluation des effets de ces CeO₂ NM et de CeO₂ NM extraits de NAP (additif à carburant, Envirox™) ayant subi ou non un vieillissement. Pour cela, *C. fluminea* a été exposée en mésocosmes à deux salinités pendant 28 jours (publication n°2).

Dans le chapitre IV consacré aux CuO NM, la première partie vise à évaluer les effets de différentes concentrations de CuO NM ayant différentes tailles (12 et 30 nm) chez *C. fluminea* exposée sur du court terme en microcosmes (publication n°3). La seconde partie est consacrée à l'évaluation des effets de CuO NM chez *C. fluminea* et chez *S. plana* exposées en mésocosmes pendant 28 jours à des CuO NM et CuO NAP (publication n°4).

Le chapitre V est consacré à une discussion générale dans laquelle l'ensemble des résultats obtenus sont mis en perspective et discutés. Les approches moléculaires et multi-marqueurs sont tout d'abord discutées et permettront de poursuivre sur la mise en évidence des principaux effets mesurés au cours de ces travaux. Nous terminerons par une réflexion portant sur les intérêts et les inconvénients de la prise en compte des NM sous leurs différentes formes ainsi que de la mise en place de mésocosmes pour l'évaluation du risque des NM.

Chapitre I : Contexte scientifique

A. Les nanomatériaux manufacturés

1. Origines et définitions

Les nanomatériaux (NM) sont des matériaux qui se retrouvent à l'échelle du nanomètre. Ils existent naturellement dans l'environnement et sont présents dans les différentes sphères de la Terre (hydrosphère, atmosphère, lithosphère et biosphère). Ils peuvent être produits aussi bien par des processus géologiques (éruptions volcaniques, érosion, feux de forêt...) que par les organismes vivants (protéines, ADN, ARN, pollen...) (Jeevanandam et al., 2018). De ce fait, les organismes vivants sont depuis toujours exposés à des NM. L'activité des Hommes contribue à augmenter leurs concentrations dans l'environnement naturel du fait de leur production non-intentionnelle et intentionnelle. Une production non-intentionnelle peut être générée *via* de nombreux processus anthropogéniques tels que des procédés de combustion, lors de l'utilisation de véhicules ou dans la fabrication de produits chimiques. Ils sont également produits de façon intentionnelle et sont alors appelés « nanomatériaux manufacturés » (NMM). La synthèse de NMM contribue à l'augmentation de leur concentration dans l'environnement, mais également à l'introduction de nouvelles formes de NM qui n'existent pas de façon naturelle. Leur devenir et leur toxicité vis-à-vis de l'homme et de l'environnement sont donc préoccupants.

Un consensus n'existe pas encore (Anses, 2014) mais les définitions actuelles s'accordent sur le fait qu'un nanomatériau a une taille inférieure à 100 nm pour une ou plusieurs de ses dimensions externes. La plupart pose une limite inférieure (à 1 nm) afin d'éviter d'inclure les atomes (Anses, 2014). Ainsi, un nanomatériau se situe à l'échelle des protéines et de l'ADN (Figure 1).

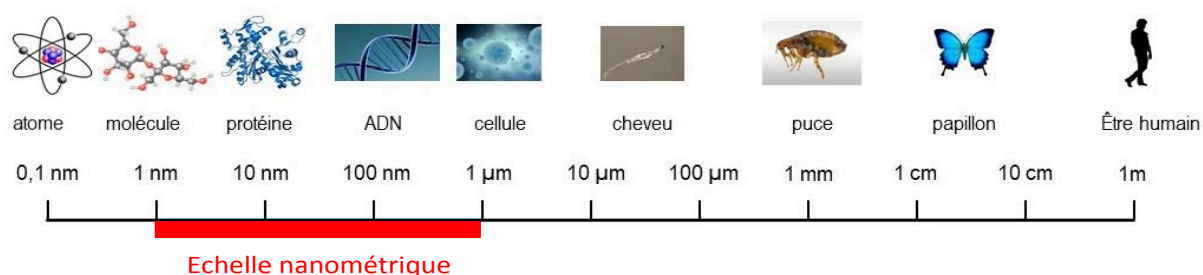


Figure 1 : Echelle de taille du vivant (adapté de www.assef-asso.fr).

L'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) a défini un nanomatériau comme étant « un matériau ayant une dimension externe à l'échelle nanométrique ou ayant une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique » (ISO TS 80004-1: 2015). Ici, l'échelle nanométrique s'étend de 1 nm à 100 nm. Cette définition englobe tous les types de nanomatériaux (naturels, accidentels et manufacturés). C'est pourquoi, il existe une définition spécifique des nanomatériaux manufacturés. Ainsi, NMM est un nanomatériau intentionnellement produit pour avoir des propriétés choisies ou une composition choisie (ISO TS 8004-1: 2015). Le terme de nanoproduct a été adopté par l'Agence nationale de sécurité de l'alimentation (Anses) afin de définir un produit qui contient des NMM (Anses, 2014). La figure 2 reprend l'ensemble de ces définitions. Plus récemment, le terme NOAA (Nano-Objets, leurs Agglomérats et leurs Agrégats) a été employé afin d'englober les structures agrégées ou agglomérées, y compris avec des tailles de plus de 100 nm (ISO-TR 18637, 2016 ; ISO-TR 19601, 2017).

ISO TS 80004-1: 2015	Nanoplaque  1 dimension externe à l'échelle nanométrique	Nanofibre  2 dimensions externes à l'échelle nanométrique	Nanoparticule  3 dimensions externes à l'échelle nanométrique	Origine naturelle ou anthropique
	Nano-Objet au moins une des dimensions externes à l'échelle nanométrique			
	Nanomatériau une dimension externe à l'échelle nanométrique ou ayant une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique			
Anses 2014	Nanomatériau manufacturé nanomatériau intentionnellement produit pour avoir des propriétés choisies ou une composition choisie			Origine anthropique
	Nanoproduit produit qui contient des nanomatériaux manufacturés			

Figure 2 : Définitions relatives aux nanomatériaux selon l'Organisation internationale de normalisation (ISO, 2015) et l'Anses (2015).

2. Production, développement et utilisations des nanomatériaux manufacturés

La première utilisation des nanomatériaux par les Hommes a été rapportée au 10^e siècle comme pigment dans la coloration de certains pots en céramique. C'est pourtant dans les années 1974 que le terme « nanotechnologies » a vu le jour grâce aux progrès réalisés dans les techniques d'imagerie, notamment *via* l'invention du microscope à effet tunnel et du microscope à force atomique (Hochella et al., 2002). Ce terme englobe les technologies relatives aux techniques de fabrication, de manipulation et de caractérisation de la matière à l'échelle nanométrique. La compréhension du monde à cette échelle (nanomonde) n'a cessé d'augmenter depuis ce jour et a permis de mieux contrôler les différentes propriétés des NM synthétisés.

Ces découvertes permettent la synthèse de nanomatériaux *via* différentes approches. L'approche « bottom-up », dite ascendante, permet la synthèse des NM à partir d'un assemblage d'atomes ou de molécules, tandis que l'approche « top-down », ou descendante, permet la formation de NM par fragmentation d'un matériau macrométrique. Ces techniques de production sont illustrées dans la figure 3.

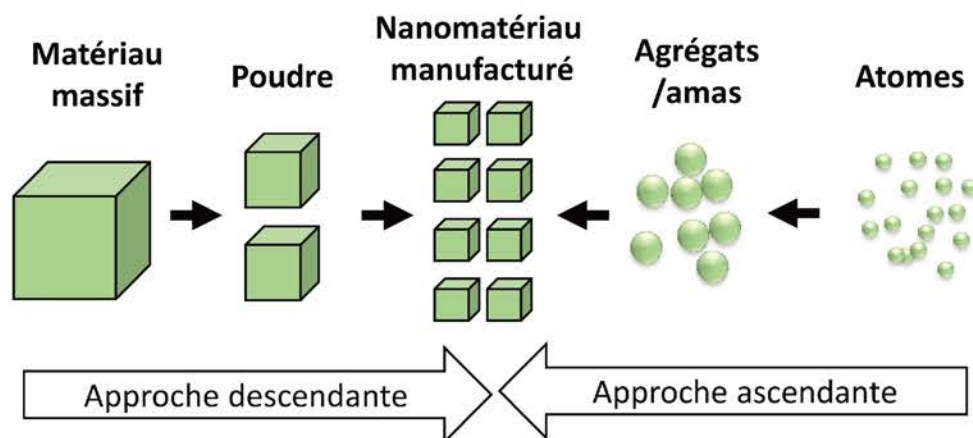


Figure 3 : Présentation des deux techniques de fabrication des nanomatériaux manufacturés (adaptée de Runowski et al., 2014).

La diminution de taille des particules mène à une augmentation de leur aire de surface spécifique pour une même masse, comme le montre la figure 4. Ceci augmente en conséquence le nombre d'atomes à leur surface et permet ainsi une plus grande réactivité ainsi que l'apparition de nouvelles propriétés comparées au matériau massif. Par exemple, des matériaux tels que l'or (Au), l'argent (Ag) ou la palladium (Pd) peuvent présenter des propriétés optiques différentes à l'échelle nanométrique (Khan et al., 2017). Ainsi, en dessous

d'une certaine taille, il n'est pas possible de déterminer quelles seront les propriétés d'un nanomatériau en se basant sur celles du composé massif.

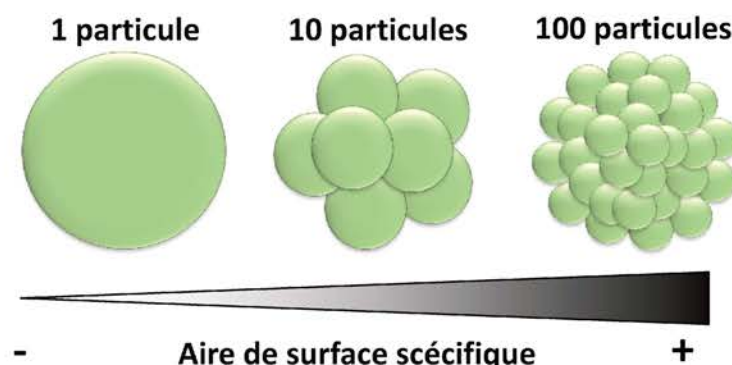


Figure 4 : Illustration des modifications de l'aire de surface en fonction de la taille des nanomatériaux à masse constante (adapté de Klaine et al., 2012).

Le contrôle de ces procédés de fabrication permet de modifier de nombreux paramètres (taille, forme, composition, enrobage) et peut conduire ainsi à la création de NM aux caractéristiques très diverses. Cette grande diversité rend possible leur utilisation dans des domaines très variés. Ainsi, on les retrouve majoritairement dans le domaine de la santé et du bien-être mais aussi dans de nombreux autres secteurs (figure 5). La grande diversité d'utilisation de NM a conduit à leur rapide expansion: alors que 54 produits en contenaient en 2005, on en recense 1814 en 2014. Dans la plus grande partie des produits (37%), on retrouve des NM métalliques ou d'oxydes métalliques (Vance et al., 2015).

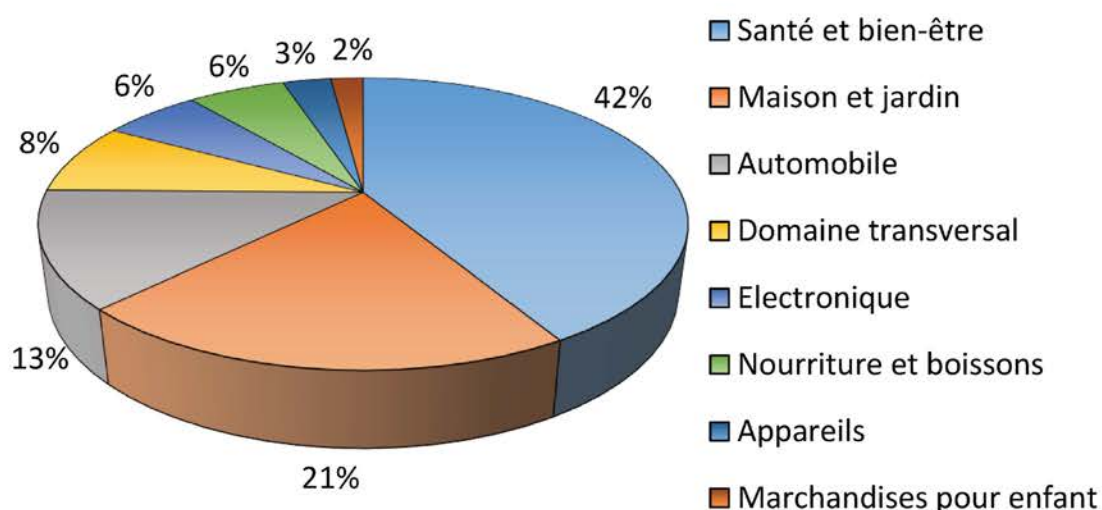


Figure 5 : Secteurs utilisant des nanoproducts (adapté de Vance et al., 2015).

Bien que la connaissance de leur quantité de production soit essentielle pour l'estimation des niveaux d'exposition, ces données ne sont encore pas complètes et semblent dépendantes des différentes définitions appliquées pour effectuer les déclarations. Il a été estimé que 2000 tonnes ont été produites en 2004 contre 58 000 tonnes qui seront produites entre 2011 et 2020 (Maynard, 2006). Cette augmentation de production devrait mener tôt ou tard à une exposition des Hommes et de l'environnement à des NMM. C'est pourquoi, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) a listé en 2006 différents nanomatériaux (Fullerènes (C60)¹, nanotubes de carbone (SWCNT² et MWCNT³), Ag, Fe, TiO₂, AlO, CeO₂, ZnO, SiO₂, Au NM, dendrimères, nano-argile) se retrouvant, ou allant se retrouver dans le commerce afin d'augmenter les connaissances à leur sujet (OCDE, 2011). Ces NMM diffèrent non seulement en terme de composition, mais également en terme de physico-chimies pour des NMM de même composition (taille, forme, enrobage...). Ces différences agissent sur leurs interactions avec l'environnement et peuvent mener à des mécanismes toxiques différents. En conséquence, les impacts sur l'homme et l'environnement en seront directement dépendants. C'est pourquoi le Joint Research Center (JRC) propose des nanomatériaux de référence dans un but d'améliorer la comparabilité des résultats entre laboratoires et projets de recherche (Singh et al., 2014). L'un d'entre eux a été utilisé dans le cadre de cette thèse : les NMM de dioxyde de cérium (NM-212).

3. Devenir des nanomatériaux dans l'environnement aquatique

Le dosage de nanomatériaux dans l'environnement est généralement impossible du fait du manque de technique analytique appropriée (Bundschuh et al., 2018; Collin et al., 2014). De nombreux efforts de modélisation ont toutefois été réalisés afin d'estimer les concentrations rejetées et présentes dans l'environnement au niveau global, régional et/ou local dans les différents compartiments (aérien, terrestre, aquatique) (Gottschalk et al., 2013; 2015 ; Keller et Lazareva, 2014 ; Wang et Nowack, 2018a, 2018b et références citées). Les informations disponibles concernant le volume de production sont toutefois encore largement insuffisantes et induisent des incertitudes dans les prédictions des modèles (Bundschuh et al., 2018). Les rejets ou les concentrations environnementales prédites (PEC : Predictive Environmental

¹ Fullerènes (C60) : nanomatériau manufacturé composé de carbone, possède une forme sphérique creuse.

² SWCNT : nanotubes de carbone simple feuille (Single-Walled Carbon NanoTube)

³ MWCNT : nanotube de carbone multi-feuillets (Multi-Walled Carbon NanoTube)

Concentration) ont été estimés pour les TiO_2 , ZnO , Ag, fullerènes, nanotubes de carbone (CNT), CeO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 , CuCO_3 , noir de carbone, nano-argiles, oxydes de fer NM (Gottschalk et al., 2013, 2015; Keller et Lazareva, 2014, Keller et al., 2013 ; O'Brien and Cummins, 2011, Wang et Nowack, 2018b et références citées). En général, les sols et les sédiments constituent les réceptacles majeurs de ces contaminations. Dans l'environnement aquatique, les PEC estimées sont généralement de l'ordre du fg/L au $\mu\text{g/L}$ dans les eaux de surfaces et de l'ordre du ng/kg au mg/kg dans les sédiments. Les modélisations ont été réalisées non seulement grâce à l'augmentation des données concernant les volumes de production de NMM mais également grâce à l'évaluation de leur comportement dans les différents compartiments.

Le comportement et le devenir des nanomatériaux dans l'environnement aquatique ont été largement étudiés ces dernières décennies et sont discutés et détaillés dans plusieurs revues scientifiques (Bundschuh et al., 2018 ; Peng et al., 2017 ; Garner et al., 2014 ; Batley et al., 2011, Rocha et al., 2015). La figure 6 illustre certains procédés qui influencent le comportement et le devenir des NM, et qui sont discutés ci-dessous.

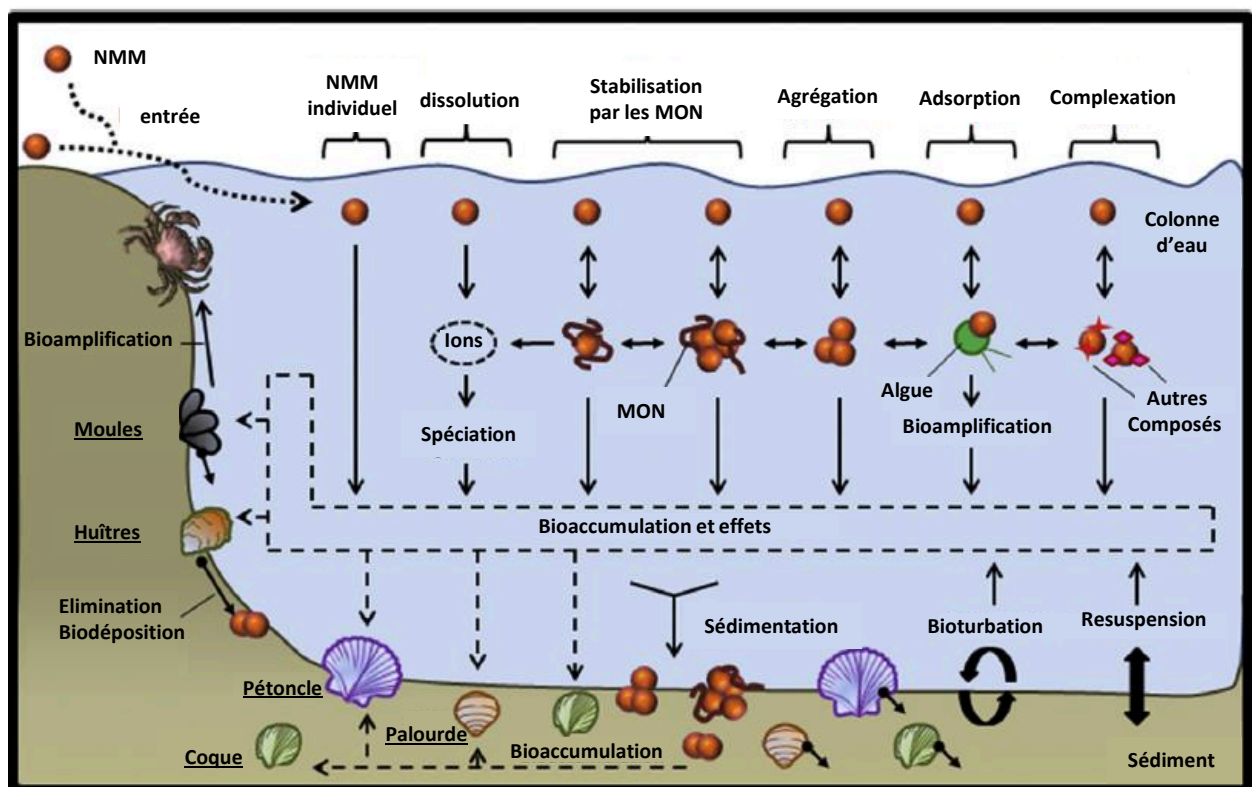


Figure 6 : Comportement et devenir des NMM dans l'environnement aquatique. (Figure adaptée de Rocha et al., 2015). MON = matière organique naturelle

Compte tenu de la réactivité des NM, de nombreux paramètres peuvent influencer leurs propriétés, devenir, transport, réactivité, biodisponibilité et toxicité (Peng et al., 2017). Dans l'environnement aquatique, ils ont tendance à s'hétéro-agréger en raison de la complexité du milieu aquatique naturel (ions, autres polluants, organismes...). Une association des NM entre eux est possible (homo-agrégation) mais est généralement observée dans des milieux simples et/ou avec des concentrations élevées, ce qui est peu représentatif de l'environnement naturel (Baker et al., 2014). L'agrégation est responsable d'une augmentation de taille, qui peut réduire l'aire de surface et altérer le transport et les interactions biologiques des NM. Ces phénomènes d'association sont dus aux différentes charges portées par les NM et les composés environnants. L'évaluation du potentiel zéta de NM en solution permet de mettre en évidence leur stabilité ou leur instabilité dans le milieu. Ainsi, un potentiel zéta proche de 0 mV indiquera une forte instabilité, tandis qu'un potentiel zéta de +30 ou -30 mV indiquera une suspension stable. Ce potentiel change en fonction de la composition du milieu (pH, électrolytes...) dans lequel les NM sont mis en solution. Il existe également une valeur de pH pour laquelle les charges des particules sont nulles qui s'appelle le point de charge nulle (PCN). C'est à ce pH que l'agrégation des NM est la plus forte. Des composés environnementaux tels que la matière organique naturelle (MON) ou la charge ionique peuvent également augmenter ou réduire leur stabilité en fonction de leur concentration et composition (Bundschuh et al., 2018 ; Baker et al. 2014). Il est possible de créer des particules plus stables en solution en leur procurant une stabilisation électrostatique ou stérique. L'agrégation des NM conduit généralement à leur sédimentation, ce qui favorise l'exposition des organismes benthiques par rapport à ceux de la colonne d'eau. Ces organismes peuvent alors bioaccumuler, transformer, emballer et resuspendre les NMM dans l'environnement aquatique, permettant leur transfert le long de la chaîne trophique (Baker et al., 2014 ; Hull et al., 2011, Rocha et al., 2015).

La complexité du milieu naturel influence également le potentiel de dissolution des NMM. Certains nanomatériaux tels que les nanomatériaux d'argent (Ag NM) et d'oxyde de zinc (ZnO NM) ont un fort potentiel de dissolution tandis les nanomatériaux de dioxyde de cérium (CeO₂ NM) sont considérés comme pratiquement insolubles en milieu aquatique (Garner et Keller, 2014 ; Collins et al., 2014). La dissolution semble favorisée par la taille des NM, les plus petits ayant tendance à se dissoudre plus rapidement. De même, d'autres paramètres physico-

chimiques tels que la forme et l'enrobage peuvent affecter la dissolution (Peng et al., 2017). Des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, la présence de sels, de MON ou de dioxygène influencent également ce paramètre.

Les NM peuvent être libérés dans l'environnement durant toutes les étapes de leur cycle de vie, depuis leur production, leur transport, leur stockage, leur utilisation jusqu'à leur mise en décharge (Bundschuh et al., 2018). Les transformations liées à leur cycle de vie mènent à l'introduction de différentes formes de NM dans l'environnement en fonction du vieillissement et du traitement qu'ils auront subi. Par exemple, différents auteurs ont étudié les transformations subies par des CeO₂ NM issus d'un additif à carburant (Envirox™) au cours de son utilisation. Les conditions rencontrées lors de leur passage dans le moteur (pression, température) ont mené à des modifications physico-chimiques qui impactent leur devenir et leur toxicité (Auffan et al., 2017 ; Batley et al., 2013 ; Dale et al., 2017).

Ainsi, le devenir des NM dans l'environnement aquatique est fortement dépendant non seulement des caractéristiques intrinsèques aux NM (taille, forme, enrobage, agrégation, solubilité, composition chimique...), mais également de celles du milieu environnant (température, pH, force ionique, présence de colloïdes organiques...), de leur vieillissement (exposition aux UV, combustion...) et de l'activité biologique des organismes vivants.

4. Ecotoxicité des nanomatériaux envers les organismes aquatiques

Compte tenu des multiples propriétés conférées aux NM, leur rejet dans l'environnement aquatique pourrait mener à un risque nouveau. Le nombre d'études visant à évaluer leur potentiel toxique sur les organismes aquatiques a augmenté ces dernières décennies. La figure 7 recense les travaux publiés suite à une analyse bibliométrique. Elles décrivent les effets des nanomatériaux qui ont été évalués à différents niveaux d'organisation biologique chez les bactéries, les algues, les crustacés, les mollusques, les vers, les poissons et les plantes aquatiques.

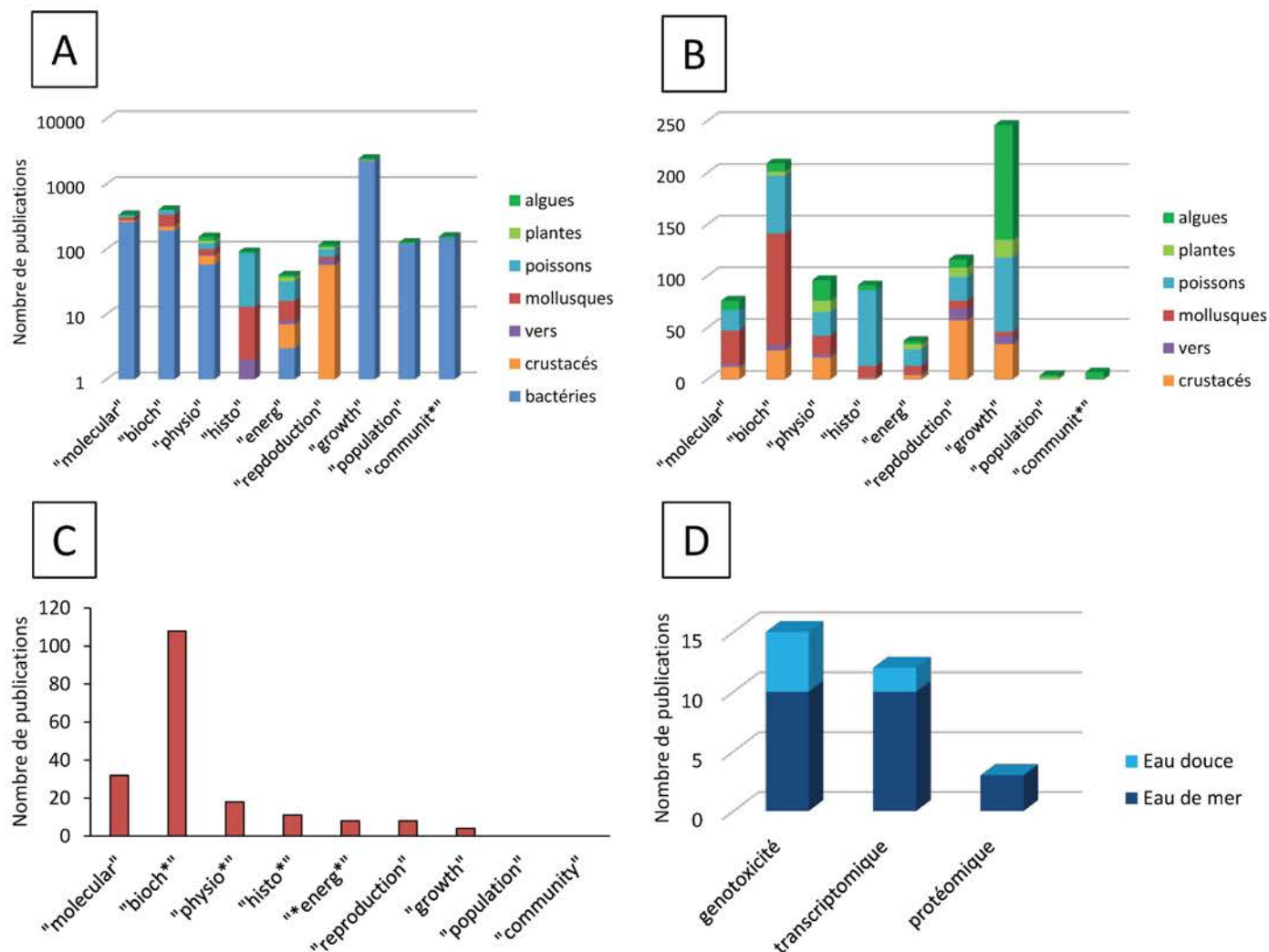


Figure 7 : Nombre de publications sur l'évaluation de la toxicité des nanomatériaux (recherche WoS du 20/09/2018). A) Nombre de publications en fonction du niveau biologique chez les espèces aquatiques et B) uniquement chez les eucaryotes. C) Nombre de publications en fonction du niveau biologique chez les mollusques. D) Répartition des publications présentant une approche moléculaire concernant les espèces de bivalves.

Les bactéries constituent le groupe majoritairement étudié au niveau moléculaire, biochimique, physiologique, populationnel, communautaire (Figure 7A). Si on excepte les travaux sur bactéries (Figure 7B), on constate que les plus hauts niveaux d'organisation biologique (population et communauté) ne font l'objet que de très peu d'études sur les eucaryotes. Les plantes aquatiques et les vers sont largement sous représentés à chaque échelle de mesure. Les organismes utilisés lors de tests normalisés d'écotoxicologie tels que les poissons, *Danio rerio*, les crustacés, *Daphnia magna* et les algues, *Chlorella sp.* sont les plus représentés et ont généralement été exposés à des concentrations très élevées d'un point de vue environnemental (> 1 mg/L). Le groupe des mollusques (Figure 7C) a été étudié à chacun des niveaux suivis excepté le niveau populationnel et communautaire.

Parmi les mollusques étudiés, les bivalves sont majoritaires et notamment le genre *Mytilus*. La plupart des études a été menée au niveau biochimique *via* la mesure de biomarqueurs cellulaires tels que les activités enzymatiques antioxydantes et détoxifiantes ainsi qu'à travers l'évaluation des dommages cellulaires. Les études sont plus rares dans les échelles supérieures (physiologique, énergétique, reproduction et croissance) et inférieures (moléculaires).

Ces études ont permis d'approfondir nos connaissances sur l'impact de l'exposition de ces organismes aux NM. Il a notamment été démontré que la filtration, un processus clé dans la survie des bivalves leur permettant de se nourrir et de respirer, peut être affectée par la présence de NM. Certains bivalves tels que *Corbicula fluminea* semblent capables filtrer plus efficacement les NM de plus grande taille (Hull et al, 2011). Cette étude ayant été réalisée en utilisant des NM enrobées, leur agglomération/agrégation était réduite. D'autres auteurs ont montré une filtration plus efficace des NM agrégés chez *Crassostrea virginica* et *Mytilus edulis* (Ward et Kach, 2009). Une filtration plus efficace peut mener à une accumulation plus importante des NM dans les organismes. Ainsi, de nombreuses études rapportent une bioaccumulation de NM de deux à quatre fois supérieure chez les bivalves exposés par rapport aux témoins (Buffet et al., 2011, 2013 ; Pan et al., 2012, Gomes et al., 2011, 2012, 2014b ; Fan et al., 2018 ; Garaud et al., 2015). La bioaccumulation peut varier avec le type de NM, leur concentration, la physico-chimie du milieu mais également avec les capacités physiologiques des organismes, ce qui peut mener à des observations très distinctes. Garaud et al. (2015, 2016) ont mis en évidence une différence de bioaccumulation en fonction de l'enrobage des NM et du mode de vie des organismes étudiés. Ainsi, les organismes benthiques, vivant à l'interface eau-sédiment comme les gammares, ont nettement plus accumulé les NM que les organismes comme les Dreissènes filtrant la colonne d'eau où le temps de résidence des NM dépend des caractéristiques de l'enrobage. Les NM ont aussi présenté un temps de rétention plus long que leur homologue micrométrique dans les intestins des organismes (Ward et Kach, 2009). Une rétention plus longue peut aboutir à des modifications physico-chimiques des NM (formes, enrobage...) qui se retrouveront dans les fèces (Hull et al., 2011). Les NM peuvent également être rejetés sous forme de pseudofèces (Rocha et al., 2015). Le dépôt de fèces et de pseudofèces conduit à l'accumulation de NM sous diverses formes à la surface sédimentaire et augmente l'accessibilité de ces contaminants pour les organismes limnivores/détritivores.

La présence de NM dans les organismes conduit à des altérations histologiques au niveau d'organes clés tels que les branchies (Moëzzi et al., 2018, Sellami et al., 2017) et la glande digestive (Sellami et al., 2017), et peut alors mener à leur dysfonctionnement. L'entrée de NM métalliques dans les cellules se fait à travers des mécanismes de transport passif (à travers la membrane cellulaire) ou *via* transport actif (endocytose) (Beddoes et al., 2015). Ainsi, les NM peuvent être retrouvés dispersés dans le cytoplasme, associés au cytosquelette ou dans les vésicules endocytiques, dans les lysosomes, dans les mitochondries ou dans le noyau (Rocha et al. 2015 et références citées). L'internalisation des NM dans les lysosomes peut promouvoir leur dissolution du fait du pH acide de ces organites. Ceci conduit au rejet de NM et d'ions dissous dans le cytoplasme des cellules, entraînant des dommages considérables en affectant l'intégrité des composants cellulaires (protéines, ADN...). L'effet majoritaire rapporté est l'induction de stress oxydant qui peut être dû à la fois aux NM eux-mêmes et à leurs ions dissous. L'induction de mécanismes de détoxification et d'apoptose ont également été rapportés ainsi que des dommages membranaires (Katsumiti 2014, 2015; Taze et al., 2016; Buffet et al., 2013 ; Gomes et al. 2011; 2012 ; 2014b). Alors que la majorité des effets ont été observés *via* des expositions peu réalistes en termes de complexité du milieu et de concentrations, certains auteurs ont mis en évidence l'induction d'effets potentiellement délétères même à des concentrations faibles, dans des conditions complexes et sur du long terme (Buffet et al., 2013 ; Garaud et al., 2016, Bertrand, 2016). Bien que les paramètres biochimiques nous donnent des indications sur le mécanisme d'action des NM, des effets plus précoces peuvent être visibles au niveau moléculaire.

Les études menées à l'échelle moléculaire sont encore peu développées chez les mollusques et sont représentées pour 16% par les gastéropodes et 84% par les bivalves. La figure 7D montre plus en détail la proportion d'études menées à l'échelle moléculaire pour les bivalves qui comprend majoritairement des espèces marines du genre *Mytilus*. La majeure partie de ces études a démontré un potentiel génotoxique dans les hémocytes, les branchies et/ou dans la glande digestive de bivalves pour les éléments suivants : CdTe quantum dots ⁴(Gagné et al., 2008), TiO₂ NM (D'agata et al., 2014, Girardello et al., 2016), Ag NM (Katsumiti et al., 2015, Gagné et al., 2013 ; Gomes et al., 2013), ZnO NM (Falfushynska et al., 2015 ; Marisa et al.,

⁴ CdTe quantum dots : nanostructure de semi-conducteurs composée de cadmium-tellurure (CdTe)

2016 ; Fahmy & Sayed, 2017), Fe₂O₃ NM (Taze et al., 2016), Ag₂S et CdS NM (Munari et al., 2014), C60 fullerène (Di et al., 2017), CuO NM (Chelomin et al., 2017, Gomes et al., 2013 ; Buffet et al., 2013). Ces dommages à ADN ont parfois été observés à des concentrations d'exposition relativement faibles (< 20 µg/L) (Chelomin et al., 2017 ; Buffet et al., 2013 ; Gomes et al., 2013) et peuvent être produits par une interaction directe des NM avec l'ADN, ou indirectement par le biais de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) induisant du stress oxydant.

Les études de protéomique et de transcriptomique comparative (témoin/exposé) sont encore peu réalisées chez les mollusques malgré leur sensibilité et la précocité des réponses généralement observées à ces niveaux. Les techniques de protéomique sont très peu utilisées chez les bivalves, notamment en raison de la faible quantité de protéines de bivalves répertoriées dans les bases de données protéiques existantes (Revel et al., 2017). Quelques études ont néanmoins été réalisées chez *Mytilus galloprovincialis* exposée durant 7 jours à 10 µg Cu/L de CuO NM ou 10 µg/L d'Ag NM et ont mis en évidence des mécanismes d'action différents entre les NM et les ions qu'ils relarguent (Gomes et al., 2013, 2014a). La majeure partie des études a été réalisée afin d'évaluer les effets de NM sur l'expression de gènes, qui peut être impactée avant même que les effets puissent être visibles aux échelles supérieures. Lors de l'analyse bibliométrique, un grand nombre d'études est ressorti avec le mot clé « molecular* » mais peu correspondent aux critères de sélection. Le tableau I synthétise brièvement la totalité de ces publications retrouvées qui correspondent à ce critère.

Les NM ont impacté l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses voies, dont les défenses antioxydantes et antitoxiques (MnSOD, Cat, Se-GPx, GSTpi, HSP70, CYP450, MT), les procédés d'excrétion cellulaire (Mrp, Pgp), les canaux ioniques (Na⁺/K⁺ ATPase), le système immunitaire (lysozymes), les dommages cellulaires (p53, TNF-α, Ras) et la réparation de l'ADN (rad51, Gadd45) (D'Agata et al., 2014; Renault et al., 2008, Volland et al., 2015, Garaud et al., 2016, Balbi et al., 2017, Châtel et al., 2018). Une augmentation de l'expression du facteur de nécrose tumorale (TNF-α) a pu être observée suite à une exposition de 24 heures de *Ruditapes philippinarum* à une concentration relativement faible (0,75 µg/L) de Au-Citrate NM sans apparition de dommages oxydatifs (Volland et al.; 2015), ce qui confirme la précocité des réponses à ce niveau d'organisation. La majorité des études a été réalisée sur *M. galloprovincialis* et principalement suite à l'exposition aux NM de dioxyde de titane (TiO₂

NM). Elles ont mis en évidence une modification relativement faible de l'expression des ARNm étudiés (métallothionéines isoforme mt20, abcb-like, abcc-like, MeER2, lyzosymes, TLR-i) (D'Agata et al., 2014, Canesi et al., 2014, Balbi et al., 2014). Cependant, ces études ont été réalisées sur un nombre de gènes restreint. Banni et al. (2016) ont montré des effets significatifs des TiO₂ NM sur 48 gènes, également chez *M. galloprovincialis*, grâce à l'utilisation d'une puce à ADN permettant le criblage de plus de 1500 séquences. Ainsi, le suivi d'un grand nombre de gènes permet une évaluation plus complète des effets et permet ainsi d'affiner les connaissances sur le mécanisme d'action exercé par les NM. Ainsi, l'approche transcriptomique semble être un bon moyen de déterminer de façon rapide, précoce et sensible les effets de NM. Le seul génome de bivalve considéré comme complet est celui d'une espèce marine, *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012). Le nombre de transcrits disponibles sur NCBI pour *Mytilus galloprovincialis* est de 161887 contre seulement 706 pour *Corbicula fluminea* et 108 pour *Scrobicularia plana* (données de décembre 2018). Parmi ces séquences disponibles, de nombreuses codent pour un isoforme, ce qui diminue encore le nombre de voies biologiques qui pourraient être étudiées à partir de ces gènes. Ces restrictions en termes de séquences disponibles réduisent le choix des techniques possibles. Ainsi, une technique quantitative qui cible l'expression des gènes spécifiques au niveau ARN messagers par transcription inverse (RT-qPCR) est la technique la plus utilisée actuellement pour l'évaluation des effets des nanomatériaux chez les bivalves. Cependant, la modification d'expression d'un ARNm n'est pas toujours corrélée à l'expression de la protéine ou à l'activité de l'enzyme de par les différents mécanismes de régulation post-transcriptionnelle qui existent. Ainsi, il est important de compléter des études transcriptionnelles par des analyses à des niveaux biologiques plus élevés.

Tableau I : Publications portant sur l'expression de gènes chez les bivalves (WoS du 21/09/18).

Environnement	Espèce	Nanomatériau	Technique moléculaire	Organe(s)	Auteurs
Eau de mer	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TiO ₂	RT-PCR	Branchie et glande digestive	D'Agata et al., 2014
			RT-PCR	Branchie et glande digestive	Canesi et al., 2014
			RT-PCR	Branchie et glande digestive	Barmo et al., 2013
			Microarray et RT-PCR	Glande digestive	Banni et al., 2016
			RT-PCR	Glande digestive et hémocytes	Balbi et al., 2014
		CuO	RT-PCR	Glande digestive	Ruiz et al., 2015
		CdTe	RT-PCR	Glande digestive et branchies	Rocha et al., 2018
		ZnO	RT-PCR	Glande digestive	Li et al., 2018
		PS-NH ₂	RT-PCR	Larves	Balbi et al., 2017
	<i>Mytilus edulis</i>	CuO	RT-PCR	Branchies et hémolymph	Châtel et al., 2018
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	CuO	RT-PCR	Hémocytes	Volland et al., 2018
		Au-Cit	RT-PCR	Glande digestive	Volland et al., 2015
		C60	RT-PCR	hémocytes, glande digestive, branchies, muscle adducteur, manteau	Di et al., 2017
Eau douce	<i>Tegillarca granosa</i>	TiO ₂	RT-PCR	Branchie	Guan et al., 2018
			RT-PCR	Hémocytes	Shi et al., 2017
	<i>Crassostrea virginica</i>	Ag	RT-PCR	Glande digestive	Ringwood et al., 2010
	<i>Corbicula fluminea</i>	Au	RT-PCR	Branchie et masse viscérale	Renault et al., 2008
	<i>Dreissena polymorpha</i>	CeO ₂	RT-PCR	Branchie	Garaud et al., 2016

B. Cas des nanomatériaux de dioxyde de cérium :

1. Secteur d'utilisation

Les nanomatériaux de dioxyde de cérium ont de nombreuses applications. Par exemple, ils peuvent être incorporés dans les lasures pour protéger les revêtements des rayonnements UVs (Auffan et al., 2014) ou dans les additifs à carburant diesel tels que l'Envirox™ afin de réduire la consommation de carburant et les émissions de particules (Park et al, 2007 ; Wakefield et al., 2008). Ils sont produits à raison de 10 000 tonnes par an (Keller et al., 2013). La figure 8 reprend les principaux secteurs dans lesquels ils sont utilisés. Il s'agit majoritairement du polissage, suivi de leur incorporation dans des additifs à carburant (Wang et Nowack., 2018b).

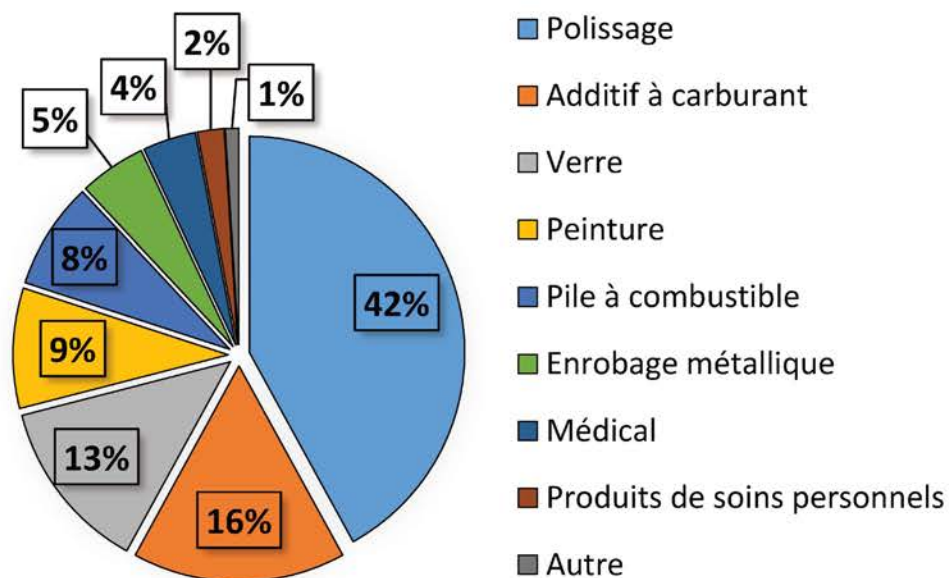


Figure 8 : Proportion d'utilisation de nanomatériaux de dioxyde de cérium en fonction des différents secteurs (adapté de Wang et Nowack, 2018b).

Les nanomatériaux incorporés dans l'additif à carburant Envirox™ ont été sélectionnés pour étudier les effets des nanoproduits contenant des CeO_2 NM dans le cadre de cette thèse.

2. Devenir et comportement dans l'environnement

Le cérium fait partie des lanthanides et est l'élément le plus abondant des terres rares. Il existe sous 3 stades d'oxydation (Ce^{2+} , Ce^{3+} et Ce^{4+}) mais la forme la plus commune est la forme Ce^{4+} . Le cérium est retrouvé en Europe à raison de 2,45 à 267 mg/kg dans les sols (médiane de 48,2),

de <0,002 à 36 µg/L dans l'eau de surface (médiane de 0,055) et de 2,2 à 1080 mg/kg dans le sédiment (médiane de 66,6) (www.gtk.fi/publ/foregsatlas). Il est pratiquement insoluble dans l'eau (Dahle and Arai, 2015). Keller et al. (2013) ont estimé qu'environ 300 tonnes de CeO₂ NM sur les 10 000 tonnes annuelles produites sont rejetées dans le milieu aquatique. Ainsi, les concentrations en CeO₂ NM estimées dans les eaux douces se situent dans les alentours du pg/L jusqu'aux µg/L (O'Brian & Cummins, 2010 ; Liu & Cohen, 2014 ; Gottschalk et al., 2014,2015). Une étude récente a estimé leurs concentrations entre 5,8 et 1830 pg/L en Europe du Nord et entre 23,2 et 5430 pg/L en Europe du Sud-Est (Wang et Nowack 2018b). Cependant, les volumes de production des CeO₂ NM ont augmenté et continueront de croître, augmentant leur quantité dans les produits d'utilisation ainsi que dans les compartiments puits tels que le sol et les sédiments (Wang et Nowack 2018a). Leur faible taux de dissolution suggère également leur persistance sous forme nanoparticulaire sur le long terme.

3. Toxicité envers les organismes aquatiques

Les études sur la toxicité des CeO₂ NM ont indiqué des résultats contradictoires, avec des effets positifs, des effets négatifs mais également l'absence d'effets (Lee et al., 2009 ; Bour et al., 2015 ; Garaud et al., 2015 ; 2016 ; Golbamaki et al., 2015). Le cérium peut passer du stade d'oxydation Ce³⁺ en Ce⁴⁺ et inversement, ce qui lui permet d'acquérir des fonctions réductrices mimant les fonctions d'enzymes biologiques telles que la superoxyde dismutase (SOD) ou la catalase (Cat) (Singh et al., 2016). Une plus forte présence de Ce³⁺ favoriserait une activité mimant l'activité superoxyde dismutase (SOD) tandis qu'une présence plus importante de Ce⁴⁺ favoriserait plutôt l'activité mimant la catalase (Cat). Ainsi, les CeO₂ NM peuvent posséder des activités antioxydantes, ce qui rend possible leur utilisation dans le domaine médical. A l'inverse, les CeO₂ NM semblent aussi capables de générer des ROS et ainsi d'induire des effets pro-oxydants. Une diminution de stabilité des membranes lysosomales hématocytaires, une augmentation de la concentration de ROS et/ou des processus de mort cellulaire ont été mis en évidence suite à l'exposition d'organismes à des CeO₂ NM (Falugi et al., 2012 ; Park et al., 2008). Garaud et al. (2016) ont également mis en évidence une expression réduite des gènes Se-GPx et GSTpi dans les branchies par rapport aux témoins lors d'une exposition à des CeO₂ NM, ce qui pourrait être relié aux capacités antioxydantes de ces nanomatériaux. Les CeO₂ NM peuvent également impacter physiquement les organismes exposés. Une forte adsorption de CeO₂ NM chez *D. magna* a conduit à la diminution de ses capacités de déplacement ou

d'assimilation d'éléments nutritifs, ce qui peut à terme nuire à leur survie (Auffan et al., 2013). Les CeO₂ NM peuvent également interagir directement avec l'ADN lorsqu'ils sont présents dans le noyau cellulaire. Ces interactions conduisent à des perturbations des fonctions de l'ADN (transcription, réplication, réparation) qui sont indispensables au métabolisme normal des cellules vivantes (Peng et al., 2017), et peuvent provoquer des dommages considérables pouvant mener à des phénomènes de génotoxicité.

C. Cas des nanomatériaux d'oxyde de cuivre

1. Secteur d'utilisation

Le cuivre est un métal malléable retrouvé dans la composition de bijoux, d'armes et d'outils. Il présente également une bonne conductivité thermique et électrique, une résistance à la corrosion et des propriétés antibactériennes et antifongiques qui rendent son utilisation intéressante dans des domaines très divers comme l'électronique, l'agriculture, la construction et la médecine. Il fait également partie des éléments essentiels à la survie des organismes et est nécessaire pour le fonctionnement d'enzymes clés (telles que CuZnSOD et le Cytochrome-C-oxydase).

Son utilisation à l'échelle nanoparticulaire a été estimée majoritaire dans le domaine des catalyseurs (68 t/an), suivie de l'électronique et optique (60 t/an), des peintures et pigments (48 t/an) et de différents secteurs impliqués dans l'aérospatial, le domaine médical, les cosmétiques, l'énergie et l'environnement (24 t/an) (Keller et al., 2013). La principale application menant à la contamination du compartiment aquatique proviendrait de leur utilisation dans les peintures et les pigments compte tenu de leur application possible directement dans la matrice receveuse (Keller et al., 2013; 2017). Par exemple, leur incorporation dans les peintures antisalissure pour bateaux mène à leur rejet progressif dans le milieu aquatique (Adeleye et al., 2016). L'incorporation de ces NM dans les peintures permet principalement d'améliorer les capacités antibactériennes et antifongiques des produits, menant ainsi à des rejets de biocides dans l'environnement. Compte tenu du peu d'informations disponibles quant à l'évaluation du risque de ces NM, la réglementation sur les produits biocides (RPB) permet leur incorporation dans les produits d'usage courant et entraîne ainsi une exposition de l'homme et de l'environnement à des substances potentiellement toxiques (Brinch et al., 2016). Dans ce contexte, une évaluation des effets de

CuO NM contenue dans des peintures a été réalisée à différents stades de leur cycle de vie dans le cadre de cette thèse.

2. Comportement dans l'environnement

Le cuivre (Cu) peut présenter quatre états d'oxydation : le cuivre élémentaire (Cu ; métal solide) ; l'ion cuivreux (Cu(I), Cu^+), l'ion cuivrique ou cuprique (Cu(II), Cu^{2+}) et plus rarement la forme de Cu(III) (Cu^{3+}). Il est principalement retrouvé dans les eaux sous la forme Cu^{2+} et Cu^+ mais le Cu^+ est moins stable et a tendance à devenir du Cu^{2+} . Ces deux formes de cuivre sont considérées comme biodisponibles. Cependant, le cuivre peut se retrouver sous forme complexée dans les eaux naturelles, et notamment dans les eaux marines du fait de la forte présence d'ions avec lesquels il va pouvoir se lier, modifiant ainsi sa biodisponibilité pour les organismes aquatiques.

Les concentrations environnementales des nanomatériaux à base de cuivre ont été estimées comme faibles (ng à $\mu\text{g/L}$) dans les eaux de surface, mais elles pourraient atteindre localement des concentrations assez élevées pour mener à de la toxicité (Keller et Lazareva, 2014 ; Keller et al., 2017). Les nanomatériaux d'oxyde de cuivre peuvent, comme les autres NM, subir des transformations telles que l'agrégation, la sédimentation et la dissolution. Leur dissolution augmente lorsque le pH diminue et lorsque la force ionique et la concentration en MON augmentent (Peng et al., 2017). Ainsi, la dissolution de CuO NM est relativement faible (< 1%) à pH environnemental (pH 7-8), tandis qu'elle peut atteindre une forte dissolution au pH acide d'organites cellulaires comme les lysosomes (> 50% à pH=3-4) (Keller et al., 2017; Peng et al., 2017). Elle est également augmentée en présence d'une forte force ionique, notamment de NaCl, mais est dépendante des électrolytes en solution. Elle est également dépendante du type de MON. L'agrégation et la sédimentation sont plus importantes à pH isoélectrique, ainsi qu'à force ionique élevée, tandis qu'elles sont réduites en présence de MON (Peng et al., 2017). Ainsi, de nombreux paramètres influencent le devenir des nanomatériaux de Cu dans l'environnement, et ainsi leur biodisponibilité et leur potentiel toxique.

3. Toxicité envers les organismes aquatiques

Les CuO NM affectent les organismes à différents niveaux d'observation, du niveau populationnel en affectant la reproduction (Adam et al., 2015), au niveau individuel en affectant la physiologie des organismes et leurs réponses cellulaires (Buffet et al., 2011, 2013; Hanna et al., 2014; Gomes et al., 2012 ; Ruiz et al., 2015 ; Pang et al., 2013) et moléculaires (Gomes et al., 2013; 2014b). Compte-tenu des multiples interactions et modifications de milieu (pH, composition en ions, protéines, etc...) ayant lieu au niveau des interfaces biologiques, il est difficile de déterminer si la part de toxicité est due uniquement à la forme nanoparticulaire ou à son produit de dissolution. D'après certaines études, les effets toxiques observés résultent des ions issus de la dissolution des NM de cuivre uniquement (Jo et al, 2012; Blinova et al, 2010 ; Aruoja et al, 2009; Tavares et al, 2014). D'autres avancent que la toxicité serait due à la fois aux NM eux-mêmes et aux ions issus de leurs dissolution (Kasemets et al, 2009), ou encore seulement aux NM eux-mêmes (Hua et al, 2014 ; Baek et al, 2011). Les observations divergent, mais les modèles d'études ainsi que les matériels et techniques d'études sont eux aussi très variés. Une approche moléculaire réalisée sur des bivalves exposés à de faibles concentrations de CuO NM (10 µg Cu/L) a montré que ces deux formes (nanoparticulaire et ionique) n'induisent pas les mêmes réponses, ce qui suggère un mécanisme d'action différent selon la forme utilisée (Gomes et al., 2014b). Les observations sont aussi en accord quant à la toxicité du cuivre ionique et nanoparticulaire qui paraît plus importante que le cuivre micro- et macrométrique (Kaweeteerawat et al, 2015 ; Aruoja et al, 2009).

Le CuO peut être internalisé à la fois sous forme ionique *via* des canaux spécifiques, et sous forme nanoparticulaire *via* des mécanismes de transports passifs ou *via* des phénomènes d'endocytose. Les différentes formes de cuivre peuvent alors réagir avec les composés cytosoliques ainsi qu'avec les organites cellulaires et les endommager et/ou mener à une induction de ROS. Le cuivre génère également des ROS *via* la réaction de Fenton qui conduit à la formation de radicaux hydroxyles (HO[•]) très réactifs. Des défenses se mettent alors en place pour contrer ce stress mais des dommages peuvent malgré tout être observés si ces défenses ne sont pas suffisantes. Chez les bivalves *M. galloprovincialis* et *S. plana* exposés pendant 14 à 15 jours à 10 µg Cu/L de CuO NM, des défenses antioxydantes (SOD, Cat, GPx) et antitoxiques (GST), des protéines reliées à l'homéostasie des métaux (MT) et le

métabolisme énergétique (lactate déshydrogénase) ont été sollicités, mais n'ont pas toujours été suffisants pour contrer des dommages tels que l'endommagement des membranes (peroxydation lipidique), la neurotoxicité (inhibition de l'acétylcholinestérase), l'apoptose (caspase-3) ou la génotoxicité (test des comètes) (Gomes et al., 2011, 2012, 2013 ; Buffet et al., 2011, 2013). Des anomalies de croissance et/ou de développement ont également été mises en évidence chez différentes espèces de poisson (Ostaszewsk et al., 2016; Song et al., 2015).

Au niveau transcriptionnel, des gènes codant pour des protéines impliquées dans le cytosquelette (actine et β -tubuline), le stress oxydant et toxique (GST, SOD), l'homéostasie des métaux (MT), le stress général (HSP70) et dans la réparation à l'ADN (gadd45, Rad51) présentent des expressions modifiées chez *M. edulis*. D'après ces résultats, l'internalisation des CuO NM devrait se faire à travers le mécanisme d'endocytose, menant à la sollicitation de défenses antioxydantes et antitoxiques ainsi qu'à l'activation de mécanismes de réparation de l'ADN (Châtel et al., 2018). Ces observations, effectuées après seulement 24 heures d'expositions à 10 $\mu\text{g Cu/L}$ de CuO NM, mettent en évidence encore une fois la précocité de ces réponses.

Chapitre II : Démarche scientifique

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en avant les transformations que subissent les NMM dans l'environnement aquatique, ce qui rend difficile l'évaluation de leur devenir et de leurs effets dans l'environnement naturel. Actuellement, les informations manquent concernant les effets des NM sur des espèces qui sont connues pour être de bons indicateurs de pollution, tels que les bivalves. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer le devenir et les effets des NMM dans l'environnement aquatique à travers la mise en place d'expositions se rapprochant de plus en plus des conditions environnementales en termes de concentration, de composition, de durée, mais également à travers la sélection d'espèces potentiellement plus à risque. C'est pourquoi, la démarche adoptée au cours de cette thèse a consisté à augmenter progressivement la complexité des conditions d'exposition afin de déterminer dans un premier temps le devenir et les effets des NM en microcosmes, puis dans des conditions plus réalistes d'un point de vue environnemental à travers la mise en place de mésocosmes. Dans ce chapitre, l'intérêt d'une telle approche va être développé. Les approches méthodologiques menées à différentes échelles biologiques au cours de cette thèse sont aussi exposées dans ce chapitre. Les réponses suivies ainsi que les espèces modèles sélectionnées y sont également décrites.

A. Complexification de l'exposition

Dans les écosystèmes naturels, les organismes sont constamment exposés à différents facteurs abiotiques (température, pH, salinité, marées, contaminants...) et biotiques (virus, bactéries, algues...). Des modifications de ces facteurs influencent la physiologie de ces organismes et constituent des facteurs de stress lorsque leurs valeurs sortent de leurs gammes de confort. Un organisme exposé à un stress ne répondra pas de la même façon si un stress supplémentaire est ajouté. Ainsi, la réponse à un polluant peut varier en fonction des conditions environnementales. Les activités anthropiques peuvent considérablement influencer ces conditions notamment en causant des augmentations de température, de salinité ou d'acidité des milieux. De plus, ces modifications peuvent également modifier le comportement des contaminants présents dans le milieu.

Dans le contexte des NM, la complexité des écosystèmes naturels rend difficile leur détection dans les milieux naturels et ne permet actuellement pas de déterminer la part liée à l'apport

anthropogénique. Comme démontré dans la figure 9, de nombreuses particules nanométriques issues à la fois de processus naturels et anthropogéniques y sont présentes. La faible concentration de NMM et la présence des nombreuses formes naturelles rend difficile la détection des formes manufacturées et complexifie de ce fait l'évaluation de leurs effets dans le milieu naturel.

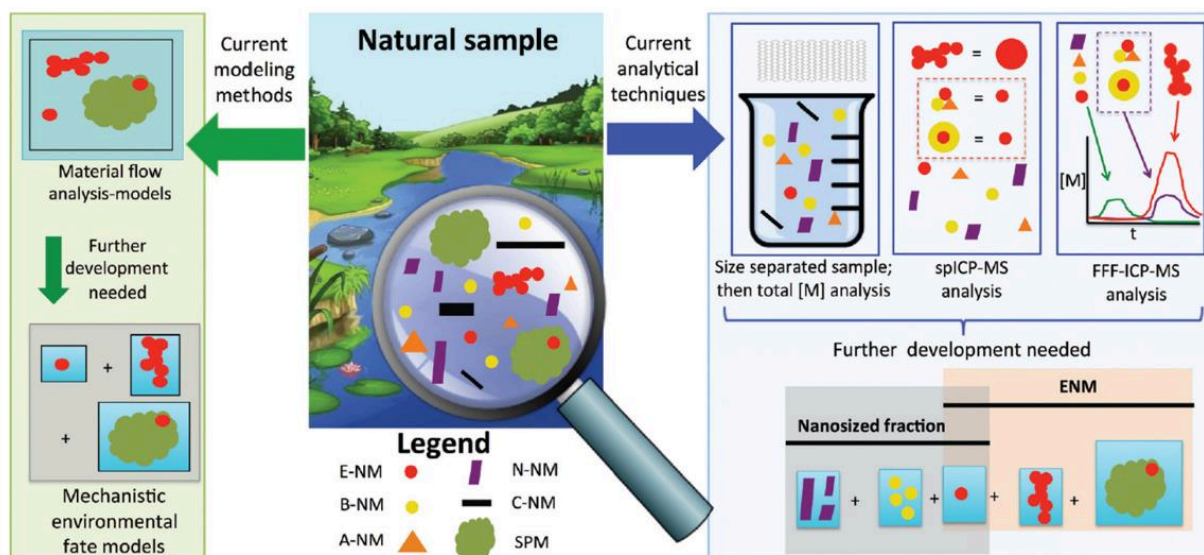


Figure 9 : les eaux naturelles contiennent une multitude d'espèces nanométriques différentes, y compris de différentes formes de NMM (Nowack et al., 2015). Abréviations : E-NM : nanomatériaux manufacturés, BNM : NM dérivé du matériau brut, A-NM : NM érodé, N-NM : NM naturel, C-NM : NM généré par combustion, SPM : matière particulaire en suspension.

Ces dernières décennies, l'évaluation du risque associé aux NM a été réalisée essentiellement en laboratoire dans des conditions contrôlées. Ces travaux ont mis en évidence non seulement l'importance des concentrations utilisées mais également l'influence de nombreux facteurs (salinité, concentration des NM, physico-chimie des NM...) sur le comportement et le devenir des NM. L'exposition des organismes en milieu simple permet le contrôle des paramètres d'exposition (température, pH, salinité, luminosité...) ainsi qu'un bon recouvrement de la contamination, ce qui permet d'étudier le lien entre l'exposition et les effets. Néanmoins, ces conditions simples d'exposition sont loin de refléter la réalité environnementale. Certaines études ont d'ores et déjà été menées dans des milieux plus complexes, notamment à travers la mise en place de mésocosmes en extérieur, mais la réduction du contrôle des différents paramètres du milieu (climat, vent...) rend plus difficile la quantification des NM et réduit la reproductibilité de ces études (Bour et al., 2015). Un bon compromis serait de réaliser des

expositions en intérieur, afin de pouvoir complexifier le milieu tout en gardant un certain contrôle sur l'exposition. La figure 10 illustre les intérêts de ce compromis.

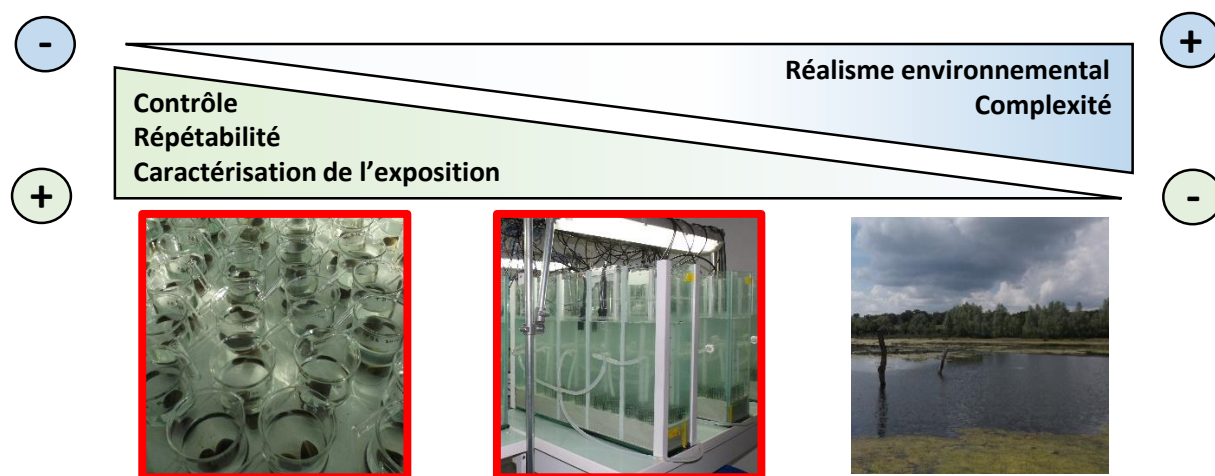


Figure 10 : Avantages et inconvénients des approches expérimentales selon le degré de complexité des milieux d'exposition. Les approches expérimentales développées dans cette thèse sont encadrées en rouge.

Une exposition en mésocosmes a été mise en place dans le cadre de l'ANR MESONNET (2010-2015) et a été décrite par Auffan et al. (2015). Elle consiste à exposer des organismes aquatiques en intérieur dans des dispositifs de 60 litres comprenant de l'eau, du sédiment et du biote, tout en contrôlant certains facteurs d'exposition (température, luminosité) et en mesurant continuellement de nombreux paramètres physico-chimiques (pH, O₂, potentiel rédox...). Ce design permet de s'approcher des conditions environnementales en termes de complexité du milieu tout en permettant la quantification des NM dans le système. Il permet également d'évaluer à la fois la physico-chimie des NM et leur relation avec les organismes (Auffan et al., 2015). Afin d'ajouter davantage de réalisme, le mécanisme des marées a été mis en place pour des expositions en eau de mer par Carole Bertrand (2016) dans le cadre de l'ANR NanoSALT (2013- 2017). La figure 11 reprend les systèmes expérimentaux utilisés dans le cadre de l'ANR NanoSALT pour des expositions en mésocosmes en eau douce et eau de mer. Cette approche a été utilisée dans le cadre de cette thèse dans le but de se rapprocher des conditions environnementales. C'est pourquoi des concentrations relativement faibles de contaminants (de l'ordre du µg/L) ont été utilisées afin de permettre à la fois (i) de définir le devenir et les effets des NM à des concentrations plus proches de celles estimées pour l'environnement, et (ii) une détection des NM dans ces dispositifs complexes. Les transformations des NM au cours de leur cycle de vie ont également été prises en compte en

évaluant les effets non seulement des NM bruts, mais également de différents nanoproduits contenant ces NM.

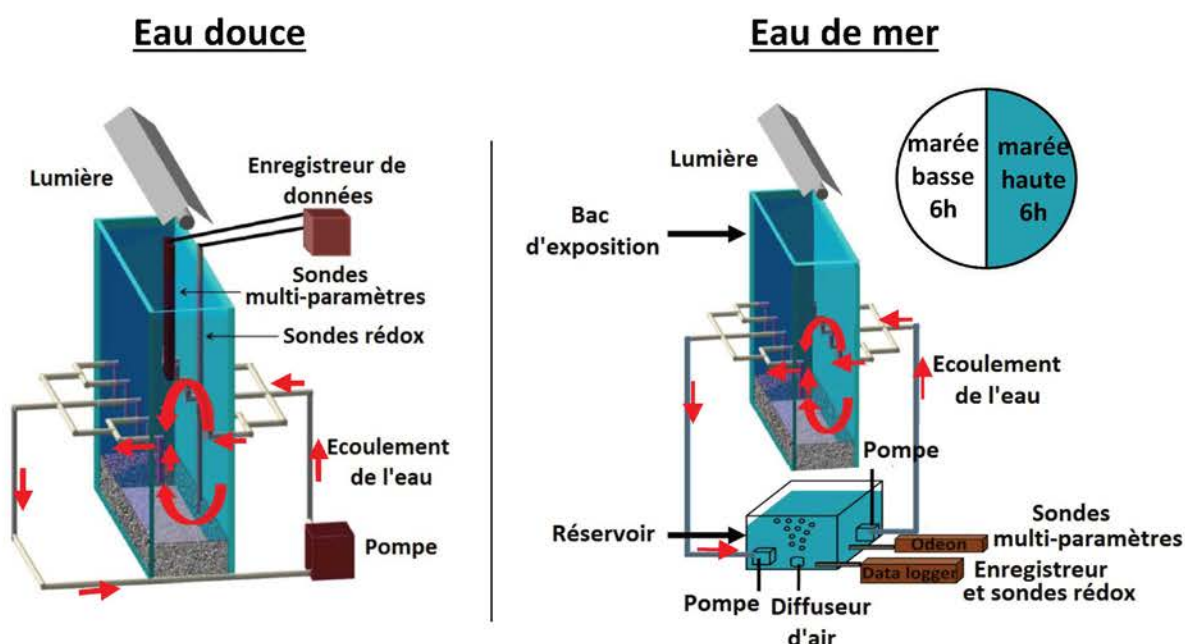


Figure 11 : Designs expérimentaux pour une exposition intérieure en mésocosmes. L'image de gauche représente le design imaginé par Auffan et al. (2015). L'image de droite comprend les adaptations au système des marées réalisées par Carole Bertrand (2016) dans le cadre de l'ANR NanoSALT.

Au cours de cette thèse, les effets de différentes concentrations de NM bruts ont été évalués en microcosmes (colonne d'eau) afin de réaliser des répliques des conditions et de pouvoir relier les effets à la contamination de l'eau. Puis, les expositions ont été réalisées dans des conditions plus réalistes *via* la mise en place de mésocosmes intérieurs (eau, sédiment, algues), une augmentation de la durée d'exposition, une utilisation de nanoproduits et leurs ajouts progressifs pour mimer un rejet périodique de contaminant. Les approches expérimentales menées au cours de ces travaux sont encadrées en rouge dans la figure 10 afin de mieux les situer sur une échelle mêlant les avantages et les inconvénients de ces techniques. Le tableau II illustre les différentes conditions expérimentales mise en place durant cette thèse.

Tableau II : Conditions expérimentales mises en place au cours de cette thèse.

Oxydes métalliques		CeO ₂		CuO		
Milieu d'exposition		Microcosme	Mésocosme	Microcosme	Mésocosme	
Espèce		<i>C. fluminea</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>S. plana</i>
Salinité (psu)		1,5	1,5/15	1,5	1,5	30
Nanomatériaux		X	X	X	X	X
Nanoproduit			X		X	X
Nanoproduit vieilli			X			
Produit sans nanomatériau					X	X
Temps d'exposition	< 6 jours	X		X		
	7 jours		X			
	14 jours		X		X	X
	21 jours		X			
	28 jours		X		X	X

Comme la salinité est susceptible d'affecter à la fois le comportement des organismes et celui des NM, l'effet combiné de la salinité et d'une contamination aux NM a été évalué au cours de cette thèse chez *C. fluminea* exposée à la fois à une salinité représentative des eaux douces (1,5 psu) ou des eaux saumâtres (15 psu) et des CeO₂ NM. Le devenir et le comportement des NM à différentes salinités ont été également déterminés suite à des expositions de *C. fluminea* en eau douce (1,5 psu) et de *S. plana* en eau marine (30 psu) à des CuO NM. L'évaluation des effets dépendants de la salinité semble indispensable à réaliser puisque des modifications de comportement des organismes ou des contaminants sont susceptibles d'induire des effets très différents. Les données acquises permettent non seulement de déterminer les effets des NM le long du continuum eau douce – eau de mer, mais peuvent également alimenter la réflexion sur les effets écotoxicologiques des NM dans un contexte de changements globaux, puisque l'augmentation de température et les activités anthropiques mènent également à une augmentation de salinité dans les milieux naturels.

B. Approche multi-marqueurs

L'utilisation de biomarqueurs permet de prédire de manière précoce les effets d'un contaminant sur l'état de santé d'un individu, d'une population ou d'un écosystème afin de prendre rapidement les mesures nécessaires à leur protection. Le biomarqueur peut être décrit comme une mesure quantitative de changements de composants moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux reliés à une exposition présente ou passée à un ou plusieurs contaminants (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Comme le montre la figure 12, plus les observations sont réalisées à des échelles biologiques élevées, plus elles seront réalistes d'un point de vue environnemental. Néanmoins, les réponses à des échelles plus basses seront plus informatives sur le mécanisme d'action du contaminant et seront également visibles à des échelles de temps plus courtes. L'évaluation des effets aux niveaux les plus bas devrait donc permettre de détecter les effets des contaminants avant qu'ils n'impactent les niveaux supérieurs et pourrait ainsi servir de signal d'alarme précoce. Holden et al. (2016) ont ainsi préconisé l'utilisation des outils moléculaires « -omiques » afin de déterminer de façon rapide les voies mécanistiques que génèrent les effets toxiques des NM.

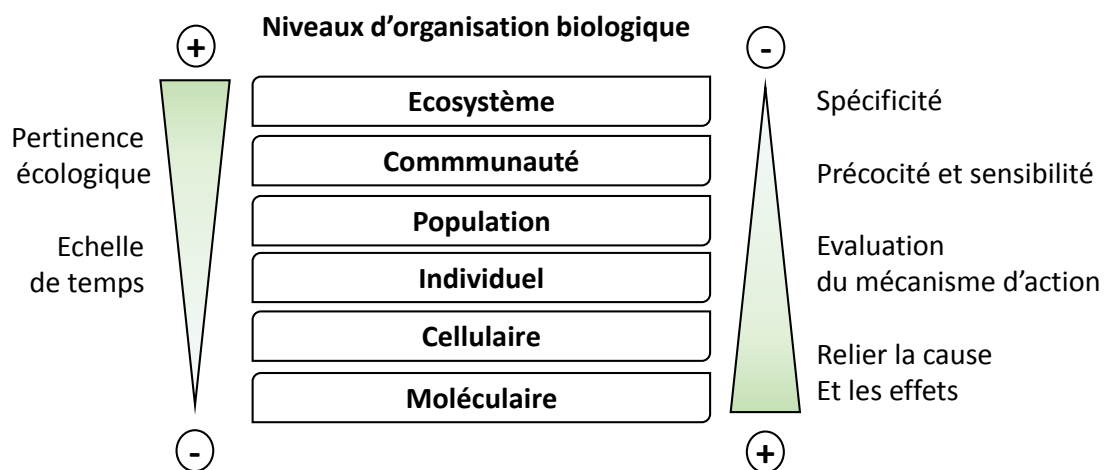


Figure 12 : Avantages et inconvénients du suivi de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (à partir de Adams et al., 1989 et Mussali-Galante et al., 2013).

Un des objectifs de cette thèse était de développer une approche de détection des effets au niveau moléculaire en utilisant les outils « -omiques » afin d'évaluer et de comprendre les effets précoces des NM chez les invertébrés, et particulièrement chez les espèces non séquencées. Les disciplines « -omique » permettent d'envisager un suivi rapide des changements d'expression de nombreux gènes au niveau ARN (transcriptomique), au niveau

protéique (protéomique) ou bien au niveau des concentrations en métabolites (métabolomique), et de déterminer quelle voie moléculaire est perturbée par un contaminant. Ces approches sont largement utilisées chez les mammifères, mais leur développement en écotoxicologie aquatique est récent (Amiard-Triquet et al., 2015). Le terme « écotoxicogénomique » a été proposé pour décrire les études analysant les réponses adaptatives au niveau transcriptomique, protéomique et métabolomique en écotoxicologie (Snape et al., 2004). Ces disciplines permettent de faire un état des lieux de l'ensemble des ARN, protéines ou métabolites dans une situation donnée, mais peuvent être également utilisées afin de comparer un état par rapport à un autre, et seront dans ce cas appelées des techniques « omiques » comparatives.

L'« expression de gènes » se réfère à l'ensemble des réactions qui aboutissent à la production de la forme active du gène c'est-à-dire l'ARN dans certains cas (ARN ribosomique par exemple) ou la protéine dans la majorité des cas. Chez les eucaryotes, elle démarre dans le noyau cellulaire avec la transcription, qui correspond à la synthèse d'un ARN complémentaire au brin d'ADN codant. On peut distinguer plusieurs sortes d'ARN selon leurs fonctions. Parmi eux, l'ARN messager (ARNm) comprend la région codant pour une protéine. La transcription se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors de l'initiation, la chromatine doit être décompactée pour permettre d'accéder à l'ADN. L'ARN polymérase pourra s'y fixer à partir d'une région promotrice et débutera la synthèse d'ARN à l'aide de différents facteurs de transcription. S'en suit l'étape d'élongation qui permet l'addition de ribonucléotides pour former progressivement le brin d'ARN jusqu'à atteindre une séquence de terminaison, qui aboutit à la libération de l'ADN et de l'ARN. A ce stade, l'ARNm n'est pas encore fonctionnel et est appelé ARN pré-messager. Il doit subir une étape de maturation qui implique des modifications structurales *via* (i) l'épissage des parties non codantes (introns) et (ii) l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' et d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' permettant d'augmenter sa stabilité et d'agir sur son adressage. Suite à ces modifications post-transcriptionnelles, l'ARNm est fonctionnel et est transféré au niveau du cytoplasme à l'aide de protéines d'adressage. Ces ARNm matures vont alors pouvoir être traduits en protéines par les ribosomes en passant par des étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison. Des étapes supplémentaires (post-traductionnelles) peuvent également être nécessaires pour obtenir une protéine active. Chaque étape (transcription, post-transcription, traduction, post-

traduction) peut être régulée et cette régulation est dépendante du gène concerné. Le profil d'expression des gènes est aussi dépendant de leur fonction et de leur localisation tissulaire et évoluera différemment en réponse à un stimulus externe comme un stress chimique par exemple. L'expression de gènes répond à une contamination relativement rapidement (minutes à heures) et arrive en amont des réponses classiquement mesurées à l'échelle cellulaire comme illustré sur la figure 13. Elle peut alors être utilisée comme un signal d'alarme précoce en cas de contamination (Eissa et Wang, 2016).

L'évaluation de l'expression de gènes peut se faire de façon non sélective en suivant un grand spectre de réponses, ou de façon sélective en mesurant spécifiquement les changements d'expressions de certains gènes ciblés. L'évaluation sélective est la plus utilisée pour les organismes pour lesquels peu de séquences génomiques sont disponibles (Revel et al., 2018), ce qui est le cas pour nos organismes d'étude.

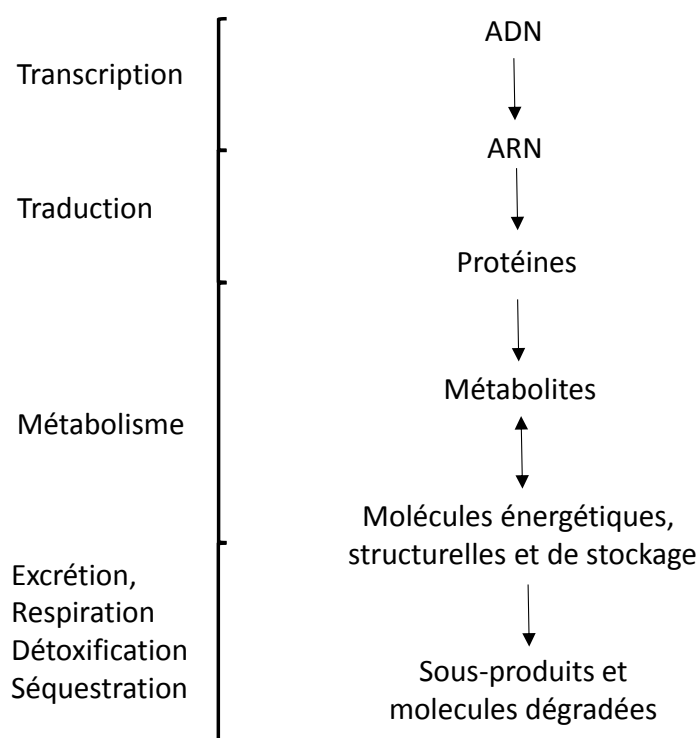


Figure 13 : Organisation hiérarchique des procédés biochimiques (adapté de Newman & Clements, 2008).

Dans le cadre de cette thèse, l'évaluation de l'expression de gènes a été réalisée au niveau de l'ARN en utilisant la technique sélective RT-qPCR (Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction). Cette technique nécessite la connaissance de la séquence codante du gène à étudier afin de pouvoir synthétiser un couple d'amorces qui amplifiera

spécifiquement ce gène. L'ARNm est préalablement extrait du tissu biologique d'intérêt. La technique de dissection et de conservation du tissu biologique a été adaptée au cours de cette thèse afin d'éliminer les tissus non ciblés et d'obtenir une meilleure qualité d'ARNm. Cet ARNm est ensuite rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc), qui sert de matrice pour l'amplification du fragment d'intérêt. Cette amplification se fait par une succession de 40 cycles dont chacun comporte une étape de dénaturation, d'hybridation et d'élongation (Figure 14).

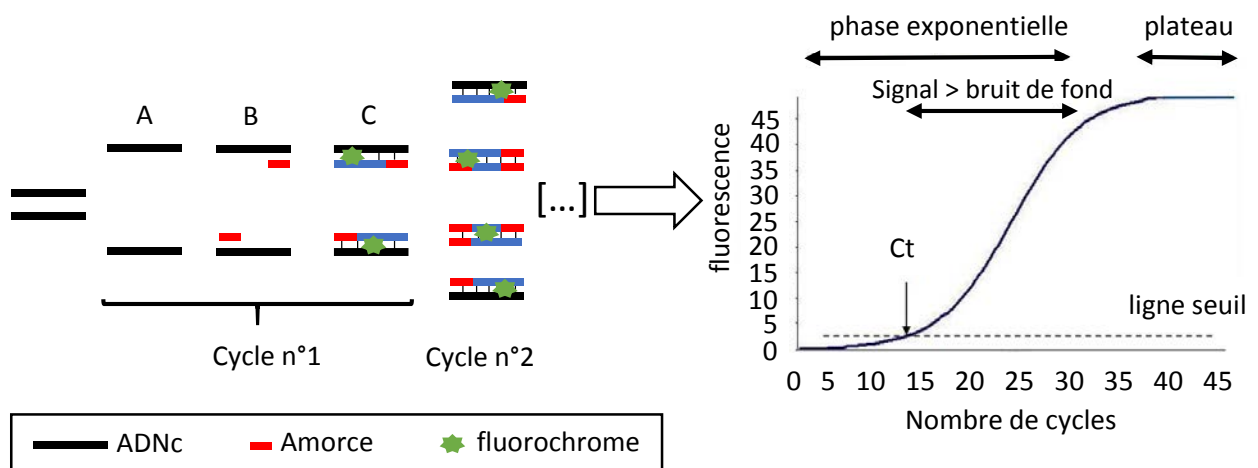


Figure 14 : Réaction de la PCR en temps réel (adapté de Bigot et al., 2008). Un cycle se compose d'une phase de dénaturation (A), d'hybridation (B) et d'élongation (C). La fluorescence détectée est proportionnelle au nombre de copies du gène cible.

Au cours de la dénaturation, la température augmente (95°C) afin de séparer les doubles brins d'ADN qui sont maintenus appariés par des liaisons hydrogène. Une fois l'obtention de simples brins, la température est abaissée à 60°C (renaturation) pour que les amorces puissent s'apparier à leur séquence complémentaire. Puis, une étape d'élongation permettra la synthèse d'un brin complémentaire. Ces étapes permettent de générer de façon exponentielle des copies du gène ciblé. La détection en temps réel de ces copies et leur quantification sont assurées par l'utilisation d'un composé fluorescent capable de se lier à l'ADN double brin et d'une caméra. Le signal de fluorescence est proportionnel à la quantité de copies générées. Ainsi, plus il y a de copies au départ, moins il faudra de cycle pour détecter le signal de fluorescence. Le nombre de cycles nécessaires à la détection de la fluorescence est appelé le cycle seuil (Ct ou Cq) et apparaît toujours en phase exponentielle de la réaction d'amplification.

L'expression relative des gènes a ensuite été calculée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak et Schmittgen (2001) présentée ci-dessous :

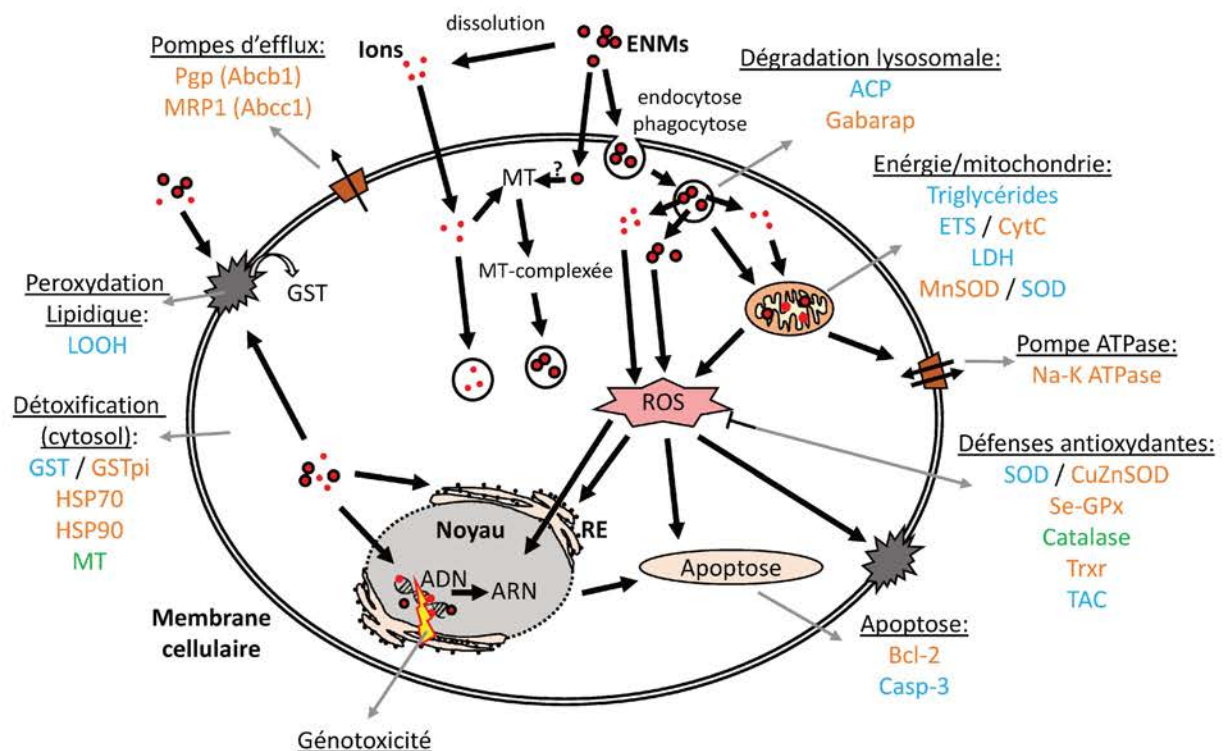
$$\Delta Ct = (Ct \text{ du gène cible} - Ct \text{ du gène de référence})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ de l'échantillon} - \Delta Ct \text{ de l'organisme non exposé}).$$

Cette méthode permet de corriger certains biais expérimentaux, majoritairement liés à l'étape de RT. Elle nécessite la quantification de gènes qui sont exprimés de façon constante dans toutes les conditions afin de normaliser les données avec ces gènes dits « de référence », utilisés comme calibreurs internes. De façon générale, ces gènes sont des gènes de maintenance tels que le 18S, la β -actine et les protéines ribosomales (Amiard-Triquet et al., 2015). Différents gènes ont été sélectionnés dans le cadre de cette thèse (protéine ribosomale S3 et β -actine) et leur stabilité a été vérifiée pour chaque expérience. Seules les expressions qui se sont révélées stables ont été conservées pour la normalisation. Les expressions ainsi calibrées vont pouvoir être comparées entre les organismes exposés et les non-exposés.

L'expression de gènes peut être révélatrice d'un stress de façon très précoce. Néanmoins, le lien entre l'expression des ARNm, la synthèse des protéines et leur activité n'est pas évident. Des processus de régulation entrent en jeu à chacun de ces niveaux (transcription, post-transcription, traduction, post-traduction), ce qui rend parfois difficile l'extrapolation des résultats à des niveaux supérieurs (Klaper et al., 2014). Par exemple, la mesure de l'abondance des ARNm n'est pas systématiquement reliée à celle des protéines et permet généralement d'expliquer 40% des variations de concentrations protéiques. Le fort pourcentage inexpliqué peut être dû aux régulations post-transcriptionnelles et traductionnelles mais aussi à la dégradation des ARNm et protéines (Vogel et al., 2012). De même, la mesure de l'abondance des enzymes n'est pas appropriée pour déterminer leur activité enzymatique (Payne, 2015), car certaines enzymes nécessitent des modifications post-traductionnelles pour être actives. Malgré ces difficultés de corrélations entre niveaux, l'incorporation d'une variété de mesures et d'échelles de mesures différentes permet d'apporter une meilleure compréhension et interprétation des réponses biologiques. La démarche adoptée au cours de cette thèse a donc été non seulement de développer des outils de suivi de l'expression de certains gènes clés, mais également d'augmenter le nombre de réponses biologiques mesurées. Les observations ont été menées de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle à travers le suivi de biomarqueurs qui sont détaillés dans la partie ci-après.

Les différents marqueurs suivis au cours de cette thèse sont présentés dans la figure 15. Ils interviennent dans (i) la lutte contre le stress oxydant, (ii) les mécanismes de détoxication, (iii) la mise en évidence de dommages cellulaires, (iv) l'osmorégulation et (v) dans les réserves et le métabolisme énergétique. Des paramètres physiologiques et comportementaux tels que le comportement d'enfouissement, le taux de filtration ainsi que l'indice de condition ont également été évalués dans le cadre de cette thèse.



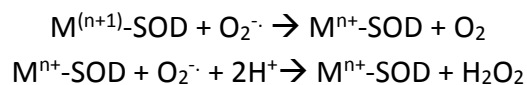
35

1. Marqueurs de stress oxydant

La respiration des organismes conduit à la production de composés hautement réactifs dérivés de l'oxygène appelé les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). Ils peuvent réagir avec de nombreux composés cellulaires (ADN, protéines, lipides, etc...) et les endommager. Des mécanismes de défense sont naturellement mis en place pour éviter ces dégâts et composent le système antioxydant. En cas d'exposition à des contaminants comme des métaux (Cu, Fe...), la production de ROS peut considérablement augmenter et peut alors mener à une induction du système antioxydant pour contrer les dégâts. Une trop forte quantité de ROS peut dépasser les capacités antioxydantes des cellules et générer ainsi des dégâts cellulaires considérables *via* l'oxydation de protéines, ADN et acides gras (Alves de Almeida et al., 2007). L'induction de ce stress oxydant est couramment rapportée en réponse à de nombreux stress (température, xénobiotiques, hypoxie...) et compose la réponse la plus classiquement observée suite à une exposition aux NM (Klaper et al., 2014). Quelques défenses antioxydantes ont été suivies à l'échelle biochimique (activités SOD, Cat, GPx, TAC) et à l'échelle moléculaire (CuZnSOD, MnSOD, Cat, Se-GPx, Trxr) au cours de cette thèse et sont brièvement détaillées ci-dessous.

1.a. Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) apparait comme la première enzyme de défense contre le stress oxydant en catalysant la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



C'est une métalloprotéine ayant dans son site actif des composés métalliques qui peuvent être le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le fer (Fe) ou le nickel (Ni). L'activité des SOD a été évaluée par spectrophotométrie suite à l'adaptation du protocole de Ukeda et al. (1997) qui fait intervenir le composé WST-1. Chez *C. fluminea*, la Cu/Zn- et la Mn-SOD ont été séquencées. La Cu/Zn SOD est retrouvée de façon ubiquitaire dans le cytosol et le noyau (Rhee et al., 2011) tandis que la MnSOD a une localisation mitochondriale. Une approche par RT-qPCR a permis de démontrer que la Cu/Zn SOD est plus transcrite dans les branchies et la glande digestive que dans le muscle adducteur, la gonade, le manteau et le pied chez *C.*

fluminea (Xie et al., 2018). L'exposition de bivalves aux NM a également augmenté l'activité de la SOD au niveau biochimique (Buffet et al., 2011 ; Gomes et al., 2014b, 2012).

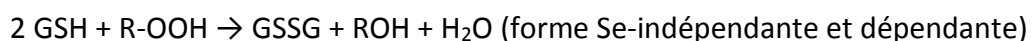
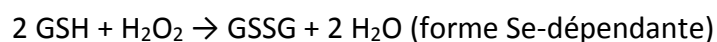
1.b. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme qui permet la détoxification de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) sans consommer d'énergie (Flora, 2009). Son action ne nécessite pas de cofacteur et se résume à cette formule : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

Elle est localisée dans les peroxysomes et les mitochondries et étant donné son rôle, elle est couramment utilisée comme biomarqueur de défense. Chez les bivalves, son activité a été rapportée par de nombreux auteurs comme étant augmentée suite à une exposition à des CuO (Buffet et al., 2011, 2013 ; Gomes et al., 2011, 2012), ZnO (Buffet et al., 2012), Au (Pan et al., 2012) et Ag NM (Buffet et al., 2014 ; Gomes et al., 2014). Une diminution de son activité a été observée par Garaud et al. (2015, 2016) suite à une exposition de *D. polymorpha* à des CeO_2 NM, probablement en raison des propriétés antioxydantes de ces NM.

1.c. Glutathione peroxidase

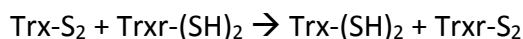
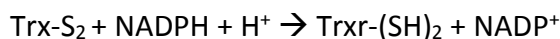
La glutathion peroxidase (GPx) permet aussi de détoxifier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mais également d'autres peroxydes. Elle est localisée dans le cytosol et est ainsi complémentaire à la catalase pour la détoxification de H_2O_2 . Toutefois, la catalase a une capacité de prise en charge d' H_2O_2 qui est 2 à 4 fois supérieure. Les GPx peuvent exister sous deux formes qui nécessitent ou non du sélénium. La GPx sélénium dépendante (Se-GPx) peut réagir avec une grande variété d'hydroperoxydes (H_2O_2 et hydroxydes organiques) tandis que la GPx sélénium-indépendante n'interagit qu'avec les formes réduites d'hydroperoxydes organiques.



La présence de glutathion réduit (GSH) est nécessaire à son fonctionnement. Le GSSG peut être converti en GSH *via* l'activité de la glutathion réductase (GR). L'activité GPx est généralement augmentée suite à une contamination aux NM (Gomes et al., 2011, 2012, Bertrand et al., 2013) mais n'a pas été affectée par des CeO_2 NM chez *Dreissena polymorpha* (Garaud et al., 2015). La transcription de Se-GPx a été également affectée par des NM et a été augmentée en présence de Cit-Au NM (Volland et al., 2015) et diminuée en présence de CeO_2 NM (Garaud et al., 2016).

1.d. Thiorédoxine reductase

La thiorédoxine réductase (Trxr) est la seule enzyme connue pour catalyser la réduction de la thiorédoxine (Trx). C'est une sélénoprotéine qui récupère un électron *via* le NADPH et le transfère à la thiorédoxine qui devient alors active et peut réduire les ponts disulfures des protéines ou d'autres substrats :



La Trx assure ainsi la maintenance d'un environnement cellulaire réducteur en interagissant avec de nombreuses protéines, permettant ainsi de protéger la cellule des effets délétères du stress oxydant (Lee et al., 2013). Elle peut également réduire des protéines directement impliquées dans les défenses antioxydantes telles que les peroxyrédoxines. Elle n'intervient pas uniquement comme antioxydant, mais également dans la synthèse d'ADN, la transcription de gènes, la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Mustacich et Powis, 2000).

1.e. Capacité antioxydante totale

La mesure de l'activité antioxydante totale (Total Antioxydant Capability = TAC) nous permet une évaluation globale de l'activité antioxydante d'un échantillon, prenant en compte à la fois les activités enzymatiques (SOD, Cat, ...) et non enzymatiques (GSH, thiorédoxine...). Cette mesure rapporte la totalité de ces activités antioxydantes et renseigne ainsi sur la capacité des organismes à neutraliser les ROS.

2. Mécanismes de détoxification

Afin de lutter contre les xénobiotiques, les bivalves possèdent de nombreux mécanismes de défense qui permettent de réguler leur concentration interne. Différents mécanismes de détoxification ont été suivis à l'échelle biochimique (MT, GST, ACP) et à l'échelle moléculaire (MT, GSTpi, MXR, HSP70).

2.a. Protéines de choc thermique :

Les protéines de choc thermique (Heat shock protein = HSP) sont des chaperons moléculaires présentes chez les procaryotes et dans tous les compartiments cellulaires des eucaryotes (Fabbri et al., 2008). Parmi elles, les HSP70 et HSP90 (respectivement 70 et 90 kDa) sont les plus conservées et les plus sensibles aux facteurs de stress (métaux, température, salinité, nourriture, acidification ...). Xie (2017) a pu démontrer un nombre de transcrits de HSP70 et HSP90 plus élevé dans la glande digestive de *C. fluminea* par rapport aux autres organes. Les

HSP90 représentent 1 à 2% des protéines totales de la cellule, ce qui les rend les plus abondantes, même en absence de stress. En tant que chaperons moléculaires, elles participent à la protection de la cellule (i) en permettant aux protéines nouvellement synthétisées d'acquérir leur conformation tridimensionnelle les rendant actives, (ii) en évitant l'agrégation et la mauvaise conformation des protéines qui peuvent mener à des réactions anormales et (iii) en agissant au niveau de la transduction de signaux, de l'apoptose et des réponses immunitaires (Fabbri et al., 2008). Ainsi, elles peuvent renseigner sur les conditions générales de stress des organismes et donner des signaux précoces d'intoxication avant que les fonctions complexes soient compromises (Fabbri et al., 2008).

2.b. Métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7 kDa), thermorésistantes, très conservées, qui sont retrouvées des procaryotes aux eucaryotes. Elles sont riches en cystéines, qui représentent environ 20 à 30% de leur poids moléculaire. Les groupements thiol (-SH) des résidus cystéines permettent aux MT d'avoir une interaction forte avec de nombreux métaux lourds, qu'ils soient essentiels (Cu, Zn) ou non-essentiels (Cd, Hg, Ag) (Bigot et al., 2009). La demi-vie des MT seules serait de 1 à 4 jours tandis que celle des MT complexées à du Cd pourrait augmenter jusqu'à 70 jours. Elles ont un rôle majeur en contrôlant la biodisponibilité des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc et sont capables de transférer ces métaux aux molécules réceptrices appropriées telles que des métalloenzymes (Cu/Zn SOD) ou des facteurs de transcription. Elles peuvent aussi lier des métaux non-essentiels et participer ainsi au mécanisme de détoxification de la cellule. Leur concentration augmente généralement en présence de métaux qui ainsi séquestrés, ne réagissent plus avec les composants cellulaires, ce qui permet de réduire les dommages résultants. Bien que d'autres facteurs puissent influencer leur réponse (ROS, température...), les MT sont couramment utilisées comme biomarqueur de stress métallique notamment lors d'étude sur les NM métalliques. La concentration en MT a été augmentée chez des bivalves exposés à des NM métalliques tels que les CuO NM (Buffet et al., 2011), les Ag NM (Gomes et al., 2014), les ZnO NM (Falfushynska et al., 2018). Néanmoins, cette induction n'a pas été observée suite à une exposition à des Ag NM (Buffet et al., 2014) et ZnO NM (Buffet et al., 2012). La transcription de MT a été augmentée chez les bivalves exposés à des TiO₂ NM (D'Agata et al., 2014), CeO₂ NM (Garaud et al., 2016), CuO NM (Châtel et al., 2018), et Au NM

(Renault et al., 2008), bien que cela n'ait pas été systématique (Balbi et al., 2014 ; Volland et al., 2015) et que cela puisse différer selon l'isoforme suivie (D'agata et al., 2014).

2.c. Glutathion-S-transférase

La glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme ubiquitaire intervenant dans la phase II de détoxification. Elle joue un rôle majeur dans la détoxification cellulaire contre les molécules endogènes, les xénobiotiques et les intermédiaires réactifs formés pendant leur biotransformation (Doyen et al., 2005). La GST fixe les ligands et les rend plus hydrophiles, ce qui favorise leur élimination. La GST est principalement cytosolique, mais elle peut également être retrouvée dans les microsomes. Il existe huit classes d'isoenzymes (alpha, mu, pi, thêta, sigma, zêta, beta et kappa) qui peuvent être différenciées sur la base de leur spécificité de substrat, leurs propriétés immunologiques et leur séquence protéique (Sheehan et al., 2001). Le grand nombre d'isoformes permet la métabolisation d'une grande variété de substrats. Parmi ces différentes classes, la classe pi (GSTpi) peut inactiver les produits issus de la peroxydation lipidique, les hydroperoxydes lipidiques et leurs dérivés. La GSTpi est également capable d'inactiver directement les ROS *via* leur groupement –SH (Doyen et al., 2005).

Cette enzyme est classiquement utilisée comme biomarqueur de défense. De plus, elle ne semble pas être impactée par les facteurs abiotiques tels que la température, la saison, le sexe ou l'âge (Vidal et al., 2002). Les transcrits de GSTpi sont exprimés de la même façon dans la glande digestive, les branchies et le système excréteur chez *C. fluminea* et chez la moule *Unio tumidus* (Doyen et al., 2005). L'activité des GST est augmentée chez des bivalves exposés à des CeO₂ NM (Garaud et al., 2015), Au NM (Pan et al., 2012), Ag NM (Buffet et al., 2014) et des CuO NM (Buffet et al., 2013) mais n'a pas été modifiée lors d'exposition à des ZnO NM (Buffet et al., 2012). Au niveau moléculaire, le nombre de transcrits de GSTpi a considérablement diminué chez *D. polymorpha* exposée à des CeO₂ NM (Garaud et al., 2016).

2.d. Phosphatase acide

La phosphatase acide est une enzyme essentielle aux fonctions biologiques des organismes et intervient dans la détoxification de xénobiotiques, mais également dans le métabolisme énergétique, la régulation métabolique et la transduction de signaux. Elle est considérée comme un marqueur de la détection des lysosomes dans la fraction cytosolique. Le suivi de son activité donne des indications sur les interactions des NM avec les lysosomes (Katsumiti et al., 2014).

2.e. Mécanismes d'efflux

Le système MXR (« multixenobiotic resistance » ou résistance multi-xénobiotiques) représente une défense de large échelle qui protège les organismes de toxiques endogènes et exogènes (Epel et al., 2008). Ce système regroupe un ensemble de protéines de transport membranaire, des ATPase de la famille ABC (« ATP binding cassette ») qui reconnaissent une grande variété de xénobiotiques et qui permettent leur export hors de la cellule, agissant ainsi comme première ligne de défense cellulaire. Du fait de ces capacités, les protéines MXR sont considérées comme biomarqueurs de stress environnemental (Navarro et al., 2012). Certains auteurs ont aussi démontré une inhibition possible de leur activité par le contaminant présent en forte concentration (Jeong et al., 2017). Durant cette thèse, nous avons suivi l'expression génique de deux transporteurs MXR chez *C. fluminea* : la MRP1 (« multi drug associated protein 1 » ou ABCC1) et la P-gp (P-glycoprotéine ou ABCB1). Chacune d'entre elle a une certaine spécificité de substrat comme démontré par Navarro et al. (2012) chez *Dreissena polymorpha*. La P-gp a une forte affinité pour les composés de petite taille, hydrophobes, planaires et positivement chargés tandis que MRP1 contribue à l'efflux cellulaire de produits conjugués avec des xénobiotiques et autres biomolécules de phase II (Bard, 2000 ; Jeong et al., 2017).

2.f. Autophagie

L'autophagie est un processus de recyclage cellulaire qui intervient durant toute la vie de la cellule. Elle correspond à la dégradation par les lysosomes des constituants cellulaires endommagés ou non-essentiels pour la cellule. Ainsi, elle permet de préserver la balance entre la biogénèse des organites, la synthèse des protéines et leur recyclage. Cette voie est également capable de prendre en charge différents xénobiotiques et donc d'agir comme processus de détoxification. L'autophagie est induite suite à une exposition aux NM (Stern et al., 2012). Il nous a semblé pertinent de suivre un acteur impliqué dans l'autophagie au niveau moléculaire : la protéine GABARAP (« gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein ») (Zhang et al., 2014 ; Chen et al., 2013). Localisée au niveau de la membrane des autophagosomes, elle est essentielle lors de leur maturation (Kabeya et al., 2004). La maturation des autophagosomes est nécessaire à la dégradation des composés contenus dans les vésicules. La protéine GABARAP n'a pas cependant pas un rôle exclusif dans l'autophagie puisqu'elle semble également impliquée dans le trafic intracellulaire et dans d'autres

procédés tels que dans le processus de mort cellulaire programmée ou « apoptose » (Ma et al., 2013). De ce fait, elle participe à la fois au métabolisme et à la défense des organismes (Ma et al., 2013 ; Zhang et al., 2014).

3. Dommages cellulaires

Lors d'un stress toxique, les composés générés et les interactions avec les composants cellulaires peuvent mener à un certain nombre de dommages. Plusieurs types de dommages ont été suivis dont certains à l'échelle biochimique (peroxydation lipidique, apoptose), et d'autres au niveau de la transcription (apoptose) ou encore au niveau de l'ADN (génotoxicité).

3.a. Peroxydation lipidique

Les membranes cellulaires sont principalement composées de phospholipides qui sont des cibles potentielles des espèces réactives. L'attaque des lipides membranaires par ces espèces réactives initie un procédé d'oxydation nommé « peroxydation lipidique ». Pendant ce processus, les lipides sont oxydés et génèrent des hydroperoxydes (LOOH). Les LOOH se décomposent en LOO $\cdot$ et/ou en LO $\cdot$ en présence d'ions métalliques (voir équations 1 et 2), formant ainsi des radicaux pouvant propager le processus d'oxydation (Alves de Almeida et al., 2007).



Le niveau de peroxydation lipidique est reconnu comme un bon indicateur de pollution environnementale. Il peut néanmoins varier en fonction des paramètres environnementaux (saison, cycle des marées) et en fonction des organes étudiés (Alves de Almeida et al., 2007).

3.b. Apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un système essentiel au développement et au bon fonctionnement des organismes. Elle permet également de lutter contre les xénobiotiques et les stress environnementaux. Le dysfonctionnement de l'apoptose peut mener à de nombreuses maladies et cancers chez les organismes vivants. C'est un phénomène très régulé qui implique de nombreuses interactions entre composants cellulaires et qui peut être activé par différentes voies. La plupart mène à l'activation d'une cascade de caspases, dont la dernière effectrice, la caspase-3, induit directement la dégradation de l'ADN, de la structure cellulaire et la phagocytose des débris. L'apoptose liée à la cascade de caspases peut être activée par des signaux externes (activation extrinsèque) ou internes à la cellule

(activation intrinsèque) qui vont engendrer différentes réponses. D'une part, des récepteurs membranaires de la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) permettent la détection de signaux apoptotiques externes et mènent directement à l'activation de la cascade des caspases. D'une autre part, l'activation intrinsèque peut être déclenchée suite à différents stress au sein de la cellule (production de ROS, dommages à l'ADN...), et est généralement induite par voie mitochondriale. Une cascade de signalisation conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ceci entraîne le rejet de produit pro-apoptotique dans le cytoplasme, tel que de Cytochrome C (Cyt C), et va en conséquence activer la cascade de caspases menant à l'apoptose. Au cours de ces travaux, l'apoptose a été déterminée à l'échelle cellulaire à travers la mesure de l'activité des caspases 3 ou à l'échelle moléculaire à travers la mesure de l'expression d'un gène anti-apoptotique jouant un rôle clé dans l'apoptose à travers la régulation de la perméabilité membranaire des mitochondries (Bcl-2).

3.c. Génotoxicité

Définir le niveau de dommages à l'ADN (génotoxicité) d'une substance est nécessaire pour déterminer le risque que celle-ci peut poser. Des dommages à l'ADN (dégradation des bases, cassures de brins, mutations, délétions, etc...) peuvent avoir des répercussions pathologiques majeures (cancers, vieillissement...). La petite taille de certains NM leur permet de pénétrer à l'intérieur du noyau cellulaire et ainsi altérer l'ADN qui y est contenu (Magdolenova et al., 2013), provoquant des dommages directs. Les NM ont également la capacité de générer des dommages *via* des interactions indirectes (production de ROS, ions, interactions avec les protéines). Elles agissent aussi au niveau des protéines impliquées dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN et dans d'autres processus pouvant ainsi altérer l'ADN (Peng et al., 2017). Le potentiel de génotoxicité a été déterminé durant cette thèse en utilisant la méthode des comètes (comet assay ou single-cell gel electrophoresis). Il s'agit d'une méthode relativement simple et sensible qui permet de quantifier les dommages à l'ADN de cellules individuelles. De nombreux NM présentent un potentiel génotoxique (Singh et al., 2009; Magdolenova et al., 2013; Gomes et al., 2013 ; Auffan et al., 2009).

4. Métabolisme énergétique

En absence de stress, l'organisme assimile de l'énergie *via* sa nourriture et la conserve sous forme de réserves énergétiques. Ces réserves sont utilisées comme énergie basale allouée à sa maintenance, sa croissance et sa reproduction. En cas de stress, l'organisme alloue une

partie de son énergie pour se défendre. Ainsi, différents paramètres énergétiques peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'effets de polluants (Mouneyrac et al., 2012) et ont été testés sur nos organismes modèles.

4.a. Triglycérides

Les triglycérides constituent une source d'énergie pour les bivalves. Ils sont stockés pendant les périodes d'abondance de nourriture afin de pouvoir être mobilisés pour remplir les fonctions essentielles lorsque la nourriture se met à manquer. Ils peuvent également être utilisés comme source d'énergie lors de la gamétogenèse (Pernet et al., 2007). Ainsi, la diminution de la concentration en triglycérides peut refléter les besoins qu'ont les organismes de puiser dans leurs réserves énergétiques.

4.b. Système de transport d'électrons

Le système de transport d'électrons (ETS pour « Electron Transport System ») se trouve dans la membrane interne de la mitochondrie. Dans ce système, les électrons passent par une série de déshydrogénases et de cytochromes vers des accepteurs d'électrons (O_2), ce qui permet de générer de l'ATP comme source d'énergie (Cammen et al., 1990 ; Martínez-García et al., 2009). La mesure d'ETS permet d'estimer l'activité respiratoire totale qui est modifiée en fonction de paramètres environnementaux (nourriture, température, pH, hypoxie) et biologiques (reproduction, espèce). L'exposition à des métaux (Coppola et al., 2018) et à des NM engendre une réduction de cette activité (Freitas et al., 2018), qui a été interprétée comme une diminution du métabolisme énergétique en lien avec une réduction de la filtration voire à une fermeture des valves (Freitas et al., 2018).

Au niveau moléculaire, nous avons mesuré l'expression du Cyt C. C'est un hème soluble dans l'eau qui participe au transfert d'électrons entre le complexe III et le complexe IV de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. En plus de participer à la respiration cellulaire, il peut avoir un rôle clé dans l'apoptose. L'activation de la voie apoptotique mitochondriale se fait par passage du cytochrome C à travers les pores de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui active la cascade de caspases qui mènent à l'apoptose (Chen et al., 2000).

4.c. Lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans tous les tissus. Elle intervient dans le métabolisme anaérobie et permet la conversion réversible du pyruvate en lactate en absence d'oxygène. Ainsi, son activité est inversement reliée à la concentration en oxygène

pour différents organismes aquatiques. Elle peut également traduire une perturbation du métabolisme suite à une contamination, comme cela a été démontré par Diamantino et al. (2001) chez *Daphnia magna* exposée à du zinc.

5. Osmorégulation

L'exposition à des xénobiotiques peut perturber l'osmorégulation suite à des changements structuraux dans les organes branchiaux ou excréteurs, ou suite à des modifications d'activité de protéines membranaires échangeuses d'ions (Na^+/K^+ ATPase), de flux ioniques et de perméabilité de surface (Felten et al., 2008). Ainsi, nous avons suivi au niveau moléculaire la transcription de la Na^+/K^+ ATPase. C'est une protéine membranaire qui joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle est abondante et spécialisée dans le transport des ions cellulaires en permettant l'échange d'ions sodium (Na^+) du milieu intracellulaire avec des ions potassium (K^+) du milieu extracellulaire. La salinité peut considérablement impacter son activité (Piermarini et Evans, 2000) ainsi que certains métaux, comme le cadmium (Felten et al., 2008), le cuivre (Shaw et al., 2012 ; Grosell et al., 2002) et l'argent (Grosell et al., 2002). Le cuivre (Cu^{2+}) a été démontré comme inhibant l'activité de cette protéine et conduit à un dérèglement de l'homéostasie du Na^+ dans la cellule (Handy et al., 2002). L'exposition de poissons à des CuO NM a également confirmé la capacité des CuO NM à inhiber l'activité Na^+/K^+ ATPase mais les mécanismes d'osmorégulation semblent dépendants de la forme (Cu^{2+} ou CuO NM) et de l'espèce exposée (Braz-Mota et al., 2018). Au niveau moléculaire, la transcription de Na^+/K^+ ATPase a été fortement diminuée dans les branchies de *M. edulis* exposées à des CuO NM tandis qu'une tendance à l'augmentation a été mise en évidence au niveau des hémocytes (Châtel et al., 2018).

6. Marqueurs physiologiques et comportementaux

6.a. Enfouissement des organismes

Les modifications du comportement peuvent être des indicateurs de stress environnemental et affecter la survie des organismes. Outre le niveau individuel, la modification du comportement peut également affecter la population, et ainsi la fonction des organismes au sein de l'écosystème. L'un des marqueurs sélectionnés pour suivre le comportement des individus est leur comportement d'enfouissement. Chez les bivalves, l'enfouissement permet réduire leur exposition face aux prédateurs. Ce comportement peut être affecté à la fois par la taille des organismes, par des paramètres environnementaux (température, salinité, taille

des grains de sédiment ...) et par la présence de contaminants chimiques (Amiard Triquet 2009 ; Sassa et al., 2011 et références citées). Il a notamment été affecté lors d'expositions à des métaux (Bonnard et al., 2009) et à des NM métalliques (Buffet et al., 2011,2014 ; Pan et al., 2012). Il est généralement réduit en présence de ces contaminants, ce qui rend les organismes plus vulnérables à la prédation.

6.b. Taux de filtration

La mesure du taux de filtration permet d'avoir une indication de la quantité d'eau filtrée par les organismes. La capacité des bivalves à bioaccumuler fortement de nombreux contaminants peut s'expliquer par cette grande capacité de filtration. La filtration du milieu par les bivalves est dépendante de la taille de particules, avec les particules les plus grandes qui sont filtrées plus rapidement que les petites. Ceci a également été validé à la taille nanométrique (Hull et al., 2011 ; Ward et Kach, 2009). *C. fluminea* est sensible à la contamination en cuivre ionique en cessant de filtrer le milieu dès lors qu'elle est exposée à 2 µg Cu²⁺/L (Castro et al., 2018). La contamination aux NM a pu aussi induire une diminution du taux de filtration chez les bivalves (Buffet et al., 2011; Bertrand, 2016).

6.c. Etat général de santé des organismes

L'état de santé général des organismes peut être défini à partir du calcul de leur indice de condition. Leur exposition à des contaminants peut mener à l'utilisation d'énergie nécessaire à la détoxification et réduire les réserves initialement utilisées pour la croissance (Nicholson & Lam, 2005). En conséquence, la valeur de cet indice est amenée à baisser dans des conditions stressantes. Il existe de nombreuses façons de la calculer. Dans cette thèse, il est calculé en faisant le ratio du poids sec des tissus mous d'un individu par rapport son poids sec total comme le démontre la formule ci-après : $Indice\ de\ Condition = \frac{Tissus\ mou\ (poids\ sec)}{Masse\ totale\ (poids\ sec)} \times 100$

D. Modèles biologiques

Les bivalves sont des espèces clés pour le suivi d'une pollution aquatique aux NM (Rocha et al., 2015). L'accumulation de NM à la surface du sédiment les rend plus disponibles pour les organismes benthiques. Les bivalves endobenthiques semblent donc particulièrement à risque dans le cadre d'une contamination aux NM. Les deux organismes sélectionnés dans cette thèse font partie de ces espèces. Ce sont des bivalves endobenthiques retrouvés dans les eaux douces (*C. fluminea*) et dans les eaux marines (*S. plana*) qui ont la capacité de se nourrir à la fois *via* l'eau et le *via* sédiment. Une description plus détaillée de leur physiologie et mode de vie est donnée ci-après.

1. Physiologie des bivalves

Les deux espèces étudiées font partie de la classe des bivalves. Comme leur nom l'indique, ils sont constitués de deux valves qui sont majoritairement composées de carbonate de calcium (CaCO_3). Elles sont recouvertes par du périostacum qui procure la couleur à la coquille et qui permet de la protéger de la dissolution dans les eaux acides. L'organisme est contenu à l'intérieur de la coquille et forme un corps mou, appelé également la « masse viscérale ». La figure 16 représente les tissus observables suite à une coupe longitudinale de bivalve.

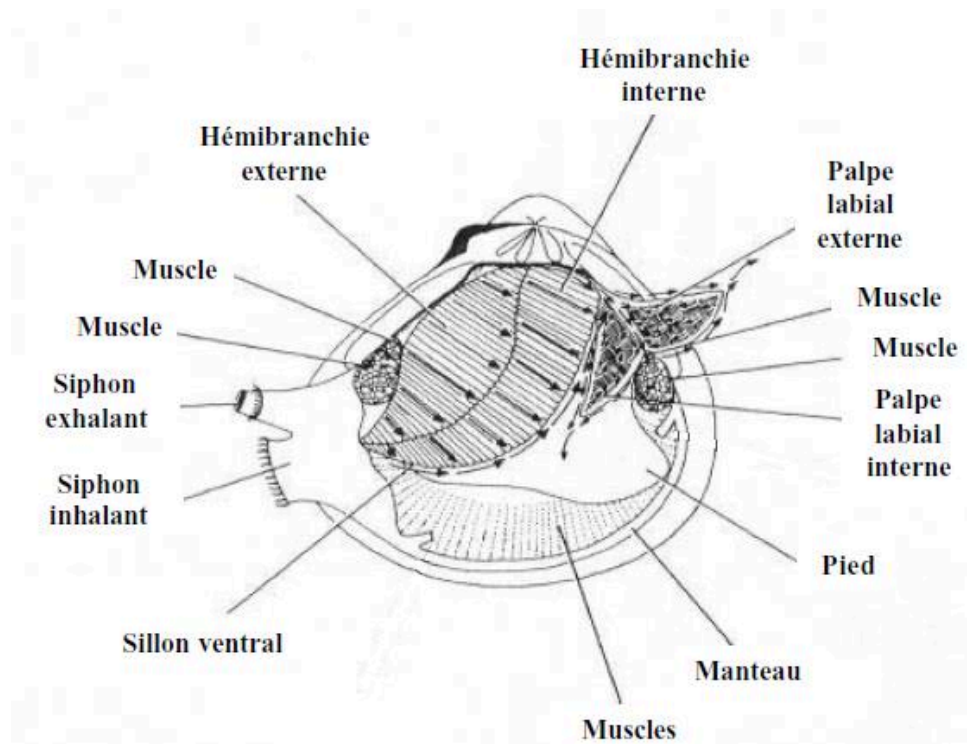


Figure 16 : Coupe longitudinale de bivalve (Vidal, 2001).

Différents muscles sont accrochés aux valves dont les muscles adducteurs (antérieur et postérieur) qui permettent leur fermeture. Le pied est aussi un muscle, il permet l'enfouissement de l'organisme dans le sédiment. Le manteau recouvre la face interne des valves. Il permet de maintenir l'ensemble des tissus dans la partie interne de la coquille et est également responsable de la formation de la coquille. Il se termine en partie post-latérale par deux siphons (inhalant et exhalant) qui permettent les échanges avec le milieu environnant. Les siphons possèdent des cils sensoriels qui sont sensibles aux variations du milieu environnant.

Les branchies (cténidies) sont repliées au niveau du manteau et sont formées de deux hémibranchies. Celles-ci sont constituées de filaments branchiaux sur lesquels se trouvent des cils, responsables de l'activité ventilatoire qui permet de mettre en mouvement l'eau dans la cavité branchiale. L'eau entre par le siphon inhalant, passe par la cavité branchiale, puis par la branchie. La branchie est à la fois responsable de la nutrition en piégeant les particules alimentaires (phytoplancton, bactéries, matière organique...) et est également responsable des échanges gazeux avec le milieu (diffusion de l'oxygène vers le système circulatoire). L'eau est ensuite expulsée *via* le siphon exhalant. Les particules véhiculées par l'eau sont triées par la branchie et emmenées par les cils vers la glande digestive pour être digérées. Cette sélection, qui a lieu au niveau des palpes labiaux, s'effectue sur la base de paramètres tels que la taille ou la densité de particules. Pour *C. fluminea*, la filtration atteint une efficacité de 100 % pour des particules entre 4 et 20 μm (Way et al 1990) tandis que pour *S. plana* l'optimum de filtration est atteint pour des particules de 4 à 40 μm (Hughes, 1969). Les particules qui sont ingérées passent dans la glande digestive. Le contenu y sera trié et décomposé mécaniquement. Puis, si la nourriture est acceptable, elle sera emmenée dans les diverticules digestifs pour être digérée et absorbée. De nombreuses enzymes sont présentes dans cet organe pour participer à la digestion. Les déchets du catabolisme ainsi que le contenu non digérable vont passer directement dans l'intestin. Après passage dans l'intestin, le contenu est rejeté sous forme de matière fécale *via* le siphon exhalant. Le contenu non retenu provenant de la cavité du manteau est rejeté *via* le siphon exhalant sous forme de pseudo-fèces. Certains bivalves sont également capables de se nourrir en ingérant du sédiment à l'aide de leur pied.

2. *Corbicula fluminea*

2.a. Taxonomie:

Phylum : Mollusques

Classe : Bivalvia

Sous-classe : Heterodonta

Ordre : Veneroida

Superfamille : Corbiculidea

Famille : Corbiculidae

Genre : *Corbicula*

Espèce : *Corbicula fluminea*



2.b. Répartition géographique et sites de prélèvement

Corbicula fluminea, également appelée « palourde asiatique » ou « corbicule », est une palourde vivant dans les eaux douces. Elle était présente en Amérique du Nord, en Europe et sur le continent asiatique avant la dernière période de glaciation mais sa zone de répartition s'est ensuite restreinte à l'Asie, l'Afrique et l'Australie (Araujo et al, 1993 ; Sousa et al., 2008). En France, elle a été re-découverte dans les années 1980 dans la Dordogne et s'est ensuite très rapidement propagée dans les écosystèmes aquatiques Français. Actuellement, elle est présente dans la plupart des cours d'eau, dans certains lacs et dans des canaux de navigation (Mouthon, 2000 ; Brancotte et Vincent, 2002) et est considérée comme une espèce invasive.

Dans le cadre de cette thèse, les organismes ont été prélevés à Argancy (49°19'48''58 W, 6°19'81.11 N, France) pour les expériences sur les CeO₂ NM. Une prospection terrain a ensuite été réalisée afin de sélectionner un site d'étude peu contaminé en cuivre pour réaliser les expositions aux CuO NM. Le site de La Maxe (49° 9'38.048''N, 6° 11'22.358''W, France) a été sélectionné suite à cette campagne. Elles ont été prélevées dans la Meurthe à Rosières-aux-Salines (48° 36'05.6'' N 6° 20'31.8''E, France) lors de la dernière exposition (milieu complexe, CuO NM) du fait d'une mortalité accrue observée dans la Moselle à la sortie de l'hiver 2017. La figure 17 illustre ces zones de prélèvements.

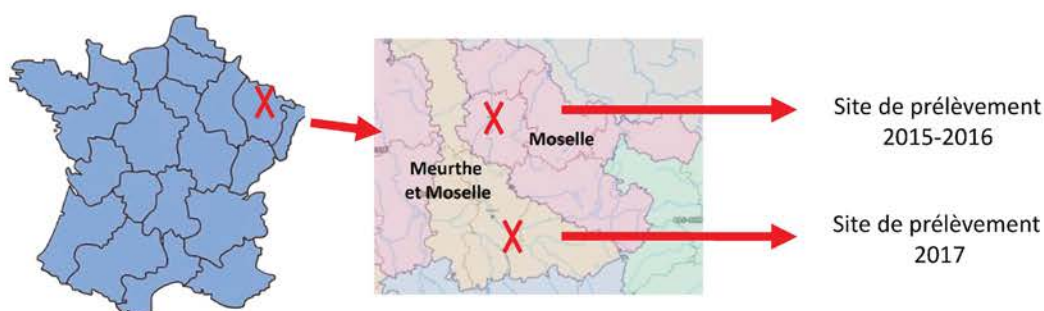


Figure 17 : Sites de prélèvement de *C. fluminea*.

2.c. Anatomie et écologie

De nombreuses espèces de corbicules ont été décrites, mais l'identification étant délicate, la taxonomie est actuellement reconsidérée en réduisant le nombre réel d'espèces. En France deux espèces ont été rapportées : *Corbicula fluminea* et *Corbicula fluminalis*. Leur différenciation peut se faire à partir de la morphologie des stries à la surface de leurs coquilles (Araujo et al., 1993). La coquille de *C. fluminalis* présente un plus grand nombre de stries que celle de *C. fluminea* (Figure 18).



Figure 18 : Différenciation de deux espèces de Corbiculidés. A gauche est présentée un individu de l'espèce *C. fluminalis* tandis que *C. fluminea* est présentée à droite. (Individus prélevés dans La Maxe (Moselle, France)).

Corbicula fluminea mesure environ 2,5 cm à l'âge adulte mais peut atteindre une taille d'environ 6 cm selon les régions. Sa durée de vie serait de 1 à 5 ans en moyenne (Kramet-Wilt, 2008 ; Sousa et al, 2008). Elle vit à la surface du sédiment (à moins de 10 cm de profondeur) du fait de la petite taille de ses siphons et peut se retrouver dans différentes granulométries (sable, vase, argile, gravier) mais préfère généralement les sédiments fins comme le sable et les argiles (Kramer-Wilt, 2008). Elle se nourrit de particules en suspension en filtrant l'eau mais peut également se nourrir de particules déposées sur le sédiment à l'aide de son pied. Elle préfère une eau bien oxygénée et des températures entre 2 et 36 degrés. Les températures plus basses ou plus hautes sont létales pour ces organismes. *C. fluminea* peut aussi tolérer des salinités allant de 1 à 24 psu après acclimatation, ce qui permet son développement aussi bien dans les eaux douces que dans les eaux saumâtres (Kramer-Wilt, 2008 ; Bertrand et al., 2017 et références citées).

2.d. Reproduction

C. fluminea est hermaphrodite et capable d'autofécondation (Sousa et al, 2008). Les gonades entourent la glande digestive. Elle rejette ses spermatozoïdes dans le milieu pour les diffuser. La fécondation a lieu dans la cavité palléale puis les larves sont incubées dans les hémibranchies jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille d'environ 250 µm, après quoi elles sont rejetées *via* le siphon exhalant dans le milieu (Sousa et al, 2008). Lorsque les conditions sont défavorables, les larves sont incubées plus longtemps. En général, les organismes se reproduisent deux fois dans l'année mais le nombre de périodes de reproduction peut varier en fonction des régions. Il est dépendant de la température ou de la disponibilité en nourriture (Sousa et al, 2008). Les juvéniles atteignant la maturité dès 3 à 6 mois, ils peuvent se reproduire l'année de leur naissance s'ils sont issus de la première période de reproduction.

3. *Scrobicularia plana*

3.a. Taxonomie

Phylum : Mollusques
Classe : Bivalvia
Sous-classe : Heterodonta
Ordre : Cardiida
Superfamille : Tellinoidea
Famille : Semelidae
Genre : *Scrobicularia*
Espèce : *Scrobicularia plana*



3.b. Répartition géographique et sites de prélèvement

Scrobicularia plana présente une large distribution géographique allant de la côte Atlantique de la Norvège et de la mer Baltique jusqu'au Sénégal et dans la mer méditerranée (Santos et al, 2011). Elle est considérée comme une espèce clé du fait de son ubiquité, son abondance locale et son importance dans la chaîne trophique estuarienne.

Durant cette thèse, cette espèce a été prélevée dans la Baie de Bourgneuf (Latitude 1°59'04'80'', longitude 47°01'50.35'') (figure 19)



Figure 19 : Site de prélèvement de *S. plana*.

3.c. Anatomie et écologie

Scrobicularia plana possède une coquille très fragile, mince et ovale qui peut mesurer jusqu'à 6.5 cm. Sa durée de vie moyenne est de cinq ans. C'est une espèce endobenthique qui vit dans le sédiment et est capable de s'y enfouir de 5 cm jusqu'à 20 cm de profondeur. La longueur de ses siphons lui permet de rester enfouie tout en filtrant l'eau ou en siphonnant le sédiment. Elle est adaptée au rythme des marées et peut se nourrir de matières en suspension (suspensivore) à marée haute et de particules à la surface du sédiment (déposivore) à marée basse. Elle se nourrit de matière organique, bactéries ou algues. La figure 20 illustre à la fois le positionnement des organismes dans le sédiment et les mouvements typiques des organismes pendant le siphonage du sédiment.

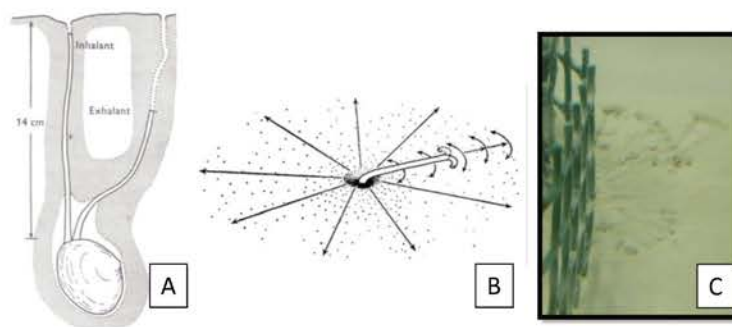


Figure 20 : A Positionnement de *S. plana* dans le sédiment, B et C Activité du siphon inhalant pendant la prise de nourriture sur le sédiment (Hugues, 1969).

La scrobiculaire est régulièrement confrontée à des changements de salinité et de température du fait de son lieu de vie qui se situe dans les zones intertidales. Ainsi, elle est capable de tolérer de grandes variations de températures et a été retrouvée dans des eaux à 6°C jusque dans des eaux à 28 °C avec un optimum thermique entre 15 et 23°C (Verdelhos et al., 2015). La salinité optimale pour *S. plana* se situe entre 20 et 30 psu mais elle est capable de tolérer une salinité à 5 psu (Verdelhos et al., 2015b).

3.d. Reproduction

S. plana est une espèce gonochorique dont les gamètes sont rejetés dans l'eau, où la fécondation et le développement embryonnaire et larvaire ont lieu. Les facteurs environnementaux tels que la température, l'ensoleillement et la ressource nutritive influencent le déclenchement de la maturation des gamètes et de la ponte (Santos et al., 2011). La maturité sexuelle est atteinte à partir de 2 ou 3 ans selon les conditions du milieu et correspond à une taille de coquille d'environ 2 cm. Le nombre de périodes de reproduction varie en fonction de la localisation, avec en général une seule période de reproduction pour les zones les plus au nord, tandis que deux périodes sont plutôt répertoriées dans les zones les plus au sud. En France, la ponte se produit de mai à juillet, suivie d'un temps de repos sexuel de novembre à janvier (Mouneyrac et al., 2008).

Chapitre III :
Evaluation du devenir et des effets des CeO₂ NM

Ce chapitre est consacré à l'étude du devenir et des effets des nanomatériaux de dioxyde de cérium (CeO₂ NM) chez le bivalve endobenthique vivant dans les eaux douces (*C. fluminea*) et est présenté en deux parties correspondant à deux expérimentations distinctes.

Etant donné leur utilisation massive dans de nombreux secteurs, les CeO₂ NM font partie des contaminants attendus en quantité significative dans l'environnement et pourtant, leurs effets sur le vivant sont encore peu connus. En conséquence, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) les a classé sur la liste de NM prioritaires à étudier afin de déterminer les risques encourus pour l'homme et l'environnement. Les études réalisées sur la toxicité des CeO₂ NM affichent des résultats contradictoires qui peuvent être liés à la grande diversité de NM utilisés. Afin d'augmenter la comparabilité des résultats entre laboratoires et projets de recherche, le JRC (Joint Research Center) met à disposition des NM de référence dont les propriétés physico-chimiques ont été caractérisées.

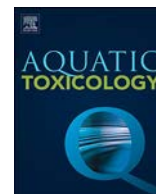
Dans la première partie de ce chapitre, les effets de CeO₂ NM de référence fournis par le JRC (NM 212) ont été déterminés aux niveaux cellulaire et moléculaire chez *C. fluminea* exposée en microcosmes sur du court terme (6 jours). Alors que l'on sait aujourd'hui que la concentration utilisée influence les propriétés physico-chimiques des NM et donc leurs effets sur le vivant, de nombreux travaux utilisent encore des concentrations fortes de l'ordre du mg/L. Pour se rapprocher au mieux des conditions environnementales, nous avons utilisé dans notre étude des concentrations proches de celles prédites pour l'environnement aquatique (ordre du µg/L) mais permettant néanmoins leur quantification dans les milieux. L'exposition a été caractérisée à travers des dosages de cérium dans la colonne d'eau et dans les organismes. Les effets ont été évalués au niveau cellulaire à travers la mesure de biomarqueurs impliqués dans les réponses antioxydantes et antitoxiques, les réserves et le métabolisme énergétique et les dommages cellulaires. Les effets ont également été déterminés au niveau moléculaire à travers l'évaluation des effets génotoxiques. Les résultats ont été interprétés à l'échelle du marqueur individuel mais également *via* une approche intégrative permettant d'avoir une vision globale des effets. L'article présenté dans cette partie a été publié dans le journal *Aquatic toxicology* en 2018 (Koehlé-Divo et al., 2018).

Dans la seconde partie de ce chapitre, l'approche moléculaire par RT-qPCR a été utilisée afin d'évaluer les effets des CeO₂ NM sur *C. fluminea*. Cette approche permet d'apporter des connaissances sur des réponses qui sont actuellement peu étudiées en écotoxicologie malgré

leur précocité et leur sensibilité. Pour cette étude, nous avons choisi des dispositifs expérimentaux de type mésocosme afin d'intégrer au mieux la complexité des conditions environnementales réelles (interactions de l'organisme/des NM avec l'eau, les sédiments et la nourriture), et ce, sur une durée d'exposition relativement longue (28 jours). Ces travaux ont également intégré le paramètre salinité. En effet, le rejet de NM dans les eaux douces peut conduire à leur transport vers les eaux marines. Sachant que la salinité aura une grande influence sur les propriétés physico-chimiques des NM, il apparaît essentiel d'évaluer les effets dans les deux types de milieux, en prenant en compte ce facteur. Parmi les NM étudiés, les NM de référence utilisés lors de l'expérience précédente ont été sélectionnés. Pour gagner en réalisme, différentes formes de CeO_2 NM rencontrées au cours de leur cycle de vie ont également été utilisées en exposant *C. fluminea* à des NM issus d'un additif à carburant (Envirox™) avant et après combustion afin de mimer son utilisation. Le protocole expérimental consistait en une exposition sur 28 jours *via* des pulses de contamination à raison de 90 μg CeO_2/L par pulse, ce qui mime un rejet périodique de contaminant. Les branchies des organismes ont été prélevées après 7, 14 et 21 jours tandis que la glande digestive et les branchies ont été prélevées au temps final (28 jours). La démarche adoptée a permis d'apporter des connaissances non seulement sur les réponses moléculaires des organismes faisant face à différents NM, à la salinité et aux effets croisés des NM et de la salinité, mais également sur les divergences de profil d'expression de gènes entre organes (branchies et glande digestive). La présente étude est complémentaire à une étude précédemment réalisée dans le cadre de la thèse de Carole Bertrand (2016-2018), dans laquelle l'évaluation du devenir des NM ainsi que l'évaluation de leurs effets à des niveaux d'organisation biologique supérieurs ont été réalisées. L'article présenté dans cette partie a été publié dans le journal *Environmental Science and Pollution Research* en 2019 (Koehlé-Divo et al., 2019).

Partie 1:

**Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a
freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)**



Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*)

Vanessa Koehl-Divo^{a,*}, Carole Cossu-Leguille^a, Sandrine Pain-Devin^a, Cécile Simonin^a,
Carole Bertrand^{a,b}, Bénédicte Sohm^a, Catherine Mouneyrac^b, Simon Devin^a, Laure Giambérini^a

^a Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

^b UBL, Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cerium dioxide nanoparticles (CeO₂ NPs)
Biomarker
Comet assay
Genotoxic
Apoptosis
Corbicula fluminea

ABSTRACT

The rapid development of nanotechnology and the increased use of nanomaterials in products used in everyday life have raised the question of the potential release of nanoparticles into the aquatic environment. Their fate and effects in natural ecosystems are not currently well understood but harmful effects of nanoparticles have been demonstrated at low concentrations on some freshwater and marine species. Cerium dioxide nanoparticles (CeO₂ NPs) are produced in large quantities and used in products in many different fields, such as automotive or optics. Because of their widespread use in daily products, CeO₂ NPs are included in the OECD priority list of manufactured nanomaterials for human and environmental assessment. Indeed some studies have been conducted to assay various enzymatic biomarkers, which showed the CeO₂ NPs potential to modify anti-oxidative defenses and cellular membrane stability. Nevertheless, only a few studies were performed on their genotoxic potential. The aim of this work was to evaluate the genotoxic and physiological effects of CeO₂ NPs on a widespread freshwater bivalve *Corbicula fluminea* by using comet assay and a multi-enzymatic biomarker approach. Exposure to two CeO₂ NP concentrations during a short term experiment (6 days) was set up. The first one (10 µg/L) was chosen in order to work with low but measurable concentrations whereas the second one was ten times higher (100 µg CeO₂ NPs/L). DNA damage was significantly more pronounced compared with control for both concentrations tested as early as two days of exposure and seemed to increase with time. Some enzymatic biomarkers of anti-oxidative defenses (total antioxidant capacity, catalase activity), anti-toxic mechanisms (glutathione-S-transferase activity, caspase-3 activity) or metabolism (lactate dehydrogenase activity) tended to increase after 6 days of exposure but only the induction of caspase pathway and DNA damages appeared significant for exposed organisms. In this study, time and concentration effects of CeO₂ NPs were highlighted by coupling genotoxic and cellular biomarker assessments.

1. Introduction

Production and use of engineered nanomaterials (ENMs) have been significantly growing for several decades because of their unique and hopeful properties that allow their use in very diverse areas such as industry, energy, agriculture, medicine and the environment. Nanoparticles (NPs) are part of ENMs and their behavior depends on properties related to the NPs themselves such as size, surface properties, synthesis method and initial concentration. Nevertheless external environment has a key role on their behavior and can highly modify it by a single parameter change such as pH, temperature, turbidity, ionic strength or presence of other components like natural organic matter (NOM) (Van Koetsem et al., 2015; Rocha et al., 2015; Peralta-Videa et al., 2011; Wiesner et al., 2009). Because of multiple properties of

NPs, their synthesis and use in the last two decades has led to an increasing diversity of existing ENMs included in daily life products. The environment and human beings are nowadays exposed to unknown amount of various ENMs for which effects cannot be predicted by classical ecotoxicological tests performed on corresponding macroscopic size material. Furthermore, no analytical method is currently available to quantify ENM concentrations in the natural environment due to the complexity of such matrices. Most information about environmental concentration is then estimated by modeling (Gottschalk et al., 2015). Thereby, fate, transformations and effects of nanomaterials into environment are poorly known and more studies are essential to assess their environmental repercussion.

Cerium dioxide nanoparticles (CeO₂ NPs) are among the most produced nanoparticles in the world, at the rate of 10,000 tons/year (Keller

* Corresponding author at: Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France.
E-mail address: vanessa.koehle-divo@univ-lorraine.fr (V. Koehl-Divo).

et al., 2013). They are used for commercial applications in several fields such as electronic and optic, painting or catalysis. These uses lead inevitably to both direct and indirect release of nanoparticles in the environment and ultimately in the aquatic compartment (Weinberg et al., 2011), which may lead to hazards to humans and the environment. That's the reason why cerium dioxide nanoparticles are among the NPs selected for priority testing by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Cerium (Ce) is one of the most abundant rare earth element and European median stream water concentration is about 55 ng/L (www.gsf.fi/publ/foregatslas/). CeO₂ NP concentrations in natural waters are nevertheless only estimated by modeling studies because of the difficulty of assessing measurements in this complex media. Few studies were conducted in order to model the potential environmental concentration of CeO₂ NPs in water but they indicate values in the range of ng/L–µg/L (Keller and Lazareva, 2014; O'Brien and Cummins, 2011; Gottschalk et al., 2015). Even if current aquatic concentrations are estimated to be very low, present or future effects should not be neglected considering their increasing incorporation in industrial and commercial products but also their emerging applications in biomedical fields.

In most studies, assessment of NM toxicity was conducted at environmentally unrealistic concentrations of exposure and with standard ecotoxicological tests that are not always representative of the environmental matrix considered. Furthermore, several studies showed that standardized tests are not fully adapted to NMs exposures because of multiple interactions with assay components or detection systems (Azqueta and Dusinska, 2015). Aquatic compartment is frequently characterized as the ultimate sink of contamination, however little data is available about the effects of CeO₂ NPs on non-standardized organisms, like widespread filter-feeder bivalves, that are considered as relevant test organisms for nanoparticle toxicity (Conway et al., 2014; Baun et al., 2008; Canesi et al., 2012). Toxicity tests using bivalves in order to assess ENM toxicity were mainly conducted with marine species, therefore data for freshwater species is scarce (Rocha et al., 2015). Contradicting results have been obtained for CeO₂ NPs that may lead either to damaging, scavenging or no apparent effects (Lee et al., 2009; Bour et al., 2015; Garaud et al., 2015; Golbamaki et al., 2015). ROS overproduction is one of the most discussed toxic effect of NPs. This overproduction can lead to the activation of anti-oxidative enzymes, like SOD, CAT and GPx, or genotoxic effects. Assessment of such enzymes, antioxidant enzymes and fitness biomarkers is useful to understand NP effects and side effects at biochemical level (Vale et al., 2016). Moreover, genotoxicity assessment of NPs is recommended by OECD for regulatory purposes asking more data for risk assessment (Nanogenotox, 2013; ANSES, 2014). The concern about potential genotoxicity is reinforced by studies revealing genotoxic effects of CeO₂ NPs in human cell lines (Auffan et al., 2009; Benameur et al., 2015). This also raises the question about genotoxicity of NPs in aquatic ecosystems, for which, as usual, data are lacking (Lee et al., 2009). In bivalves, studies of DNA damages induced by chemicals are frequently performed by the alkaline comet assay, using hemocytes or gill cells (Rocha et al., 2015). It permits the measurement of DNA strand breaks in individual eukaryotic cells and different injuries on DNA depending on the pH used during lysis and electrophoresis (Azqueta and Dusinska, 2015; Jha, 2008; Lee and Steinert, 2003; Golbamaki et al., 2015). However, since the digestive gland is the main organ for ENM accumulation in bivalve mollusks (Hull et al., 2011; Rocha et al., 2015), DNA damage assessment in this organ is particularly relevant. Integrative vision of NP effects coupling different scales of organization should be a good way to understand their potential toxicity. Thus, monitoring both genotoxicity and other cellular responses to stress should allow a broad and complementary view of NP effects.

The aim of this work was to study the potential impacts of CeO₂ NPs on non-target aquatic organisms like bivalves, known as efficient bioaccumulators of contaminants. Therefore, we selected a widespread freshwater sediment-dwelling bivalve *Corbicula fluminea* to achieve this

goal. In order to perform a more realistic exposure while staying in a quantifiable range of concentrations, concentrations representative of 10–100 times (10–100 µg/L) the maximal Predicted Environmental Concentration (PEC) values were employed (O'Brien and Cummins, 2011). A short-term exposure was carried out for 6 days and genotoxic effects were followed at 2 and 6 days and coupled with a multi-biomarker approach at biochemical and physiological scales. The alkaline comet assay was performed to detect DNA damage, and a battery of biomarkers involved in response to oxidative stress, detoxification, cellular damages and energy metabolism was used to determine biochemical and physiological effects. A Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) was employed to elicit an integrative vision of responses of control and exposed organisms according to NPs concentration and exposure time.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Cerium dioxide uncoated nanomaterials (CeO₂; NM-212) of 20–25 nm in diameter were provided as powder from the Joint Research Center (JRC) Institute (Ref: CeO₂- JRCNM02102a003903). Observations made using Dynamic Light Scattering were in accordance to those reported by the JRC. They were monodispersed in ultra-pure water and had a mean size of 225.4 ± 92.47 nm. A stock suspension of 1 g/L was prepared in deionized water in accordance with the guideline described by the JRC Science and Policy Report (Singh et al., 2014). An intermediate solution of 100 mg/L was prepared in deionized water from the stock suspension and used to inoculate media of bivalve exposure (artificial water) in order to have 0, 10 and 100 µg CeO₂ NPs/L. Nanoparticle solutions were sonicated in ice for 20 s at 90% amplitude before use.

Artificial seawater was made using Tropic Marine[®] sea salt (Tropicarium Buchshlag Dreieich Germany) to allow reproduction of medium for all experiments (Mouneyrac et al., 2002). All other chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Chemical Co, St Louis, MO) and Thermo-Scientific (Waltham, Massachusetts).

2.2. Collection of clams and acclimation to the laboratory

Freshwater clams *Corbicula fluminea* (2 cm length) were hand-collected (Moselle, Metz, France) in May 2015, transported to the laboratory and acclimated in a temperate room progressively for 10 days by gradually increasing the artificial water percentage from 0 to 100%. Artificial water was made using commercial salt (TropicMarin[®]) and adjusted to 2.9 ± 0.06 PSU. Forty-three clams were placed in 5 L of artificial water with bubbler and glass beads. Temperature was 17.5 ± 0.4 °C with a 16:8 (day:night) photoperiod for the entire acclimation period.

2.3. Exposure design

The experiment was conducted in artificial water for 6 days. Temperature was kept at 15.4 ± 1.3 °C. A 16:8 (day:night) photoperiod was applied. No renewal of water was carried out and no oxygenation was ensured during the experiment in order to avoid interference with nanoparticles. Temperature, conductivity, O₂ and pH were measured a few centimeters under the surface at each sampling date with ODEON[®] probes (Kit Ponsel Odéon open X with PHEHT, C4E and ODOT probes). Fourteen organisms were exposed per treatment. Water was sampled for [Ce] whereas organisms were sampled for [Ce], genotoxic and physiological responses analysis after 0, 2 and 6 days of exposure.

2.4. Water and digestive gland Ce concentrations

Total water [Ce] (in $\mu\text{g/L}$) was measured by ICP-MS Agilent 7700 (Micropollutants Technologies SA, Saint-Julien-lès-Metz, France) after 0, 2 and 6 days of exposure. Bioaccumulation of Ce was measured in the digestive gland (DG) of three clams per treatment after a 24 h depuration time in clean artificial water. Tissues were dry weighed. Then 1 mL HNO_3 32.5% was added to dry tissues and left in the oven during 72 h at 65 °C. Finally 4 mL MilliQ water was added to each sample and [Ce] was measured by ICP-MS. $[\text{Ce}]_{\text{DG}}$ was expressed in $\mu\text{g Ce/g dry weight}$ ($\mu\text{g/g dw}$).

2.5. Digestive gland dissection and homogenate preparation

After removal of the shell, the digestive gland (DG) of 14 clams per treatment were excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Whole gland of 6 clams per treatment were used for comet assay while 3 glands were used for Ce bioaccumulation measurements (see 2.4.). The 5 remaining digestive glands were then treated as described in [Sroda and Cossu-Leguille \(2011\)](#) for cellular biomarker measurement. Digestive gland were defrosted, weighed and crushed at 4 °C in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitor at a 8/1 vol/weight ratio. The mixture was then centrifuged for 5 min at 4 °C at $250 \times g$ and each supernatant was divided in two parts: one was used for the assays of total protein, LOOH content, ACP and ETS activity, while the other part was centrifuged $1000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected and a second 50 min centrifugation was performed at $20,000 \times g$ at 4 °C. The final supernatant, corresponding to the cytosolic fraction, was used for enzyme activity.

2.6. Biomarker measurements

2.6.1. Biochemical and physiological biomarker assessment

Biomarker analysis was performed on the automated spectrophotometer analyser (Konelab 20 XTi, Thermo Scientific) using protocols described in [Garaud et al. \(2016\)](#) and adapted for *C. fluminea* by [Bertrand et al. \(2016\)](#). Total protein content ([prot]), lipid hydroperoxide concentration ([LOOH]), acid phosphatase activities (ACP) and mitochondrial electron transport system (ETS) activity were measured using the whole homogenate, whereas total protein content, total antioxidant capacity (TAC), total glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activity, and caspase-3 activity (Casp-3) were measured in cytosolic fractions. Catalase activity (CAT) was measured spectrophotometrically according to [Garaud et al. \(2015\)](#) and [Bertrand et al. \(2016\)](#).

2.6.2. Comet assay – DNA damage assessment

The comet assay was performed under alkaline conditions adapted from [Singh et al. \(1988\)](#) for *C. fluminea* DG cells. Cellular suspension from DG was obtained by mixing small pieces of DG with 1.5 mL 0.01 M phosphate-buffered saline solution (PBS) under agitation for 5 min at room temperature and centrifuged for 1 min at $23 \times g$. The resulting supernatant was centrifuged for 7 min at $50 \times g$; the resulting supernatant was centrifuged for 7 min at $100 \times g$. The resulting pellet was then suspended with 200 μL 0.01 M PBS. Viability of digestive gland cells was microscopically checked using trypan blue (0.5%: W/V) dye exclusion test for each treatments before conducting the comet assay. According to [Tice et al. \(2000\)](#), the test can be performed when cell viability is equal or more than 80% as in all our experiments.

Slides were prepared in duplicate for each sample. Microscope slides were pre-coated with a first layer composed by 90 μL Normal Melting Point Agarose (NMPA, 0.8% diluted in 0.01 M PBS) and were allowed to dry for 7 days. Then, 80 μL of a mixture of cell suspension and 1% Low-Melting Point Agarose (LMPA) (v/v ratio) were transferred onto slides

to compose the second layer. A third layer composed of 75 μL 0.5% LMPA was formed. The slide was finally given 10 min at 4 °C for polymerization. The cells were then lysed for 1 h at 4 °C in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 100 mM Tris pH 10, 1% N-laurylsarcosinate, 1% Triton X-100, 10% DMSO). Then, slides were placed in an electrophoresis unit for 20 min in the electrophoretic solution (300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA , pH > 13) in order to induce DNA denaturation. Electrophoresis was thereafter performed for 20 min at 300 mA and 20 V cm^{-1} in the same electrophoretic solution. Afterwards, slides were removed from the electrophoresis bath and kept to dry 10 min before being submerged twice for 10 min in a porcelain tank containing neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) followed by a 5 min submersion in 95% ethanol porcelain tank and then let to dry 10 mins. Slides were stained with 40 μL of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide before analysis and then observed using an epifluorescence microscope (BX60; Olympus) linked to an image analysis system (Comet Assay IV Image analysis system, PI, UK). Cells were blindly analyzed at the central part of each slide. A hundred cells per slide were scored out of a total of 200 cells per clams. The percentage of DNA in comet tail was chosen to express DNA damage. Arbitrary classes of DNA damage were made to present the distribution of cells as a function of the tail DNA percentage: 0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80%, 80–100%. The tail length was selected to complete the integrative model using all biochemical and physiological biomarkers with genotoxicity data. The tail length was also measured on organisms directly after sampling in the river.

2.7. Statistical analysis

Data were collected and treated using R ([R Core Team, 2014](#)). Homoscedasticity and normality were checked for each test by using Levene and Shapiro-Wilk tests respectively. When the conditions were confirmed, a one-way ANOVA was performed in order to compare time effect on non-exposed organisms and two-way ANOVA was performed to compare experimental groups with a threshold of $p \leq 0.05$ considered as significant. Post-hoc Tukey HSD tests were done to verify differences between pairs of values. Nonparametric data were analyzed using Kruskal-Wallis test.

2.8. PLS-DA

A Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed in order to obtain a global description of the relationships among the whole battery of biomarkers, comet tail length and the different treatments over time. A representation of exposure conditions was made on a factorial plane while only variables with VIP > 0.8 (Variables of Importance in the Projection) were plotted on a correlation circle in order to focus on important biomarkers. Finally, Hotelling T^2 tests with a Benjamini and Hochberg risk correction ([Benjamini and Hochberg, 1995](#)) were performed between exposure conditions to assess the effect of the two studied factors.

3. Results

3.1. Ce concentration in the water column

Due to the low dissolution of CeO_2 NPs ([Singh et al., 2014](#)), the majority of measured Ce should come from NPs and so, total [Ce] were measured. [Ce] in the control sample was under the quantification limit (0.5 $\mu\text{g/L}$) at each date. At the beginning of the exposure, $0.5 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$ and $7.2 \pm 6.7 \mu\text{g/L}$ were retrieved in the water column for 10 $\mu\text{g CeO}_2$ NPs/L and 100 $\mu\text{g CeO}_2$ NPs/L respectively ([Fig. 1](#)). After 2 and 6 days of exposure, the nominal concentration for the group 10 $\mu\text{g CeO}_2$ NPs/L was under the quantification limit. Ce concentration decreased in the 100 $\mu\text{g CeO}_2$ NPs/L media between the beginning and 2 days of exposure and reached $2.7 \pm 1.3 \mu\text{g/L}$. All treatments

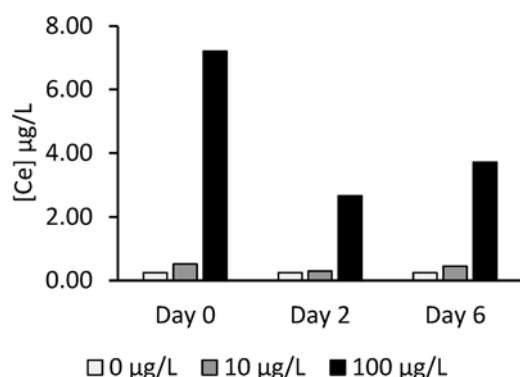


Fig. 1. Total [Ce] in the water column after introduction (Day 0) and after 2 and 6 days of exposure to nCeO₂ NPs at 0, 10 and 100 µg/L.

remained relatively stable between 2 and 6 days for all exposure concentrations.

Other parameters such as temperature, pH, salinity or redox potential (Table S1) were very similar among all treatments suggesting that the only difference between exposures was CeO₂ NPs injection.

3.2. Ce bioaccumulation in digestive gland

At the beginning of the experiment, control mussels had mean Ce concentrations of 0.21 ± 0.16 µg/g dw (Fig. 2). After 2 days of exposure, clams reached mean values of 0.14 ± 0.07 , 0.2 ± 0.08 and 0.46 ± 0.46 µg Ce/g dw for 0, 10 and 100 µg CeO₂/L exposure respectively. After 6 days of exposure, means internal concentrations were 0.19 ± 0.10 , 0.16 ± 0.02 and 0.23 ± 0.08 µg Ce/g dw for 0, 10 and 100 µg CeO₂/L exposure respectively. Results showed no significant differences in Ce bioaccumulation under CeO₂ NP exposure (Kruskal-Wallis test, $p = 0.5388$).

3.3. Comet assay (Determination of DNA strand breaks)

Significant differences in the percentage of DNA in comet tails (Fig. 3) and in tail length (Fig. 4) were observed after 2 and 6 days of exposure in exposed groups compared to control ones. Fig. 3 shows that control organisms presented a similar profile throughout the time with $96 \pm 1\%$ of cells displaying 0–40% DNA in tail and $4 \pm 1\%$ presented 40–60%. Organisms exposed to 10 µg CeO₂ NPs/L presented 75% of cells containing 0–40% tail DNA and 25% with more than 40% tail DNA at day two. At day six, the proportion of cells containing more than 40% tail DNA increased whereas those containing 0–20% tail DNA disappeared. The 100 µg CeO₂ NPs/L treatment led to an absence of cells containing 0–20% DNA in tail as early as two days of exposure with the

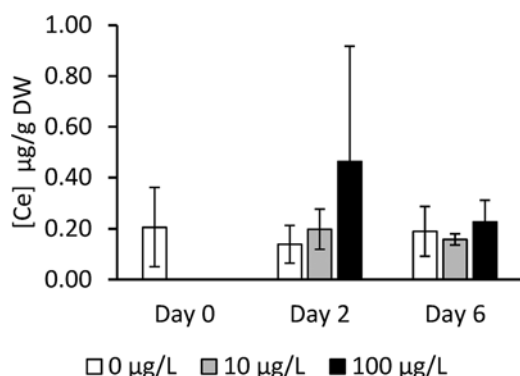


Fig. 2. Mean ($\pm$ SD, $n = 3$) total [Ce] concentrations in the digestive gland of *C. fluminea* after 0, 2 and 6 days of exposure to nCeO₂ NPs at 0, 10 and 100 µg/L. No significant differences between groups were pointed out by statistical tests.

apparition of cells containing more than 80% tail DNA.

Fig. 4 shows that the tail length measured in control organisms remained stable all along the exposure and was about 3.5 ± 1 µm, close to the value measured in organisms just after sampling (3.1 ± 0.7 µm). In exposed organisms, the mean tail length was about 6.5 ± 3.5 µm and 9.01 ± 4.5 µm after 2 days of exposure and about 8.9 ± 4.2 µm and 11.2 ± 5.2 µm after six days of exposure to 10 µg CeO₂ NPs/L and 100 µg CeO₂ NPs/L, respectively.

3.4. Biochemical and physiological biomarker responses

Only one biomarker (Casp-3) of the whole battery (Table S2) showed significant changes in exposed organisms compared to controls. Significant effects of time and CeO₂ NP exposure were observed in Casp-3 activity (Fig. 5). No significant difference of Casp-3 activity was observed during the whole experiment in control organisms or during the first two days for all exposures. However, Casp-3 activity was significantly increased at day 6 in the highest CeO₂ NP exposure concentration compared to the control group.

3.5. Probabilistic linear discriminant analysis (PLS-DA)

A PLS-DA (Fig. 6) was performed in order to discriminate each exposure group according to time and treatment. The most important parameters were comet tail length and Casp-3, ACP, GST, LDH, TAC and CAT activities. ACP, GST, TAC, CAT and LDH levels (Table S2) decreased over exposure time in control organisms. The most important variable that allowed the discrimination of exposure conditions was tail length that increased with concentration and time. A concentration effect was linked to the tail length changes, whereas time effect was mainly explained by Casp-3 activity induction in exposed organisms. Groups exposed to both tested concentrations also appeared different between 2 and 6 days of exposure. Hotelling T² test (Table 1) highlighted significant differences between exposed and control groups at day 2 and day 6. Significant differences were also observed as a function of time and concentration for exposed organisms whereas no difference seen in control ones over the exposure period.

4. Discussion

This study was conducted in order to evaluate the potential genotoxic and physiological effects of low CeO₂ NP exposure concentrations in the freshwater bivalve *C. fluminea*. First we focused on the fate of CeO₂ NPs in the exposure medium. A strong decrease of total [Ce] in the water column was observed just after introduction and represents approximately a 90% loss for both concentrations. The JRC report (Singh et al., 2014) reported that cerium dioxide nanoparticles used in our study showed high agglomeration/aggregation when dispersed in deionized water (DI water). Furthermore, these CeO₂ NPs dispersed in ecotoxicological test media such as fish and daphnia test media and seawater showed larger agglomerates than DI water, with the largest found in seawater (Singh et al., 2014). Aggregation could have occurred in our more complex experimental system because of the presence of other components (anions, cations, nutrients, trace elements) that could interact with NPs. In addition to these observations, bare CeO₂ NPs were found to homoaggregate in a few minutes in Volvic water (Tella et al., 2014). That could potentially explain the strong loss of cerium concentration just after inoculation.

NP bioavailability is supposed to be very low given their small size, even for aggregates up to 0.5 µm. However, the major route of internal exposure in suspension-feeding bivalves is capture and ingestion that could be enhanced by aggregation (Ward and Kach, 2009). Clams and mussels are known to filter large volumes of water with high efficiency, even when NP contamination occurs. Based on a post-feeding clearance experiment which followed the decrease of phytoplankton concentration, Conway et al. (2014) calculated that up to 99.9% of CeO₂ could be

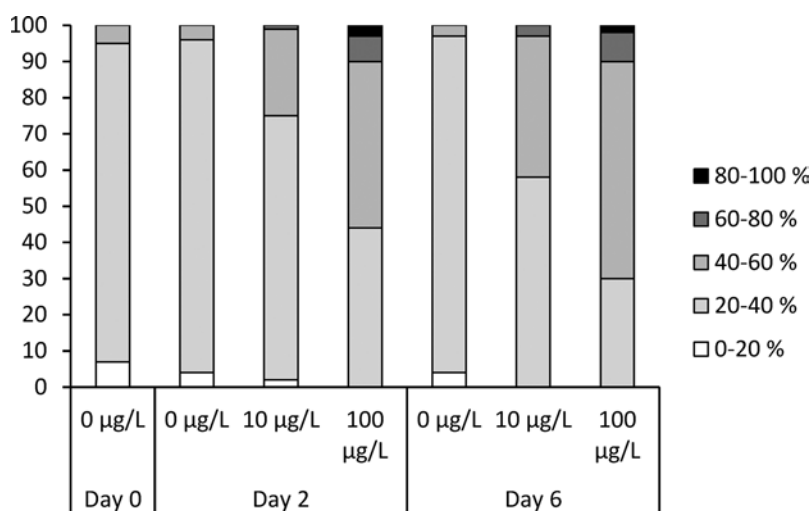


Fig. 3. Proportion of cells included in 5 arbitrary classes based on DNA in comet tail (in percentage) measured in digestive gland cells of *C. fluminea* after 0, 2 and 6 days of exposure to nCeO₂ NPs at 0, 10 and 100 µg/L.

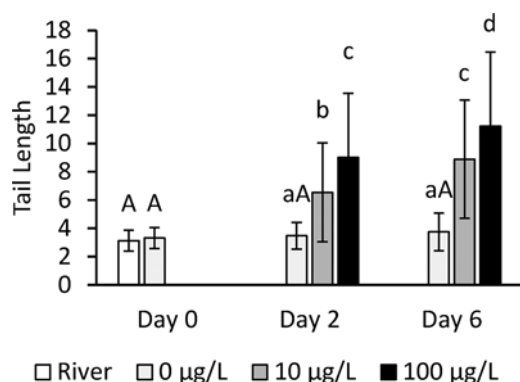


Fig. 4. Mean ($\pm$ SD, $n = 6$) Tail length measured in digestive gland cells of *C. fluminea* after 0, 2 and 6 days of exposure to nCeO₂ NPs at 0, 10 and 100 µg/L. Results obtained for the one-way and the two-way ANOVA analysis are shown in capital and lower case letters, respectively.

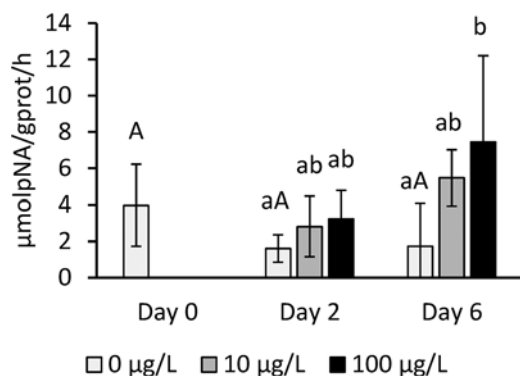


Fig. 5. Mean ($\pm$ SD, $n = 5$) Casp-3 activity in the digestive gland of *C. fluminea* after 0, 2 and 6 days of exposure to nCeO₂ NPs at 0, 10 and 100 µg/L. Results obtained for the one-way and the two-way ANOVA analysis are shown in capital and lower case letters, respectively.

filtered from the water column over 2 days by *M. galloprovincialis*. Accordingly, Montes et al. (2012) showed that almost all of the Ce mass was removed from the water column by this mussel after 24 h of exposure and was mainly transferred in pseudo-feces.

Although bivalves are able to strongly bioaccumulate a large range of contaminants, no significant bioaccumulation of Ce was depicted in this study and only a tendency could be observed in bivalves exposed to

the highest concentration. As CeO₂ NP dissolution was reported to be low (Singh et al., 2014) the major part of measured Ce should come from NPs. The combination of both NP properties (as discussed above: homo-aggregation, surface reactivity...) and filtration by bivalves may favor sedimentation, explaining the low recorded bioaccumulation. Finally, it seems that CeO₂ NPs were weakly bioaccumulated in aquatic organisms (Zhang et al., 2012; Tella et al., 2014) and some studies indicated that CeO₂ NPs were not internalized into organisms even if they were found in the digestive gland of aquatic organisms (Artells et al., 2013; Auffan et al., 2013; Manier et al., 2011; Van Hoecke et al., 2009). In accordance with these observations, Montes et al. (2012) showed a significant bioaccumulation only at the highest concentration of CeO₂ NPs in marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed over 4 days to high concentrations (1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/L), a hundred times higher than our tested concentrations. Their mass balance indicated that Ce accumulation in mussel tissues was nevertheless very low (1–3%) whereas nearly all the injected CeO₂ NPs were found in pseudo-feces. In our exposure media, Ce concentrations decreased between 0 and 2 days and stayed relatively stable until the end of the experiment. Considering that initial exposure concentrations measured in our media were very low compared to most studies, the absence of significant bioaccumulation was not surprising.

In order to study the potential CeO₂ NP effects on *C. fluminea*, a two dimensional approach coupling genotoxic and physiological measurements was performed. Genotoxic effects were assessed by Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE), also known as Comet assay, frequently used to measure and evaluate DNA damages owing to its sensibility, rapidity and relative simplicity. In this study, Comet assay was performed at pH > 13 in order to allow the detection of single and double-strand breaks but also alkali-labile sites. It has been demonstrated that a large tail length can be associated with both a high and a weak intensity of tail. For this reason, both the tail length and the intensity of the tail were used here as Lee and Steinert (2003) proposed. Cells are constantly exposed to DNA damage caused by various sources and have developed a molecular and cellular set of defense systems to handle the damage. However, exposure to external or environmental sources such as UV light, ionizing radiations or genotoxic agents can amplify damages. Some of them could be repaired. Nevertheless some are irreparable and affected cells can trigger cell death by activation of apoptosis in order to eliminate potentially damaged cells (Matt and Hofmann, 2016). Our results indicated that DNA damage increased with time and concentration of exposure in both exposed groups but stayed constant in control organisms. CeO₂ NPs induced significant DNA degradation in other organisms like *Daphnia magna* and

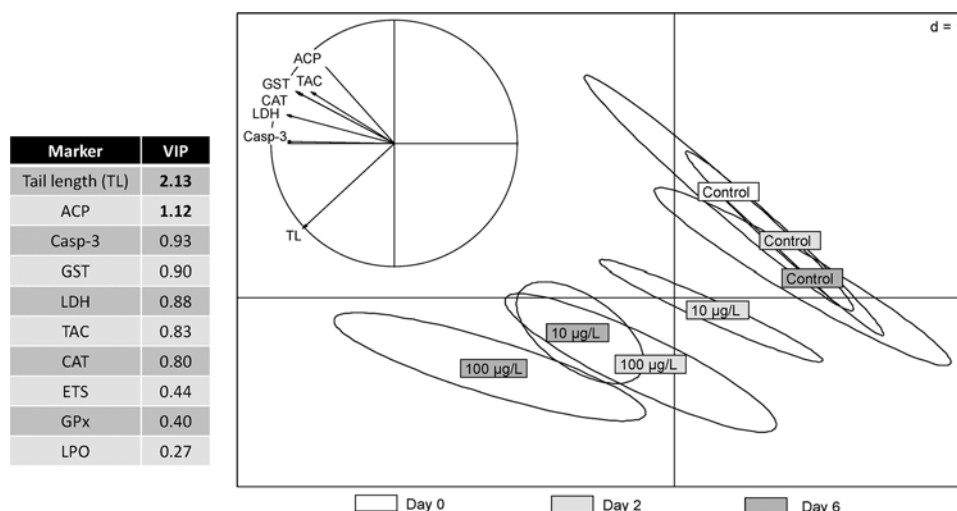


Fig. 6. PLS-DA performed with the whole set of physiological biomarker data and comet tail length values. Only VIP > 0.8 (Variable Importance in the Projection) are shown on the correlation circle.

Chironomus riparius, which was associated with other higher biological level perturbations (24 h, 1 mg/L) (Lee et al., 2009). Extensive DNA damage can also induce apoptosis that is considered an irreversible process, in contrast to most of the lesions revealed by the classical comet assay that could be potentially repairable (Lee and Steinert, 2003). Casp-3 is a common enzyme involved in two apoptotic pathways and can enable us to follow activation of apoptosis (Romero et al., 2015). Apoptosis may be activated by direct interactions of NPs with DNA or DNA-repair or intracellular enzymes but also by indirect ways, like induction of Reactive Oxygen Species (ROS) production. They are highly reactive products derived from the reduction of oxygen involved in the respiration process. In the present study we showed a tendency of Casp-3 to be differentially expressed at day 2, but a significant induction of Casp-3 activity at day 6 indicated a probable cell death induction via apoptosis. Genotoxic effects leading to Casp-3 response were already shown (Chen et al., 2000). Apoptosis induction after CeO₂ NP exposure was also reported (Park et al., 2008) and acts as a protective mechanism when extensive damages occur (Singh et al., 2009). Biological mechanisms inducing NPs genotoxicity are less clear. NPs are reported to have the ability to damage the genetic material by direct physical interactions as well as indirectly by the ROS generation (Li et al., 2013; Peng et al., 2017). In our study, the presence of NPs and ROS within tissues, even in low proportion, may be partly responsible for this genotoxicity leading to apoptosis. However, knowledge regarding the genotoxicity mechanisms of NPs is still in progress and complementary information could arise from future studies at molecular level.

Defense and damage biomarkers taken individually have not yet shown any significant induction of antioxidant process but only a slight tendency to activation after 6 days of exposure. Nevertheless, the integrated vision obtained by a PLS-DA showed a role of oxidative and

antitoxic mechanisms as CAT, TAC, ACP and GST activities, as well as LDH, Casp-3 activities and tail length in the discrimination of groups by time and concentration of exposure. This approach allowed the discrimination of exposed organisms from non-exposed ones as a function of time and even as a function of low tested concentrations, highlighting the sensitivity and the usefulness of this approach. The combination of our observations indicated that exposed organisms are not responding in the same way even if concentrations of CeO₂ NPs in the exposure medium are low.

In this study we used OECD recommended CeO₂ NPs and also a recommended genotoxicity test for risk assessment (comet assay) because of the lack of such data in ecotoxicology. Exposure to concentrations close to the PEC values has activated genotoxicity and cellular stress and can be mostly explained by induction of DNA damages involving enzymatic machinery and cell apoptosis that can have further impacts on the global health of the organism. These observations indicate a possible risk for Asiatic clams and underlined the need of further studies in nano-geno-ecotoxicology.

5. Conclusion

Genotoxic effects in *C. fluminea* exposed to low CeO₂ NP concentrations were underlined as earlier as two days of exposure and has increased with time, inducing apoptosis at the highest tested concentration (100 µg/L) after six days of exposure. DNA damage could induce further injuries in organisms and finally lead to death. However, defense mechanisms involved were anti-oxidant and anti-toxic enzymes but also a non-reversible process inducing programmed cell death, called apoptosis. Our results indicate a potential risk to *C. fluminea* exposed to concentrations of CeO₂ NPs close to estimated aquatic PEC

Table 1

Hotelling T² test performed on PLS-DA data set in order to assess effects of time and exposure concentrations on the biomarker battery. Using a threshold of $p \leq 0.05$, significant values were bolded.

Hotelling T ² test		Day 0	Day 2			Day 6	
		Control	Control	10 µg/L	100 µg/L	Control	10 µg/L
Day 2	Control	0.38					
	10 µg/L		< 0.001				
	100 µg/L		< 0.01	< 0.01			
Day 6	Control	0.18	0.3				
	10 µg/L			< 0.01		< 0.001	
	100 µg/L				< 0.01	< 0.001	< 0.01

values. However, the complexity of the environmental matrix may greatly modify bioavailability of NPs and interactions between NPs and other components. Further studies should be carried out with more realistic exposures such as chronic assays with more complex exposure media, in order to clarify what process occurs at the molecular scale and what is the long-term impact of cerium dioxide nanoparticles on living organisms.

Acknowledgements

Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) for running costs, CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR-10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology. KOEHL-DIVO Vanessa received financial support for salary from French Research ministry. Sharon Kruger is gratefully acknowledged for her English corrections.

References

- ANSES, 2014. Enjeux et mise à jour des connaissances.
- Artells, E., Issartel, J., Auffan, M., Borschneck, D., Thill, A., Tella, M., Brousset, L., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiéry, A., 2013. Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. *PLoS One* 8, e71260.
- Auffan, M., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Thill, A., Zeyons, O., Proux, O., Masion, A., Chaurand, P., Spalla, O., Botta, A., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology* 3, 161–171. <http://dx.doi.org/10.1080/17435390902788086>.
- Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiéry, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO₂ nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water Res.* 47, 3921–3930. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.063>.
- Azqueta, A., Dusinska, M., 2015. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Front. Genet.* 6 (239). <http://dx.doi.org/10.3389/fgenet.2015.00239>.
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* 17, 387–395. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0208-y>.
- Benamer, L., Auffan, M., Cassien, M., Liu, W., Culcasi, M., Rahmouni, H., Stocker, P., Tassistro, V., Bottero, J.-Y., Rose, J., Botta, A., Pietri, S., 2015. DNA damage and oxidative stress induced by CeO₂ nanoparticles in human dermal fibroblasts: evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity. *Nanotoxicology* 9, 696–705. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2014.968889>.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giamberini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity in the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (10), 2550–2561. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3428>.
- Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015. Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 120, 230–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.012>.
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
- Chen, Q., Gong, B., Almasan, A., 2000. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 7, 227–233. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400629>.
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and implications of trophic transfer and accumulation of CeO₂ nanoparticles in a marine mussel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1517–1524. <http://dx.doi.org/10.1021/es404549u>.
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sub-lethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeselii*. *Aquat. Toxicol.* 158, 63–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>.
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*: a mesocosm approach. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>.
- Golbamaki, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese Robinson, R.L., Benfenati, E., Leszczynski, J., Cronin, M.T.D., 2015. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale* 7, 2154–2198. <http://dx.doi.org/10.1039/C4NR06670G>.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholm, J., Christensen, F., Nowack, B., 2015. Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the danish environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 5581–5602. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph120505581>.
- Hull, M.S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.-Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J., 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloidal stable gold nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6592–6599. <http://dx.doi.org/10.1021/es200809c>.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen014>.
- Keller, A.A., Lazareva, A., 2014. Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1, 65–70. <http://dx.doi.org/10.1021/ez400106t>.
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanopart. Res.* 15. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. (Rev. Mutat. Res.)* 544, 43–64. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).
- Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 86–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.001>.
- Li, K., Zhao, X.K., Hammer, B., Du, S., Chen, Y., 2013. Nanoparticles inhibit DNA replication by binding to DNA: modeling and experimental validation. *ACS Nano* 7, 9664–9674. <http://dx.doi.org/10.1021/nn402472k>.
- Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media: influence on the results of ecotoxicological tests. *J. Phys.: Conf. Ser.* 304, 012058.
- Matt, S., Hofmann, T.G., 2016. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2829–2850. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2130-4>.
- Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J. Hazard. Mater.* 225–226, 139–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.009>.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestoidea gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Nanogenotox, 2013. Facilitating the Safety Evaluation of Manufactured Nanomaterials by Characterizing Their Potential Genotoxic Hazard. Online: www.nanogenotox.eu.
- O'Brien, N.J., Cummins, E.J., 2011. A risk assessment framework for assessing metallic nanomaterials of environmental concern: aquatic exposure and behavior. *Risk Anal.* 31, 706–726. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01540.x>.
- Park, E.-J., Choi, J., Park, Y.-K., Park, K., 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2 B cells. *Toxicology* 245, 90–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.022>.
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y., Chen, Y., 2017. Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials* 7, 21. <http://dx.doi.org/10.3390/nano7010021>.
- Peralta-Video, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.* 186, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020>.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- 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.* 111, 74–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>.
- Romero, A., Novoa, B., Figueras, A., 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: an update. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.038>.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>.
- Singh, C., Institute for Health Consumer Protection, 2014. Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, Characterisation and Test Item Preparation JRC Repository: NM-series of Representative Manufactured Nanomaterials. Publications Office of the European Union, Luxembourg. <http://dx.doi.org/10.2788/80203>.
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeselii*. *Chemosphere* 83, 538–544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.023>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1021/>

- es501641b.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview. *Aquat. Toxicol.* 170, 162–174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>.
- Van Hoecke, K., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., Schampelaere, K.A.C.D., Elsaesser, A., Meeren P.V. d. Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D., Rydzynski, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., Samber, B.D., Vincze, L., Janssen, C.R., 2009. Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4537–4546.
- Van Koetsem, F., Verstraete, S., Van der Meeren, P., Du Laing, G., 2015. Stability of engineered nanomaterials in complex aqueous matrices: settling behaviour of CeO₂ nanoparticles in natural surface waters. *Environ. Res.* 142, 207–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.028>.
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>.
- Weinberg, H., Galyean, A., Leopold, M., 2011. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 72–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.006>.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Jones, K.L., Hochella, M.F., Di Giulio, R.T., Casman, E., Bernhardt, E.S., 2009. Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk, and ecological implications of nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6458–6462.
- Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y., Zhang, Z., 2012. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89, 530–535. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.044>.

Points-clés

- L'exposition de corbicules à des concentrations de CeO₂ NM de l'ordre du µg/L (10 et 100 µg/L) dans la colonne d'eau n'a pas engendré de bioaccumulation significative de cérium, ce qui est probablement dû d'une part à la sédimentation rapide des nanomatériaux de la colonne d'eau et d'autre part à la capacité des bivalves à sélectionner les particules d'intérêts via les branchies.
- Des effets génotoxiques sont apparus dès 2 jours, suivis au 6^{ème} jour d'une intervention du système de détoxification, du métabolisme anaérobie et de l'activation de la mort cellulaire programmée (apoptose). Les effets ont augmenté avec la concentration et le temps d'exposition, indiquant des impacts préoccupants pouvant mener à terme à la mort de l'organisme.
- Les résultats de cette expérience montrent des effets particulièrement délétères sur la glande digestive des corbicules exposées à court terme à des concentrations faibles de CeO₂ NM.
- L'exposition des organismes dans un milieu plus complexe (tel que l'environnement) pourrait modifier la biodisponibilité et la toxicité des NM. Des expériences seront donc nécessaires pour vérifier leur répercussion sur du plus long terme et dans des conditions plus complexes afin de se rapprocher des conditions environnementales.

Partie 2:

***Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂
nanomaterials and salinity**



Corbicula fluminea gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity

Vanessa Koehlé-Divo¹ · Sandrine Pain-Devin¹ · Carole Bertrand^{1,2} · Simon Devin¹ · Catherine Mouneyrac² · Laure Giamb  rini¹ · Bénédicte Sohm¹

Received: 28 November 2018 / Accepted: 20 March 2019
  Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Cerium dioxide nanomaterials (CeO₂ NMs) are used in different fields and incorporated in daily products. Several studies highlighted their effects on organism physiology, although molecular studies remain scarce. NM behavior is strongly dependent on the environment but few data are available using complex exposure media, raising the question of its environmental impacts. The aim of the present work was to assess the toxic potential of three CeO₂ NMs in *Corbicula fluminea* at a molecular level by RT-qPCR under a more realistic scenario of exposure, in a multistress context at two different salinities (1.5 and 15 psu). *C. fluminea* was exposed for 28 days to pulses of the three selected NMs (reference, manufactured, and aged manufactured). In bivalves, the gills and digestive gland are two key organs used for ecotoxicological studies. The expression change of 12 genes was measured in control organisms after 28 days in both organs, allowing us to clearly separate the responses for both organs and salinities. As gills come in contact with the environment first, we monitored gene the expression at intermediate time points (7, 14, and 21 days) for this organ in order to highlight clams responses to NM and salinity. Two genes (Se-GPx, MnSOD) had a salinity-dependent level of expression. HSP70, Se-GPx, and Trxr mRNAs presented significant changes in their expressions in the presence of NM. This study was completed using an integrated statistical approach. The exposed organisms differed more from control at field salinity than those exposed to hyper-saline conditions. At 15 psu, salinity pressure seems to cause the first molecular impact. At 1.5 psu, gene expression patterns allowed the effect of each NM to separate clearly. These results confirmed the usefulness of gene expression studies. Moreover, we highlighted the necessity to assess the environmental toxicity of the different forms of manufactured NM.

Keywords *Corbicula fluminea* · Gene expression · CeO₂ pristine and aged nanomaterials · Mesocosm · Salinity

Introduction

Engineered nanomaterial (NM) production and use are still growing despite the lack of robust information regarding their

environmental fate and effects. Their increasing use necessarily leads to an elevation of their concentration in the environment. Because of their specific physico-chemical properties and associated reactivity, their presence in environmental matrices might conduct interaction with the biota and harmful effects can be expected (Park et al. 2007). Hence, some widely used NMs were listed in OECD priority lists of manufactured nanomaterials for safety evaluation (OECD 2010). Cerium dioxide nanoparticles are part of the priority lists. As cerium dioxide nanoparticles are mostly found in polishing agents and in fuel additives, their use results in immediate environmental release (Wang and Nowack 2018a). Their environmental predicted concentrations (PEC) are 2 ng/L in European surface waters and 46  g/kg in sediments while their predictive no effect concentration (PNEC) in freshwaters was estimated to be 2.62  g/L. According to the estimated release, no risk is predicted until 2020. However, their production

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04927-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

  Vanessa Koehlé-Divo
vanessa.koehledivo@gmail.com

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

² Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), Université Catholique de l'Ouest, 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

continues to increase substantially (Wang and Nowack 2018a, b). Therefore, their putative interaction with the biota is of major concern and their effects in relevant biological matrices have to be assessed.

When assessing the fate and effects of NM, one major concern lies in the difficulty of understanding and anticipating their behavior in complex matrices. In laboratory experimental studies, NM behavior may be affected by the physico-chemical characteristics of the NM itself (size, coating, etc.), of the surrounding media, by the exposure duration, or by the presence and the activity of test organisms themselves, making comparisons between studies particularly difficult. In the case of CeO₂ NMs, the Joint Research Center (JRC) proposed a well-characterized representative cerium dioxide nanomaterial (NM-212) allowing for the comparison between the results from different laboratories and projects (Singh and Institute for Health and Consumer Protection 2014). Providing such reference material is a useful step for NM characterization and risk assessment, but this comparative approach is not sufficient. Alteration occurring after NM incorporation in the product and after daily-life use may change their properties and then their toxic potential. It was thus demonstrated that CeO₂ NMs from a fuel additive (Envirox™) were subjected to some modifications after combustion, mimicking changes occurring after consumer use. These modifications affected NM properties such as size, coating, morphology, and the presence of surfactants that could considerably change their physico-chemical properties (Auffan et al. 2017; Dale et al. 2017). Therefore, alteration and aging have to be investigated to better understand NM's potential effects on the environment (Auffan et al. 2017).

Aquatic ecosystems are the ultimate sink of a wide range of contaminants. The intentional or incidental release of NMs may enhance their introduction in freshwaters that flow to the ocean with approximately 40,000 km³/year, resulting in NM transportation to marine waters. The modification of salinity between freshwaters and marine systems may influence NM physico-chemistry and needs to be taken into account for a full environmental evaluation (Bertrand et al. 2016). The high ionic strength in salt waters will encourage CeO₂ NMs sedimentation that will be quickly removed from the water column (Keller et al. 2010). Indeed, NM fate and behavior in the field diverge considerably depending on medium complexity but most laboratory studies so far have mostly used simplified and standardized exposure media. Experiments assessing low levels of NM effects using exposure conditions closer to the environmental ones (e.g., water, sediment, food, and bacteria) are currently scarce in spite of their relevance (Bottero et al. 2015).

In order to evaluate the potential cellular stresses, analysis of gene expression at mRNA level is an appropriate tool (Piña et al. 2007; Calzolari et al. 2007) because it enables to detect early warning signals of chemical impact (Bigot et al. 2011;

Chen et al. 2015). Indeed, the first responses of organisms exposed to contamination take place at the cellular level by the change of molecular components. Then, cascade events lead to impact at the level of tissues, organisms, and even at the level of population and community on a longer timescale. Relatively few studies were performed using molecular tools in aquatic ecotoxicology in the case of NM effect assessment and were mainly done on fish, crustacean and algae species. To date, only about 20 studies have monitored their effects on gene expressions in bivalves, which represent key species for the monitoring of aquatic pollution by NMs (Rocha et al. 2015). Some published works reported strong impacts in a variety of pathways as those related to metal exposure (metallothioneins (MT)), to antioxidant and antitoxic defenses (MnSOD, CAT, Se-GPx, GST-pi, HSP70, HSP90, CYP450), to excretion processes (MRP, PGP), to ionic exchange (Na/K ATPase), to immune system (lysozymes), to cellular damages (p53, TNF- α , Ras), and to DNA repair mechanisms (rad51, Gadd45) using a variety of metallic NMs such as TiO₂ (D'Agata et al. 2014; Canesi et al. 2014; Barmo et al. 2013; Banni et al. 2016; Balbi et al. 2014; Guan et al. 2018; Shi et al. 2017), CuO (Ruiz et al. 2015; Châtel et al. 2018; Volland et al. 2018), ZnO (Li et al. 2018), Au (Volland et al. 2015; Renault et al. 2008) and Ag NMs (Ringwood et al. 2010). The only study assessing CeO₂ NM effects in a bivalve at a molecular scale monitored 3 gene expressions (Se-GPx, GST-pi, and MT) which allowed to differentiate the NM according to their coating and were related to their antioxidant properties (Garaud et al. 2016). The screening of a battery of genes implicated in numerous different pathways will thus provide useful information about the mechanism of action of NMs.

Despite the observed antioxidant properties of CeO₂ NMs (Chen et al. 2006; Das et al. 2007; Niu et al. 2007; Garaud et al. 2015), several studies highlighted harmful effects on the cells of non-bivalves eukaryotic organisms. These effects are mainly oxidative stress (Park et al. 2008; Eom and Choi 2009; Cheng et al. 2013; Lin et al. 2006; Zhang et al. 2011), inflammation (Morimoto et al. 2015), autophagy, and apoptosis (Hussain and Garantziotis 2013).

According to these previous results, our study focused on genes involved in several pathways that could be affected like (i) antioxidant and detoxification mechanisms (SOD, CAT, GPx, or thioredoxin reductase (Trxr), MT, GST, PGP, MRP), (ii) general stress response (HSP70), or even (iii) autophagy (GABARAP). The monitoring of gene expression following NM exposure and salinity changes was done in a freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. *C. fluminea* is an endobenthic filter-feeder organism living at the water-sediment interface and supporting large salinity variations. Two salinities were employed representative from the continent (1.5 psu) to brackish water (15 psu) in order to get insight on NM effects at salinities occurring from rivers to sea. In order to get closer to environmental conditions and to mimic interactions

occurring in nature, we chose to expose the bivalves in tanks filled with water, sediment, and algae as a food source. The present work focused on two organs: the gills and the digestive gland. The gills constitute the first line in contact with the environment because of their anatomic position. They ensure multiple exchanges and have to maintain cellular homeostasis (Cerqueira and Fernandes 2002). The digestive gland is the main organ for biotransformation and detoxification of contaminants.

Thereby, the aim of the study was to evaluate the molecular impacts of NM under a complex exposure scenario on *C. fluminea* exposed to (i) different forms of NM encountered under their life cycle, (ii) different salinities, and (iii) the combination of both. Gene expressions linked to antioxidant, antitoxic, autophagy, and general stress responses were analyzed after 28 days in the gills and digestive gland. As the gills are in the first place during exposure, we additionally monitored gene expression at intermediate time points (7, 14, and 21 days) in this organ. The data were analyzed by using both individual and multivariate analyses.

Materials and methods

Sampling and acclimation

Individuals of *C. fluminea* of 15–20-mm length were hand-collected in September 2014 in Argancy in the Moselle River (49° 11' 41.5" N, 6° 11' 53.2" E, France). The collected clams were transported to the laboratory in the sediment and water from the collection site. The physico-chemical parameters of the collection site were pH 7.3, temperature 13.9 °C, and salinity 1.2 psu. The organisms were then quickly placed into aerated artificial water (Tropic Marine®) at 1.5 psu at 15 °C for 3 days. Then, a progressive acclimation process was performed as described in Bertrand et al. (2017). Briefly, half of the bivalves were progressively acclimated in a 3-day step by step process to increasing salinity at 5, 10, and 15 psu (9 days). The other half was kept at 1.5 psu water for the same duration. The organisms ($n = 96$) were then placed in each experimental unit for 3 days according to their acclimation salinity, in order to stabilize in the mesocosm unit (photoperiod 16:8, temperature 19.3 °C, oxygen saturation 8.14 mg O₂/L, pH 8.1, redox potential 232.9 mV).

Tested nanomaterials

The Envirox™ product purchased from Energenics Europe Ltd. Envirox™ is a fuel additive that enhances combustion efficiency and reduces the emission of soot in diesel engines during catalytic combustion (Park et al. 2007). CeO₂ is incorporated in this product at the concentration of 26.7 ± 0.8 g L⁻¹. Two different states of Envirox™ were prepared and

characterized by the CEREGE (UMR CNRS 7600 Aix en Provence, France). Envirox™ suspension was centrifuged for 1 h at 20 °C at 396750×g. After being lyophilized, the pellet was divided into two parts. One was directly used to prepare the Envirox™ exposure media. The other part was combusted in an oven for 20 min at 850 °C to simulate the car engine combustion and, in this way, mimic the aging of Envirox™. The combusted pellet was used to prepare the combusted Envirox™ exposure media. The characterization of both Envirox™ states was performed by Auffan et al. (2017). Briefly, Envirox™ particles were monodispersed and spherical with a mean size, measured by transmission electron microscopy (TEM), of 7.6 ± 1.2 nm while combusted Envirox™ particles were polyhedral with a mean size of 19.0 ± 10.4 nm. These sizes were in accordance with those obtained by X-ray diffraction (XRD). The crystalline nature observed by XRD was identical between both states and corresponded to cerianite. There were no detectable Ce(III) atoms at both Envirox™ states using the X-ray adsorption near edge structure (XANES) spectra. The organic matrix surrounding the CeO₂ particles of Envirox™ was characterized by the attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, and a complete loss of the organic matrix surrounding the CeO₂ particles was shown after the 850 °C combustion (combusted Envirox™). The dynamic light scattering (DLS) technique indicated that the Envirox™ NMs were monodispersed with an average hydrodynamic diameter at 20 nm after dilution in heptane (200 mg/L). The combusted Envirox™ showed two populations of the size of 90 and 530 nm (milli-Q water, pH 5.9). In different water salinities made using the TropicMarine™ sea salts, Auffan et al. (2017) showed that the zeta potential was salinity dependent ranging from -25 mV at 0.1 g/L (pH 6.5) to -5 mV at 30 g/L (pH 8.3). No data are available on their hydrodynamic diameters due to the colloidal instability of the aggregates (Auffan et al. 2017). The dissolution was low (< 1.5%, 48 h, with and without light) at each salinities tested (0.1, 1, 10, 30 g/L) for both Envirox™ states and was slightly less in the combusted form (combusted Envirox™) than that in the uncombusted one (Envirox™). The dissolution was also decreased at higher salinity (10 and 30 g/L) compared with that at the lower ones (0.1 and 1 g/L) (Auffan et al. 2017).

NM-212-representative manufactured nanomaterials (Ref CeO₂-JRCNM02102a/JRCNM02102a004014) were provided by the Joint Research Centre (JRC). This NM was well characterized by Singh and Institute for Health and Consumer Protection (2014). Briefly, NM-212 was polyhedral with irregular morphology and had a non-homogenous size distribution ranging from below 10 nm to well in excess of 100 nm (TEM). The crystallite sizes assessed by XRD were in the range 33.3–49 nm. The X-ray photoelectron spectrometer (XPS) results showed that the Ce⁴⁺ was the predominant form (Singh and Institute for Health and Consumer Protection

2014). Measurements by dynamic light scattering (DLS) indicate that they were monodispersed in ultra-pure water and had a mean size of 225.4 ± 92.5 nm. NM-212 powder was used to prepare 15 mL of stock suspension at 1 g/L every week during the whole exposure duration. An ultrasonication (90% amplitude in the ice tank, 20 s) was done on the stock suspension before each introduction in mesocosm as described in the Singh and Institute for Health and Consumer Protection (2014) guidelines.

Mesocosm setup

After the progressive acclimation, the clams were placed in eight mesocosms ($750 \times 200 \times 600$ mm) filled with 14 kg of synthetic sediment (90% sand, 9% kaolin, 1% CaCO_3) and 45 l of artificial water (ultra-pure water and Tropic Marin™ sea salts (Tropicarium Buchschlag Dreieich, Germany)) made at each tested salinity (1.5 and 15 psu). In order to assess the salinity effect, four mesocosms per salinity were used, 1.5 psu corresponded to the field salinity and 15 psu to the hyper-saline condition. The clams were exposed to three treatments, NM-212, Envirox™, and combusted Envirox™, for each tested salinity. Eleven injections of 4.1 mg CeO_2 NM for each treatment were made into the mesocosm water column (every 3 days) in order to reach a final concentration of 1 mg/L after 28 days of exposure. One uncontaminated mesocosm per salinity (controls) was set up. The organisms were fed during the whole experiment with 1×10^5 cells *Chlorella* sp./mL. Physico-chemical parameters in the water column (temperature, salinity, pH, redox potential, and dissolved oxygen) were continuously monitored during the whole duration of exposure.

RT-qPCR

The digestive gland and gills were used at day 28 for gene expression assessment in the different tissues, and a time scale analysis of gene response was also conducted for the gills at 7, 14, and 21 days.

Preparation of RNA extract

Both organs were dissected, snapped in frozen liquid nitrogen, and stored at -80°C until subsequent analysis. The total RNA was extracted from tissues using an RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer protocol. After extraction, the contaminated DNA was digested with DNase I (Sigma Aldrich) and the total RNA was purified with the RNeasy kit. RNA purity and quantity were assessed by optical density measurements (OD 260 nm and OD ratios 260/280 and 260/230) and RNA integrity was checked using Bioanalyseur 2100 (Agilent, CA, USA).

RT-qPCR analysis

RT-qPCR was performed on 13 genes. The primer sequences are listed in Supporting Information Table S1. The primers were designed using Primer3Plus. The cDNA was synthesized in a final volume of 20 μl by using 900 ng of RNA, 2.5 μM of random hexamer primers, and the SuperScript® III reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The qPCR reaction was conducted with 45 ng of cDNA, water (no template control) or total RNA (45 ng/reaction; no RT control) as a template, from 200 to 300 nM of primers (see Table S1), and the Fast SYBR® green master mix (Applied Biosystem®, CA, USA) in a final volume of 20 μL . The cycling conditions were 20 s at 95°C , followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C . The specificity of amplification was checked using a melting curve generated at the end of the reaction, and the size of the amplicons was verified on an agarose gel. All PCR amplifications were performed on each biological replicate using the StepOnePlus RT-PCR system (Applied Biosystems®). The gene expression levels were analyzed using the relative quantification method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) (Livak and Schmittgen 2001) with the ribosomal protein S3 gene as a reference for normalization. Condition control 1.5 psu was chosen as a reference condition for the gills' relative gene expression presentation. The final treated/control ratio and pooled standard deviation were calculated based on the mean ΔCt of biological replicates. Due to qPCR plate constraint, the four times of exposure were treated separately.

Cerium quantification in bivalves

The digestive glands of organisms ($n = 6$ per treatments) were dissected and placed in an oven (45°C) for 48 h. After dry weight determination, the digestive glands were added with 1 mL of HNO_3 (32.5%) and placed at 65°C for 48 h to release the total Ce contained in the tissues. Quantifications of Ce into homogenate were performed by Micropolluants Technologie S.A. (Metz, France) using ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies France). The results were expressed in ng Ce/g dry weight.

Statistical analysis

Statistical analyses have been conducted using R (R Core Team 2014). For the individual gene expression data, homoscedasticity and normality have been checked by the Levene and Shapiro tests, respectively. As the conditions were respected, a two-way ANOVA test was conducted to assess treatment and salinity effects. We only considered variations between groups that presented a fold change (FC) between groups compared with the control $1.5 \text{ psu} \pm 1.5$ ($\text{FC}_{\log 2} \pm 0.58$). The Tukey HSD post hoc analysis was performed when significant differences were depicted with the ANOVA.

The multivariate structure of the gene expression dataset was required to apply a specific set of statistical tools. First, a MANOVA—multivariate ANOVA—was set up to assess if significant differences accorded to the tested factors could be depicted. These results help us to design each partial least square discriminant analysis (PLS-DA) that highlights the genes explaining those differences. Only a variable (i.e., gene) with a VIP (variable importance in projection) score above 0.8 was considered. Finally, the Hotelling T^2 test was performed on the PLS-DA results to explore more thoroughly the differences between the exposure conditions.

Results

Comparative gene expression between the gills and digestive gland

After 28 days, the set of monitored genes allowed us to clearly differentiate the digestive gland and gill gene expressions in control organisms (Fig. 1A). The MANOVA pointed out the significant impact of both the salinity ($F = 16.6_{2,14}$ df, $p < 0.001$) and organ ($F = 102_{2,14}$ df, $p < 0.001$) but no significance for their interaction ($F = 0.8_{2,14}$ df, $p = 0.48$). These results are confirmed by the Hotelling test (Fig. 1B). The digestive glands presented more mRNAs for MT, CAT, Se-GPx and to a lesser extent GST-Pi whereas gills had more mRNAs for MRP1, PGP, and HSP70. The MnSOD transcript appeared more pronounced in both organs in the organisms exposed to the highest salinity (15 psu) compared with that of the field salinity (1.5 psu).

MANOVA made on the entire gene expression data from non-exposed and exposed organisms after 28 days (Fig. 2) indicated significant differences among organs ($F = 542_{2,68}$

df, $p < 0.001$) and contaminations ($F = 2_{6,138}$ df, $p = 0.037$) while their interaction was not significant ($F = 1.6_{6,138}$ df, $p = 0.16$). Pairwise comparisons demonstrated a clear organ effect, but no contamination effect (Table S2). NM responses seemed nonetheless to be more pronounced in the gills with both Envirox™ states that tend to respond differently from NM-212 and control, while in the digestive gland, no tendency was observable.

Temporal monitoring in gills

Individual gene expression

Four genes (HSP70, MnSOD, Se-GPx, and Trxr) presented significant changes during the time course of the experiment (Fig. 3). However, no clear patterns were evidenced considering neither salinity nor exposure to NMs.

For HSP70, mRNA levels in combusted Envirox™ were significantly different from those in control, NM-212, or both, at both salinities and at all time points except at day 28 at 15 psu. Even if it is not systematic, we observed that both Envirox™ products induced a similar response, often different from the response in the two other conditions. Actually, Envirox™ products tended to lead to decreased mRNA levels, except at day 14. With respect to salinity, we did not observe any difference except at day 21, when every exposure condition led to decreased mRNA levels at 15 psu.

For MnSOD, we did not record any change in mRNA levels in organisms exposed to the NM conditions at each salinity. However, the highest salinity (15 psu) induced an increase of mRNA levels in each exposure condition at 7 and 14 days and in Envirox™ at 28 days while a decrease is observed in combusted Envirox™ at day 21.

Fig. 1 PLS-DA performed with the whole dataset for both organs (digestive gland and gills) collected in control organisms exposed 28 days in mesocosms. **a** The correlation circle (top) with only genes that displayed a VIP > 0.8 and the factor plane (bottom) showing the exposure groups. **b** The results from pairwise comparison made on the PLS-DA dataset. Significant differences appeared as bold letters using a threshold of 0.05 while non-tested differences are shown as “NT”

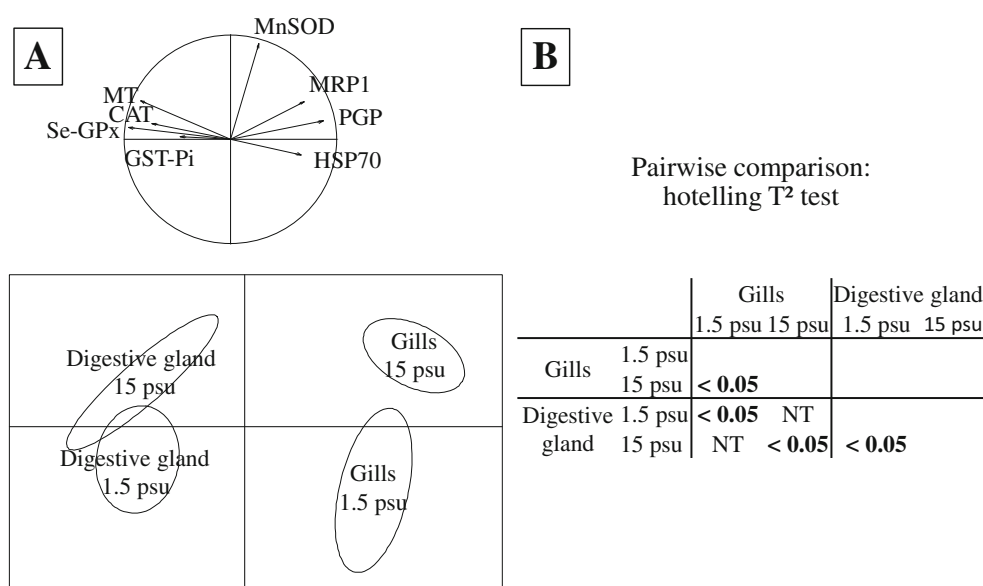


Fig. 2 PLS-DA performed with data obtained from the gills and digestive gland of organisms exposed 28 days to each contamination conditions. The correlation circle (left side) showing only genes that displayed a VIP > 0.8 and the factor plane (right side) showing the exposure groups

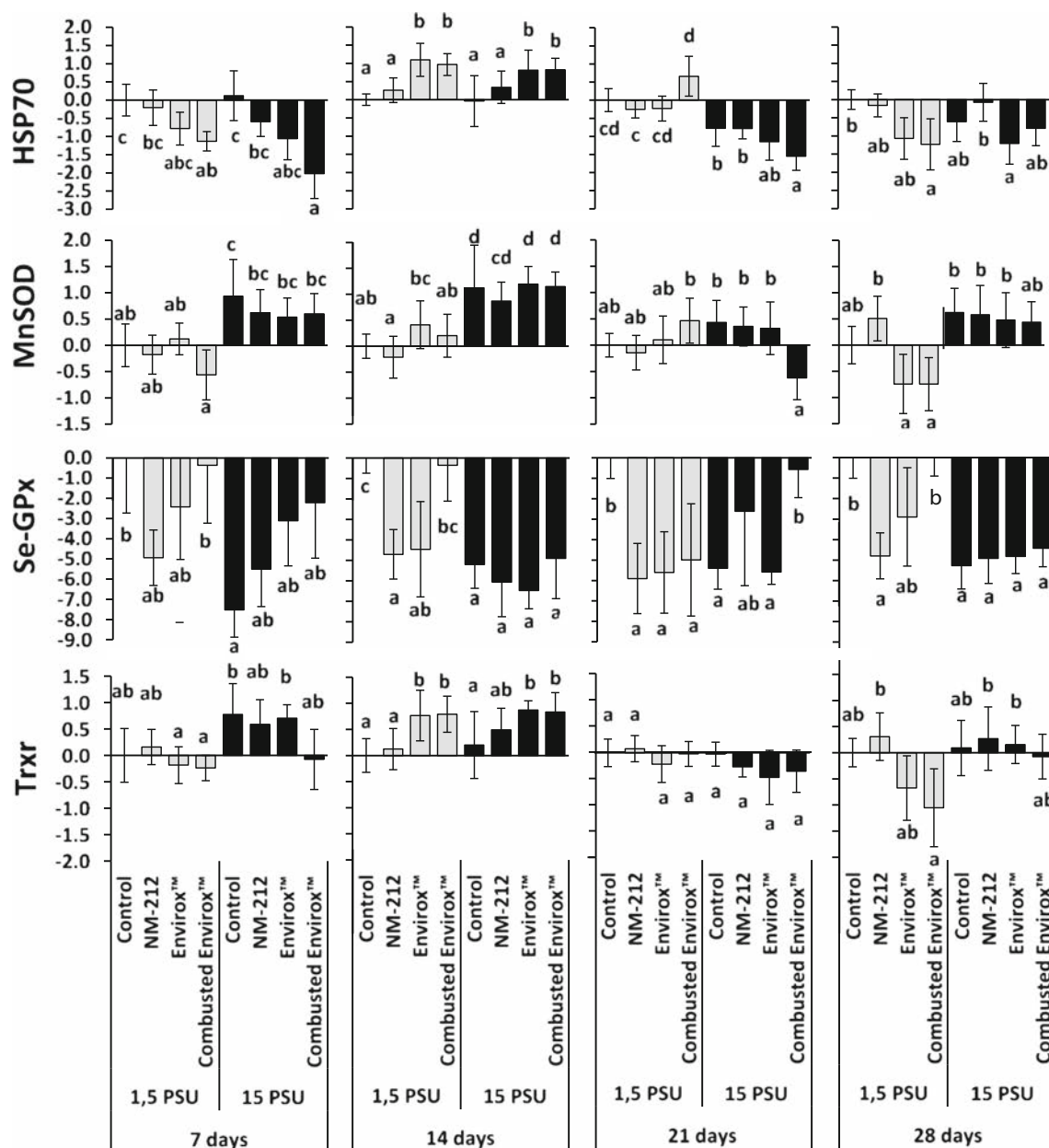
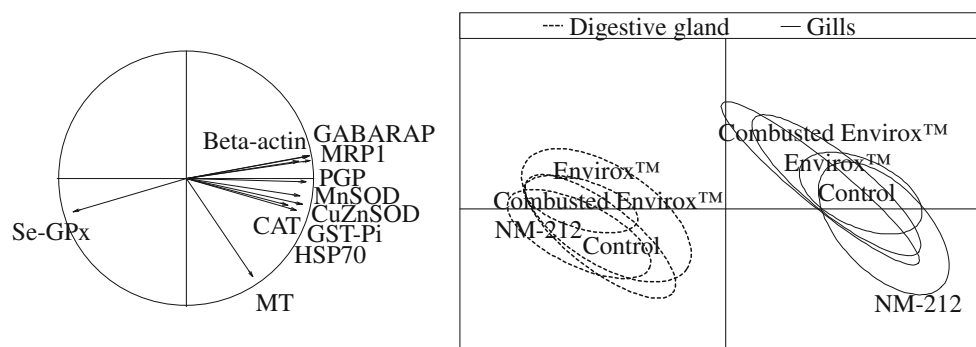


Fig. 3 Relative gene expression (expressed in log 2) of HSP70, MnSOD, Se-GPx, and Trxr genes after mRNA extraction from the gills of *C. fluminea* exposed in mesocosm during 7, 14, 21, and 28 days.

Control 1.5 psu was chosen as reference for relative expression. Groups that do not share the same letter are significantly different

For Se-GPx, mRNA levels significantly decreased (at least ninefold) in NM-212, Envirox™, or both in most time points at 1.5 psu. At 15 psu, the only difference was found at 21 days for the combusted Envirox™. When comparing the results obtained between both salinities, we observed, at 15 psu, a systematic decrease in the control relative to the control at 1.5 psu and a decrease in combusted Envirox™ at day 14 and day 28, relative to the same condition at 1.5 psu. To summarize, the overall response pattern to both NM conditions and salinity was a decrease, except in combusted Envirox™ where the decrease did not occur at day 7, 14, and 28 at 1.5 psu and at day 21 at 15 psu.

For Trxr, mRNA levels did not change at day 7, 21, and 28 (except a significant difference between NM-212 and combusted Envirox™ at 15 psu). However, at day 14, for both salinities, both Envirox™ products led to a significant increase in mRNA levels when compared with control. For 15 psu, NM-212 also led to an increase when compared with the control. When comparing the results obtained between both salinities, we did not observe any change except at day 7 for Envirox™ at 15 psu, where an increased level was recorded relative to the same condition at 1.5 psu.

The other genes presented fewer or no expression changes during the exposure (Table S3 & S4). Briefly, PGP, beta-actin, and CAT mRNA levels did not change during the exposure either between contaminations or between salinities. The other genes (CuZnSOD, MT, GST-Pi, GABARAP, and MRP1) presented some changes on just a few dates.

PLS-DA analysis

MANOVA have been conducted at each sampling time and showed some significant effects according to the salinity ($F = 40_{2,32}$ df, $p < 0.001$ for 7 days; $F = 89_{2,38}$ df, $p < 0.001$ for 14 days; $F = 12.5_{2,39}$ df, $p < 0.001$ for day 21; $F = 53.5_{2,31}$ df, $p < 0.001$ for day 28), to contamination ($F = 2.4_{6,66}$ df, $p = 0.037$ for 7 days; $F = 7.8_{6,78}$ df, $p < 0.001$ for day 14; $F = 1.9_{6,80}$ df, $p = 0.096$ for day 21; $F = 3.6_{6,64}$ df, $p = 0.004$ for 28 days), and to their interaction ($F = 3.2_{6,66}$ df, $p = 0.007$ for 7 days; $F = 1.3_{6,78}$ df, $p = 0.28$ for day 14; $F = 5.7_{6,80}$ df, $p < 0.001$ for day 21; $F = 2.9_{6,64}$ df, $p = 0.015$ for day 28). In order to focus on the effects of NM, we decided to analyze the results obtained for each salinity separately.

PLS-DA analyses were summarized in Fig. 4 and Fig. 5 for 1.5 and 15 psu, respectively, and pairwise comparison results were shown in Table S5. The PLS-DA approach indicated that NM exposures induced higher modifications of gene expression profile at field salinity (1.5 psu) than in hyper-saline condition (15 psu), whatever the sampling date.

For day 7 at 1.5 psu, all conditions were different from each other except control and NM-212 ($p = 0.11$). The horizontal axis clearly separated control and NM-212 groups from both Envirox™ products, with both Envirox™ products presenting

less CAT, HSP70, GST-Pi, beta-actin, and GABARAP mRNAs. The vertical axis separated both Envirox™ exposures, with PGP and MRP1 being higher in combusted Envirox™ while the opposite was observed for MnSOD mRNA.

After day 14 at 1.5 psu, all exposures appeared different from each other. The horizontal axis separated both Envirox™ products from control and NM-212 treatments with more MnSOD, MT, HSP70, GST-Pi, and Trxr expressed in both Envirox™ products. The vertical axis separated control from NM-212 due to the Se-GPx mRNA content.

After 21 days at 1.5 psu, all groups were different from the others except Envirox™ and NM-212. The horizontal axis pointed to differences between NM treatments with NM-212 and Envirox™ having less MnSOD, CuZnSOD, CAT, beta-actin, and HSP70 than the combusted form. The other axis separated control exposure from the others with control presenting more MRP1, GST-Pi, and Se-GPx but less MT mRNA than NM-exposed organisms.

After 28 days at 1.5 psu, Envirox™ and NM-212 were different from control mainly due to Se-GPx expression that was higher in control. The only other difference appeared between NM-212 treatment and combusted Envirox™ with NM-212 presenting more MRP1, GABARAP, HSP70, MnSOD, and Trxr while less Se-GPx mRNA. The vertical axis separated both NM-212 and Envirox™ from control with less Se-GPx mRNA measured in these treatments.

Regarding the overall pattern at 1.5 psu, two gene expressions (MnSOD, HSP70) were systematically discriminant for the PLS-DA models at all exposure times. All NM conditions appeared different from the control condition during all exposure time except for NM-212 at 7 days and combusted Envirox™ at 28 days.

For 7 days at 15 psu, no significant difference was observed except for Envirox™ and control. The horizontal axis separated control from Envirox™ ($p < 0.05$) and combusted Envirox™ (NS, $p = 0.06$) with control presenting less Se-GPx mRNA but more HSP70 and GABARAP mRNAs. Gene expressions of Trxr, PGP, and MRP1 also allowed for a separation between control and Envirox™.

After 14 days at 15 psu, Envirox™ appeared significantly different from control while the only other difference pointed out was between NM-212 and combusted Envirox™. Envirox™ presented more HSP70, Trxr, GST-Pi, CuZnSOD, and MnSOD mRNAs than control. The vertical axis underlined some differences between NM-212 and combusted Envirox™ with this last group presenting more PGP, MRP1, and Se-GPx mRNAs.

After day 21 at 15 psu, the only group significantly different from the others was combusted Envirox™. The horizontal axis allowed a clear separation between combusted Envirox™ and the other groups, combusted Envirox™ presenting less HSP70, GABARAP, MnSOD, and CuZnSOD mRNAs but

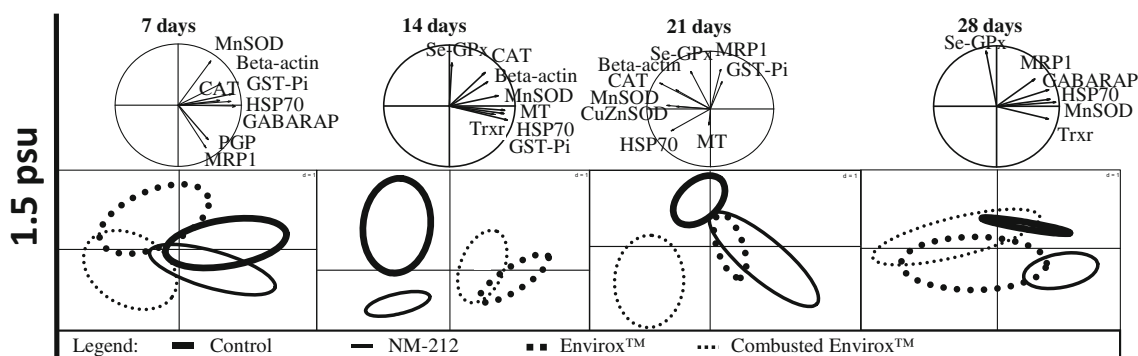


Fig. 4 PLS-DA performed with data collected on organisms exposed during 7, 14, 21, and 28 days to each conditions at 1.5 psu

more MRP1 mRNA. The vertical axis participated in this separation only between combusted Envirox™ and control/Envirox™, by modulation of GST-Pi and Se-GPx mRNA content.

After 28 days at 15 psu, the model that was mainly explained by HSP70, CuZnSOD, GABARAP, PGP, MRP1, and beta-actin gene expressions pointed out no clear pattern.

Regarding the overall pattern at 15 psu, one gene (HSP70) appeared systematically important for the PLS-DA models in all sampling dates. Differences from control were observed from 7 to 14 days for Envirox™, from 14 to 21 days for combusted Envirox™, while never for NM-212.

Bioaccumulation of Ce into the digestive gland of organisms

After 7, 14, 21, and 28 days of exposure, the total Ce concentrations in the digestive gland of bivalves exposed in the different mesocosms are illustrated in Fig. 6.

At 1.5 psu (Fig. 5-A), significant greater Ce concentrations were measured into the organisms exposed to Envirox™ and NM-212 compared with those of control and combusted Envirox™ only after 28 days. At 15 psu (Fig. 5-B), only organisms exposed to NM-212 exhibited significant higher accumulation of Ce compared with those of control after 7, 14, and 28 days of exposure.

Comparing both tested salinities, digestive Ce accumulation was greater in the organisms exposed to combusted

Envirox™ at 14 days and to Envirox™ at 21 and 28 days, under field salinity (1.5 psu) than under hyper-saline condition (15 psu).

Discussion

The aim of the present work was to evaluate the potential toxicity of CeO₂ NMs in *C. fluminea* exposed to different salinities (1.5 and 15 psu) by monitoring their impact at a molecular scale. In order to increase the environmental realism, a complex exposure (indoor mesocosm) was designed with pulse dosing by the addition of standardized (NM-212) or commercially available NM (Envirox™) undergoing or not an aging process in order to take into consideration different forms of NM during their life cycle.

Comparative gene expression between the gill and digestive gland

Our results showed a strong difference of gene expression between the gills and the digestive gland in the freshwater Asiatic clam. Several studies have documented differential expression of genes or differential levels of enzymatic activities between both organs in other freshwater and marine bivalve species (Doyen et al. 2006, 2008; Bigot et al. 2009, Cossu et al. 1997; Metian et al. 2008; Guo et al. 2017), relative to their physiological functions and their implication in stress

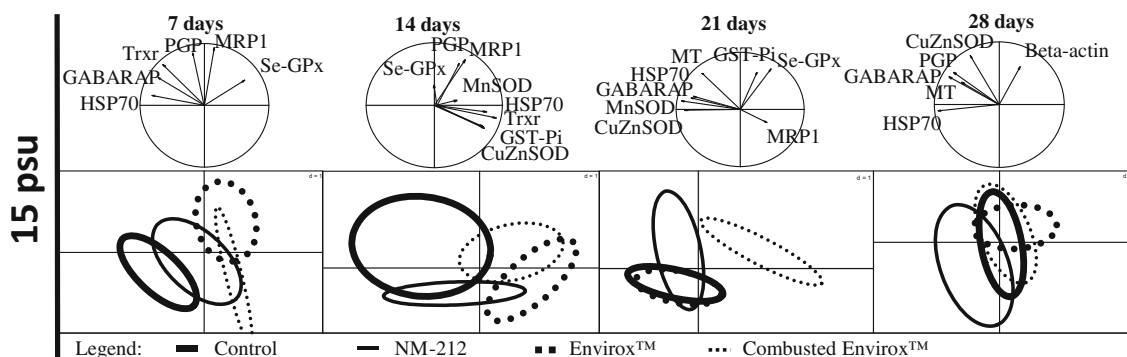


Fig. 5 PLS-DA performed with data collected on organisms exposed during 7, 14, 21, and 28 days to each conditions at 15 psu

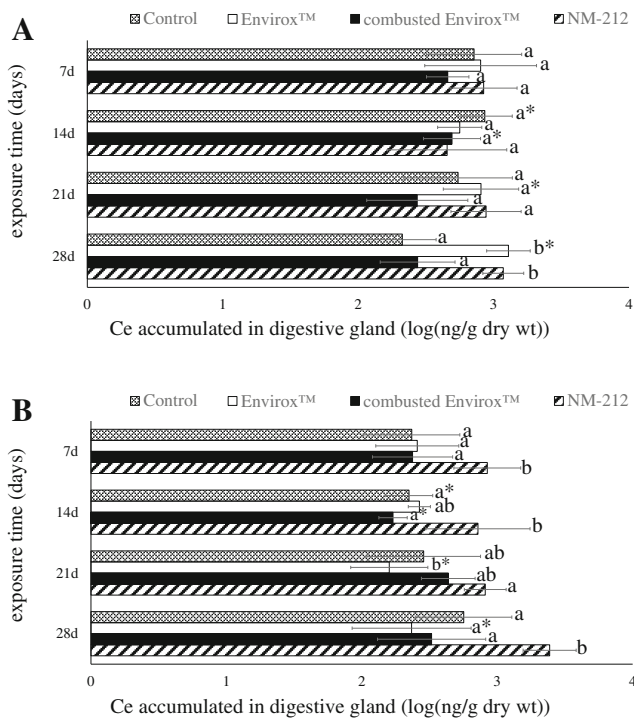


Fig. 6 Cerium bioaccumulation (log transformed (mean and standard deviation)) in the digestive glands of *C. fluminea* ($n = 6$) after 7, 14, 21, and 28 days of exposure in mesocosms to four experimental treatments (control, EnviroxTM, combusted EnviroxTM, NM-212) at 1.5 psu (a) and 15 psu (b). Significant differences between the exposure treatments were expressed with lowercase after exposure at 1.5 psu (a) and after exposure at 15 psu (b). Asterisk (*) indicated significant differences between salinities (1.5 psu (a) vs 15 psu (b)) for each exposure treatment

response. In our study, the gills presented enhanced mechanisms of direct action against xenobiotics through excretion pathways (MRP1, PGP) or by the role of chaperone protein (HSP70). As gills are in direct contact with surrounding media, they are vulnerable to particles and overexpress these kinds of early defenses. The digestive gland expressed higher content of MT, CAT, Se-GPx, and GST-Pi mRNAs that are involved in detoxification mechanisms through complexation or interactions with xenobiotics (e.g., metals, drugs) or oxidative components. As they are able to accumulate various contaminants including NMs (Canesi et al. 2012; Canesi and Corsi 2016), they are the main organ for detoxification and biotransformation, explaining the expression of such mechanisms of the stress response. The strong difference of expression between both organs remained after the application of NM contamination during 28 days. In our study, we selected the gills in order to monitor the temporal variations of gene expression throughout the exposure duration. As the gills are in direct contact with surrounding media, they may react first to environmental modifications. In the bivalve *Dreissena polymorpha*, Navarro et al. (2011) reported that the expression of genes involved in metal stress response was affected in gills earlier than in digestive gland.

Effect of salinity and NM in the gills throughout the exposure duration

Salinity appeared to be the main variable explaining the differences in gene expression in the gills. The MnSOD mRNA level was increased at high salinity and could be correlated to ROS generation (An and Choi 2010). The generation of H₂O₂ by MnSOD should have required detoxification mechanisms such as Se-GPx or CAT. However, Se-GPx mRNA decreased in hyper-saline condition while CAT mRNA level did not change. As MnSOD represents a small proportion of total SOD inside cells, its increasing expression may not be sufficient to require more CAT or Se-GPx, even though it indicates some mitochondrial perturbations.

Once the salinity effect has been set aside, we could reveal the effect of CeO₂ NMs that differed according to the type of NM. When *C. fluminea* were exposed to NMs at field salinity (1.5 psu; i.e., no salt stress), the overall gene expression in the gills was affected by NM-212 from 14 days until the end, and at each time point by both EnviroxTM products (except in combusted enviroxTM at 28 days). Even if it was not systematic, the three NMs gave different patterns of response. The main trend in all NM conditions was a decrease in the expression for most of the studied genes. Exposure to NM-212 and EnviroxTM induced the decrease of Se-GPx mRNA compared with the control at field salinity. Ciofani et al. (2014) also showed not only a downregulation of genes coding for some members of the GPx family but also a downregulation of other genes involved in cellular protection. They suggested that CeO₂ NM presented a potential role of ROS scavenger. Garaud et al. (2015, 2016) also supported this possibility in *Dreissena polymorpha* since CeO₂ NMs were already reported as having antioxidant properties such as SOD, CAT, peroxidase, and oxidase capacities (Singh 2016). On the contrary, CeO₂ NMs were also reported to damage DNA molecules (Koehl-Divo et al. 2018; Auffan et al. 2009) but sequences of genes involved in DNA damage response pathway are not available so far in *C. fluminea*, and therefore, their mRNA levels have not been evaluated here. However, this decrease of Se-GPx mRNA during the entire time of the experiment rather supports the antioxidant properties of CeO₂ NMs. For the combusted form, only a weak impact on Se-GPx gene expression has been noted, while a decrease of HSP70 mRNA content in most sampling dates was monitored. The inhibition of HSP70 synthesis was already observed after metal exposure and was correlated to inhibition of stress protein synthesis (Boutet et al. 2003; Luo et al. 2014). HSP70 downregulation was also shown after Ag NPs exposure and could be related to the induction of caspase-independent apoptosis (Gomes et al. 2013). The differences observed between both EnviroxTM products showed that transformations occurring during NM life cycle had significant impacts on *C. fluminea* gene expressions. The 850 °C combustion led to

modifications on NM physico-chemical properties (surrounding matrix, size, and form) that can considerably change their bioavailability and their potential effects on living organisms (Auffan et al. 2017). The measurements performed in the digestive gland of the exposed organisms suggest that the 850 °C combustion decreased the bioavailability of the contaminant since it was the only one that has not been bioaccumulated in this organ. The absence of bioaccumulation in the digestive gland does not preclude a contact of the contaminant with the gills, which may explain the observed effects. NM physico-chemical properties and biological effects monitored are difficult to link accurately in this study.

When *C. fluminea* were exposed to NMs at high salinity (15 psu; salt stress), we showed an overall absence of response compared with the control. Salinity may have strongly influenced and changed the behavior of NMs. In our study, it seems that the increase in salinity led to a removal of biological response, with gene expressions close to the control. NM interactions with high concentrations of salt (Cl^- ions; Devoille et al. 2018) may enhance their aggregation and sedimentation (Baker et al. 2014). The rapid sedimentation of NMs in our experimental unit may have reduced their filtration by *C. fluminea*. This may explain why the gills seem not to react in the present context of contamination: salinity may have limited NM bioaccessibility and bioavailability. Another explanation is that salinity may have stressed the bivalves as shown in Bertrand et al. (2017). The isolation of organisms from their surrounding environment was demonstrated as a response against salinity stress (Kholodkevich et al. 2009). Indeed, some bivalves are able to escape from stressful conditions by closing their shell valves (Ferreira-Rodríguez and Pardo 2016; Tran et al. 2003). Isolation of organisms might cause a drastic reduction of general metabolism (Carregosa et al. 2014) and might affect gene expression level by decreasing it due to its high energetic cost (Philipp et al. 2012). In the same way, in hyper-saline conditions, osmoregulation processes may have been more intensively required and the regulation of metabolic trade-offs may have led to the result that gene expression was disturbed and some pathways were depressed or shut down. This may explain why the usual defense mechanisms were not responding at high salinity in comparison with what we observed at field salinity.

Conclusion

This study has demonstrated significant impacts of CeO_2 NMs on *C. fluminea* gene expressions that were salinity dependent. The set of monitored genes was sufficient to clearly differentiate responses to NM contamination at field salinity. However, it did not reveal NM effects at hyper-saline exposure (15 psu). This could be due to the fate and behavior of both NM or/and organism physiology. Since they should

respond in priority to osmotic stress in order to conserve cellular functions, an adequate reaction against contamination should not have been implemented.

While few molecular studies have been performed using NMs (Wiesner and Bottero 2016), classical molecular observations of NM effects were linked to the over-expression of oxidative stress-related genes (Klaper et al. 2014). As CeO_2 NMs were reported to have both pro- and antioxidant roles, the decrease of gene expressions observed in our study could be linked both to harmful and beneficial effects. Nevertheless, the significant modifications of expression profiles by NMs remain worrisome especially since the organisms were exposed in complex media using a final concentration below the no observed effect concentration (NOEC) values of CeO_2 NMs determined in aquatic invertebrates (Hoecke et al. 2009). In addition, our results often showed significant differences between NM-212 and Envirox™ conditions, with more pronounced effects in the last one originating from a commercial form. This finding reinforces the need to focus on NMs as a part of daily-life products. In the same way, some significant differences were shown between pristine and aged Envirox™ products, highlighting the need to consider the entire life cycle of NMs. While previous nanotoxicology studies have allowed the understanding of many essential features of nanomaterials, there is always a great lack of information regarding their environmental fate and impact on organisms.

The integration of “omic” tools in aquatic ecotoxicology has been done primarily with species having their full genome sequenced, while as yet only a few bivalves have been sequenced despite their ecological relevance. Nonetheless, such an approach provides a valuable assessment of the molecular responses of organisms to emergent contaminant such as NMs (Châtel et al. 2018; Wiesner and Bottero 2016). In this study, we provided fundamental knowledge required to understand molecular mechanisms by comparing two key organs (the gills and the digestive gland) before assessing NM toxicity that might be useful to aid comprehension in AOP approaches. Furthermore, the level of mRNAs was actually impacted by NMs in each condition highlighted the usefulness of this approach in such a complex exposure design. The integrative vision of effects also showed the importance of weak expression modifications to reveal differences between NMs. By this study, we have contributed to deepening this knowledge, demonstrating the necessity to perform exposures closer to environmental scenarios (i.e., media complexity, low and cumulative NM concentrations).

Funding information Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) and CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR- 10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of

NanoTechnology. KOEHLE-DIVO Vanessa received financial support for salary from the French Research Ministry. Sharon Kruger is gratefully acknowledged for her English corrections.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- An MI, Choi CY (2010) Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 155: 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.09.008>
- Auffan M, Rose J, Orsiere T, De Meo M, Thill A, Zeyons O, Proux O, Masion A, Chaurand P, Spalla O, Botta A, Wiesner MR, Bottero J-Y (2009) CeO nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology* 3:161–171. <https://doi.org/10.1080/17435390902788086>
- Auffan M, Tella M, Liu W, Pariat A, Cabié M, Borschneck D, Angeletti B, Landrot G, Mouneyrac C, Giambérini L, Rose J (2017) Structural and physical–chemical behavior of a CeO₂ nanoparticle based diesel additive during combustion and environmental release. *Environ Sci: Nano* 4:1974–1980. <https://doi.org/10.1039/C7EN00494J>
- Baker TJ, Tyler CR, Galloway TS (2014) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut* 186:257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
- 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 *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ* 493:355–364. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.146>
- Banni M, Sforzini S, Balbi T, Corsi I, Viarengo A, Canesi L (2016) Combined effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: a transcriptomic and immunohistochemical study. *Environ Res* 145:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.003>
- Barmo C, Ciacci C, Canonico B, Fabbri R, Cortese K, Balbi T, Marcomini A, Pojana G, Gallo G, Canesi L (2013) In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 132:133:9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.014>
- Bertrand C, Zalouk-Vergnoux A, Giambérini L, Poirier L, Devin S, Labille J, Perrein-Ettajani H, Pagnout C, Châtel A, Levard C, Auffan M, Mouneyrac C (2016) The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*: Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam. *Environ Toxicol Chem* 35: 2550–2561. <https://doi.org/10.1002/etc.3428>
- Bertrand C, Devin S, Mouneyrac C, Giambérini L (2017) Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecol Indic* 74:334–342. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>
- Bigot A, Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2009) Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:382–387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.014>
- Bigot A, Minguez L, Giambérini L, Rodius F (2011) Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies. *Environ Toxicol* 26:623–632. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>
- Bottero J-Y, Auffan M, Borschneck D, Chaurand P, Labille J, Levard C, Masion A, Tella M, Rose J, Wiesner MR (2015) Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. *Compt Rendus Geosci* 347:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2014.10.004>
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8:76–85
- Calzolari L, Ansoorge W, Calabrese E, Denslow N, Part P, Lettieri T (2007) Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2:245–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.04.007>
- Canesi L, Corsi I (2016) Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Sci Total Environ* 565:933–940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.085>
- Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G (2012) Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar Environ Res* 76:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>
- Canesi L, Frenzilli G, Balbi T, Bernardeschi M, Ciacci C, Corsolini S, Della Torre C, Fabbri R, Faleri C, Focardi S, Guidi P, Kočan A, Marcomini A, Mariottini M, Nigro M, Pozo-Gallardo K, Rocco L, Scarcelli V, Smerilli A, Corsi I (2014) Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 153:53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.002>
- Carregosa V, Velez C, Soares AMVM, Figueira E, Freitas R (2014) Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 177–178(1–9):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
- Cerqueira CCC, Fernandes MN (2002) Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 52:83–91. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2164>
- Châtel A, Lièvre C, Barrick A, Bruneau M, Mouneyrac C (2018) Transcriptomic approach: a promising tool for rapid screening nanomaterial-mediated toxicity in the marine bivalve *Mytilus edulis*—application to copper oxide nanoparticles. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 205:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.01.003>
- Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF (2006) Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* 1:142–150
- Chen H, Zha J, Yuan L, Wang Z (2015) Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere* 119:856–862. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.062>
- Cheng G, Guo W, Han L, Chen E, Kong L, Wang L, Ai W, Song N, Li H, Chen H (2013) Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicol in Vitro* 27: 1082–1088. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.005>
- Ciofani G, Genchi GG, Mazzolai B, Mattoli V (2014) Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1840:495–506. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.009>

- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, 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
- D'Agata A, Fasulo S, Dallas LJ, Fisher AS, Maisano M, Readman JW, Jha AN (2014) Enhanced toxicity of 'bulk' titanium dioxide compared to 'fresh' and 'aged' nano-TiO₂ in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Nanotoxicology* 8:549–558. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.807446>
- Dale JG, Cox SS, Vance ME, Marr LC, Hochella MF (2017) Transformation of cerium oxide nanoparticles from a diesel fuel additive during combustion in a diesel engine. *Environ Sci Technol* 51:1973–1980. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03173>
- Das M, Patil S, Bhargava N, Kang J-F, Riedel LM, Seal S, Hickman JJ (2007) Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 28:1918–1925. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.036>
- Devoille L, Revel M, Batana C, Felten N, Giambérini L, Châtel A, Mouneyrac C (2018) Combined influence of oxygenation and salinity on aggregation kinetics of the silver reference nanomaterial NM-300K. *Environ Toxicol Chem* 37:1918–1925. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.036>
- Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2006) Identification, sequencing and expression of selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* 144:122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.07.002>
- Doyen P, Bigot A, Vasseur P, Rodius F (2008) Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* 147:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.002>
- Eom H-J, Choi J (2009) Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol Lett* 187:77–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.01.028>
- Ferreira-Rodríguez N, Pardo I (2016) An experimental approach to assess *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) resistance to osmotic stress in estuarine habitats. *Estuar Coast Shelf Sci* 176:110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.017>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>
- Garaud M, Auffan M, Devin S, Felten V, Pagnout C, Pain-Devin S, Proux O, Rodius F, Sohm B, Giamberini L (2016) Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10:935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ (2013) Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquat Toxicol* 136–137:79–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.021>
- Guan X, Shi W, Zha S, Rong J, Su W, Liu G (2018) Neurotoxic impact of acute TiO₂ nanoparticle exposure on a benthic marine bivalve mollusk, *Tegillarca granosa*. *Aquat Toxicol* 200:241–246. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.05.011>
- Guo R, Pan L, Ji R (2017) A multi-biomarker approach in scallop *Chlamys farreri* to assess the impact of contaminants in Qingdao coastal area of China. *Ecotoxicol Environ Saf* 142:399–409. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.043>
- Hoecke KV, Quik JT, Mankiewicz-Boczek J, Schamphelaere KAD, Elsaesser A, der Meeren PV, Barnes C, McKerr G, Howard CV, Meent DVD (2009) Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environ Sci Technol* 43:4537–4546
- Hussain S, Garantziotis S (2013) Interplay between apoptotic and autophagy pathways after exposure to cerium dioxide nanoparticles in human monocytes. *Autophagy* 9:101–103. <https://doi.org/10.4161/auto.22266>
- Keller AA, Wang H, Zhou D, Lenihan HS, Cherr G, Cardinale BJ, Miller R, Ji Z (2010) Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ Sci Technol* 44:1962–1967
- Kholodkevich SV, Kuznetsova TV, Trusevich VV, Kurakin AS, Ivanov AV (2009) Peculiarities of valve movement and of cardiac activity of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* at various stress actions. *J Evol Biochem Physiol* 45:524–526. <https://doi.org/10.1134/S0022093009040100>
- Klaper R, Arndt D, Bozich J, Dominguez G (2014) Molecular interactions of nanomaterials and organisms: defining biomarkers for toxicity and high-throughput screening using traditional and next-generation sequencing approaches. *Analyst* 139:882–895. <https://doi.org/10.1039/C3AN01644G>
- Koehlé-Divo V, Cossu-Leguille C, Pain-Devin S, Simonin C, Bertrand C, Sohm B, Mouneyrac C, Devin S, Giambérini L (2018) Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquat Toxicol* 198:141–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>
- Li J, Schiavo S, Xiangli D, Rametta G, Miglietta ML, Oliviero M, Changwen W, Manzo S (2018) Early ecotoxic effects of ZnO nanoparticle chronic exposure in *Mytilus galloprovincialis* revealed by transcription of apoptosis and antioxidant-related genes. *Ecotoxicology* 27:369–384. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1901-0>
- Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y (2006) Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol* 25:451–457. <https://doi.org/10.1080/10915810600959543>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo L, Ke C, Guo X, Shi B, Huang M (2014) Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol* 38:318–329. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.029>
- Metian M, Warnau M, Cosson RP, Oberhänsli F, Bustamante P (2008) Bioaccumulation and detoxification processes of Hg in the king scallop *Pecten maximus*: field and laboratory investigations. *Aquat Toxicol* 90:204–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.014>
- Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Kawaguchi K, Sasaki T (2015) Pulmonary toxicity of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. *J Nanopart Res* 17:442. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3249-1>
- Navarro A, Faria M, Barata C, Piña B (2011) Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut* 159:100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- Niu J, Azfer A, Rogers L, Wang X, Kolattukudy P (2007) Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 73:549–559
- OECD (2010) List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. In, p 27
- Park B, Martin P, Harris C, Guest R, Whittingham A, Jenkinson P, Handley J (2007) Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of Envirox™ – a

- nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. Part Fibre Toxicol 4:12. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-12>
- Park E-J, Choi J, Park Y-K, Park K (2008) Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicology 245:90–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.869>
- Philipp EER, Wessels W, Gruber H, Strahl J, Wagner AE, Ernst IMA, Rimbach G, Kraemer L, Schreiber S, Abele D, Rosenstiel P (2012) Gene expression and physiological changes of different populations of the long-lived bivalve *Arctica islandica* under low oxygen conditions. PLoS One 7:e44621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044621>
- Piña B, Casado M, Quirós L (2007) Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. TrAC Trends Anal Chem 26:1145–1154. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.009>
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>
- Renault S, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Momet S, Brisson A (2008) Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). Gold Bull 41:116–126. <https://doi.org/10.1007/BF03216589>
- Ringwood AH, McCarthy M, Bates TC, Carroll DL (2010) The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. Mar Environ Res 69:S49–S51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.011>
- Rocha TL, Gomes T, Sousa VS, Mestre NC, Bebianno MJ (2015) Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. Mar Environ Res 111:74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>
- Ruiz P, Katsumiti A, Nieto JA, Bori J, Jimeno-Romero A, Reip P, Arostegui I, Orbea A, Cajaraville MP (2015) Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Mar Environ Res 111:107–120. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.018>
- Shi W, Han Y, Guo C, Zhao X, Liu S, Su W, Zha S, Wang Y, Liu G (2017) Immunotoxicity of nanoparticle nTiO₂ to a commercial marine bivalve species, *Tegillarca granosa*. Fish Shellfish Immunol 66:300–306. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.036>
- Singh S (2016) Cerium oxide based nanozymes: redox phenomenon at biointerfaces. Biointerphases 11:04B202. <https://doi.org/10.1116/1.4966535>
- Singh C, Institute for Health and Consumer Protection (2014) Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, characterisation and test item preparation JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Publications Office of the European Union, Luxembourg
- Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabau J-C (2003) Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. Aquat Toxicol 65:317–327. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00156-5)
- Volland M, Hampel M, Martos-Sitcha JA, Trombini C, Martínez-Rodríguez G, Blasco J (2015) Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: uptake, elimination and oxidative stress response. Environ Sci Pollut Res Int 22:17414–17424. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4718-x>
- Volland M, Hampel M, Katsumiti A, Yeste MP, Gatica JM, Cajaraville M, Blasco J (2018) Synthesis methods influence characteristics, behaviour and toxicity of bare CuO NPs compared to bulk CuO and ionic Cu after in vitro exposure of *Ruditapes philippinarum* hemocytes. Aquat Toxicol 199:285–295
- Wang Y, Nowack B (2018a) Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots in seven European regions. Environ Pollut 235:589–601. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.004>
- Wang Y, Nowack B (2018b) Environmental risk assessment of engineered nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots: environmental risk assessment of engineered nanomaterials. Environ Toxicol Chem 37:1387–1395. <https://doi.org/10.1002/etc.4080>
- Wiesner MR, Bottero J-Y (2016) Environmental nanotechnology: applications and impacts of nanomaterials, 2nd edn. McGraw Hill, New York, p 141–172
- Zhang H, He X, Zhang Z, Zhang P, Li Y, Ma Y, Kuang Y, Zhao Y, Chai Z (2011) Nano-CeO₂ exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations. Environ Sci Technol 45:3725–3730. <https://doi.org/10.1021/es103309n>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary data

***Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity**

Vanessa Koehlé-Divo^{1*}, Sandrine Pain-Devin¹, Carole Bertrand^{1,2}, Simon Devin¹, Catherine Mouneyrac², Laure Giamb rini¹ and Bénédicte Sohm¹.

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

² Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

Gene Name	Accession Number (GenBank)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon length (bp)	Concentration used for qPCR (nM)	GO biological process	Reference
Beta Actine	EF446608.1	CCTTTACCACAACAGCCGA	AGCATAGCCTCAGGGCA	191	300	Cell morphogenesis - mitotic cytokinesis - ...	Arini et col. 2014
Catalase	EF446609	CCTTCAGTGCCTAGTCTGG	CCTGTTCTCTGACCGTGG	196	200	Response to oxidative stress	Arini et col. 2014
Cu-Zn Superoxide dismutase	KF218347.1	GAATGTTGTGGCTGATGAGG	GGATCGTTCTCCTGTCAATG	76	250	Response to oxidative stress	Unpublished probes
<i>GABARAP</i>	KF218343	AAAGCCCGTGTAGGAGACTTG	AAGAGATCCCATAGTCGCACT	150	250	Autophagosome assembly	Chen et col. 2013
Se-GPx	EF547366.1	TATGCCCTGTTCCCGTGTTTC	CTGCCATCTGGACCAATCAG	148	200	Response to oxidative stress	Chen et col. 2015
GST-Pi	AN AY885667.1	CTGGGCGACCGAATACAAATC	GATGGCATTGGACTGGGCTA	90	250	Response to reactive oxygen species	Chen et col. 2015
HSP70	KC979064	CGCCGACGCTGATTACCTTA	AAACGGTTGATAGGACGCAAG	84	200	Cellular response to stress, heat, protein refolding...	Chen et col. 2013
Metallothionein (isoform 1)	EF185126	CGGCTATCTCCCGCGA	AGCTTTTACCAGAACCAACAGT	210	200	Cellular metal ion homeostasis, cellular response to oxidative stress	Arini et col. 2014
Mn Superoxide dismutase	EF446611	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC	GGATCATTTGACGAGATGAAGGC	200	200	Response to oxidative stress	Arini et col. 2014
MRP1	KJ027659	GTGGTCGGGTCTGTTGGTA	AGGGTGGCGTTCTGTATCC	139	200	Drug transmembrane transport, xenobiotic transport	Chen et col. 2015
PGP / MDR	KJ001772	ATCCTGGTTGATGGCACTGA	AGGTTCTGGCTACAATACC	80	200	Xenobiotic transport	Chen et col. 2015
Ribosomal protein S3	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AAACGGTTGATAGGACGCAAG	154	250	Translation (Used as housekeeping gene)	Navarro et col., 2001
Thioredoxin reductase	KF275126	AATGCGGTGGCTTCCTACA	TCTGCTGGTCAAATCCTCGC	89	200	Cell redox homeostasis	Chen et col. 2015

Table S1: Primer sequences used. Cited references: Navarro A, Faria M, Barata C, Piña B. 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut.* 159, 100-7. ; Arini A, Daffe G, Gonzalez P, Feurtet-Mazel A, Baudrimont M. 2014. Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. *Environ Pollut.* 192, 74-82. ; Chen H, Zha J, Liang X, Bu J, Wang M, Wang Z. 2013. Sequencing and de novo assembly of the Asian clam (*Corbicula fluminea*) transcriptome using the Illumina GAllx method. *PLoS One.* 2013 8:e79516. ; Chen H, Zha J, Yuan L, Wang Z. 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere.* 119, 856-62.

Pairwise comparison		Gills				Digestive gland			
		Control	NM-212	Envirox™	Combusted Envirox™	Control	NM-212	Envirox™	Combusted Envirox™
Gills	Control NM-212	0.62							
	Envirox™	0.17	0.17						
	Combusted Envirox™	0.36	0.24	0.70					
Digestive gland	Control NM-212	< 0.05	NT	NT	NT				
	Envirox™	NT	< 0.05	NT	NT	0.62			
	Combusted Envirox™	NT	NT	< 0.05	NT	0.36	0.52		
		NT	NT	NT	< 0.05	0.70	0.91	0.36	

Table S2: Pairwise comparison (Hotelling T² test) made on PLS-DA performed with whole data collected in organisms exposed 28 days to each contamination conditions in two organs (gills and digestive gland). Bold letters represent significant differences between groups. Non-tested conditions are shown as “NT”.

Day	Salinity	Condition	Beta-actin	Catalase	MRP1	MT	PGP	GST-Pi	GABARAP	CuZnSOD
7 days	1,5 PSU	Control	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.7 NS	0.0 ± 0.3 ab	0.0 ± 0.5 NS	0.0 ± 0.7 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.5 NS	0.0 ± 0.4 a
		NM-212	-0.5 ± 0.4 NS	-0.4 ± 0.6 NS	0.2 ± 0.5 ab	-0.4 ± 0.5 NS	-0.2 ± 0.3 NS	-0.1 ± 0.4 NS	-0.1 ± 0.5 NS	0.2 ± 0.4 ab
		Envirox™	-0.4 ± 0.3 NS	-1.1 ± 0.5 NS	-0.5 ± 0.4 a	0.0 ± 0.3 NS	-0.7 ± 0.4 NS	-0.2 ± 0.3 NS	-0.7 ± 0.4 NS	-0.1 ± 0.3 a
		Combusted Envirox™	-0.6 ± 0.3 NS	-1.1 ± 0.6 NS	-0.1 ± 0.3 ab	0.3 ± 0.5 NS	-0.3 ± 0.3 NS	-0.5 ± 0.3 NS	-0.8 ± 0.2 NS	-0.2 ± 0.3 a
	15 PSU	Control	-1.0 ± 0.9 NS	-0.3 ± 0.5 NS	-0.4 ± 0.6 a	-0.1 ± 0.6 NS	-0.1 ± 0.6 NS	0.1 ± 0.5 NS	0.3 ± 0.7 NS	0.8 ± 0.6 b
		NM-212	-1.0 ± 0.8 NS	-0.4 ± 0.6 NS	-0.3 ± 0.4 ab	0.5 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 NS	-0.1 ± 0.4 NS	-0.5 ± 0.5 NS	0.4 ± 0.4 ab
		Envirox™	-0.6 ± 0.2 NS	-0.4 ± 0.5 NS	0.4 ± 0.3 b	0.2 ± 0.6 NS	0.2 ± 0.4 NS	-0.3 ± 0.2 NS	-0.3 ± 0.4 NS	0.4 ± 0.2 ab
		Combusted Envirox™	-0.5 ± 0.4 NS	-0.7 ± 0.7 NS	-0.3 ± 0.3 ab	-0.1 ± 0.4 NS	-0.6 ± 0.6 NS	-0.1 ± 0.3 NS	-0.6 ± 0.4 NS	0.4 ± 0.2 ab
14 days	1,5 PSU	Control	0.00 ± 0.33 NS	0.00 ± 0.39 NS	0.00 ± 0.45 NS	0.00 ± 0.34 a	0.00 ± 0.64 NS	0.00 ± 0.28 bc	0.00 ± 0.29 NS	0.00 ± 0.32 NS
		NM-212	-0.23 ± 0.33 NS	-0.57 ± 0.43 NS	-0.46 ± 0.45 NS	0.45 ± 0.33 ab	-0.44 ± 0.44 NS	-0.16 ± 0.31 ab	0.39 ± 0.40 NS	-0.18 ± 0.43 NS
		Envirox™	0.27 ± 0.48 NS	0.29 ± 0.51 NS	-0.23 ± 0.45 NS	1.05 ± 0.40 b	-0.22 ± 0.47 NS	0.55 ± 0.42 c	0.49 ± 0.61 NS	0.05 ± 0.48 NS
		Combusted Envirox™	0.16 ± 0.42 NS	0.13 ± 0.50 NS	-0.21 ± 0.54 NS	0.82 ± 0.47 b	-0.47 ± 0.47 NS	0.20 ± 0.32 bc	0.38 ± 0.43 NS	-0.12 ± 0.41 NS
	15 PSU	Control	-0.26 ± 0.67 NS	0.11 ± 0.65 NS	-0.12 ± 0.50 NS	0.60 ± 0.56 ab	0.01 ± 0.51 NS	-0.61 ± 0.64 a	0.25 ± 0.57 NS	0.12 ± 0.64 NS
		NM-212	-0.02 ± 0.28 NS	0.05 ± 0.50 NS	-0.47 ± 0.36 NS	0.45 ± 0.49 ab	-0.17 ± 0.58 NS	-0.30 ± 0.41 ab	0.50 ± 0.67 NS	0.30 ± 0.37 NS
		Envirox™	0.11 ± 0.35 NS	0.50 ± 0.31 NS	0.04 ± 0.35 NS	0.73 ± 0.30 b	0.07 ± 0.42 NS	0.18 ± 0.20 bc	0.74 ± 0.45 NS	0.48 ± 0.14 NS
		Combusted Envirox™	0.28 ± 0.27 NS	0.17 ± 0.26 NS	0.23 ± 0.52 NS	0.64 ± 0.36 ab	0.33 ± 0.42 NS	-0.22 ± 0.34 ab	0.62 ± 0.29 NS	0.43 ± 0.34 NS

Table S3: Relative gene expression (expressed in log 2) of 8 genes (Beta-actin, catalase, MRP1, MT, PGP, GST-Pi, GABARAP & CuZnSOD) after mRNA extraction from gills of *C. fluminea* exposed in mesocosm during 7 and 14 days. Control 1.5 psu was chosen as reference for relative expression. Groups that do not share the same letter are significantly different. NS stands for no significant differences.

Day	Salinity	Condition	Beta-actin	Catalase	MRP1	MT	PGP	GST-Pi	GABARAP	CuZnSOD
21 days	1,5 PSU	Control	0.0 ± 0.3 NS	0.0 ± 0.2 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.3 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.3 NS	0.0 ± 0.3 *	0.0 ± 0.23 NS
		NM-212	-0.7 ± 0.8 NS	-0.7 ± 0.5 NS	-0.2 ± 0.3 NS	0.3 ± 0.2 NS	-0.3 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.3 *	-0.2 ± 0.21 NS
		Envirox™	-0.1 ± 0.4 NS	-0.3 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.6 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.6 NS	0.2 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 *	0.1 ± 0.23 NS
		Combusted Envirox™	-0.1 ± 0.4 NS	0.2 ± 0.4 NS	-0.6 ± 0.3 NS	0.3 ± 0.2 NS	-0.1 ± 0.2 NS	-0.3 ± 0.3 NS	-0.1 ± 0.4 *	0.1 ± 0.23 NS
	15 PSU	Control	-0.5 ± 0.4 NS	-0.3 ± 0.3 NS	-0.3 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.2 NS	-0.4 ± 0.4 NS	-0.2 ± 0.3 NS	-0.4 ± 0.3 ab	0.3 ± 0.20 NS
		NM-212	-0.3 ± 0.4 NS	-0.4 ± 0.4 NS	-0.9 ± 0.4 NS	0.5 ± 0.6 NS	-0.8 ± 0.5 NS	-0.1 ± 0.3 NS	-0.2 ± 0.4 ab	0.2 ± 0.19 NS
		Envirox™	-0.6 ± 0.5 NS	-0.6 ± 0.3 NS	-0.8 ± 0.4 NS	0.2 ± 0.3 NS	-0.6 ± 0.4 NS	-0.3 ± 0.4 NS	-0.3 ± 0.5 ab	0.2 ± 0.42 NS
		Combusted Envirox™	-0.4 ± 0.7 NS	-0.6 ± 0.4 NS	-0.4 ± 0.6 NS	-0.2 ± 0.4 NS	-0.4 ± 0.5 NS	0.2 ± 0.4 NS	-1.0 ± 0.4 b	-0.3 ± 0.33 NS
28 days	1,5 PSU	Control	0.0 ± 0.6 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.4 NS	0.0 ± 0.5 NS	0.0 ± 0.2 NS	0.0 ± 0.2 NS	0.0 ± 0.5 NS
		NM-212	0.1 ± 0.6 NS	0.8 ± 0.5 NS	-0.2 ± 0.4 NS	0.4 ± 0.4 NS	0.7 ± 0.6 NS	0.6 ± 0.4 NS	-0.1 ± 0.5 NS	0.5 ± 0.4 NS
		Envirox™	-0.8 ± 0.6 NS	-0.6 ± 0.5 NS	-0.5 ± 0.7 NS	-0.3 ± 0.7 NS	0.1 ± 0.5 NS	-0.4 ± 0.5 NS	-0.5 ± 0.5 NS	-0.3 ± 0.5 NS
		Combusted Envirox™	-0.7 ± 0.6 NS	-0.7 ± 0.6 NS	-0.4 ± 0.5 NS	-0.9 ± 0.6 NS	-0.4 ± 0.6 NS	-0.3 ± 0.5 NS	-0.7 ± 0.5 NS	-0.1 ± 0.5 NS
	15 PSU	Control	-0.4 ± 0.6 NS	0.3 ± 0.7 NS	0.1 ± 0.6 NS	-0.3 ± 0.6 NS	0.3 ± 0.5 NS	0.0 ± 0.5 NS	0.3 ± 0.5 NS	0.6 ± 0.5 NS
		NM-212	-1.1 ± 1.2 NS	0.4 ± 0.6 NS	0.1 ± 0.6 NS	0.5 ± 0.8 NS	0.7 ± 0.7 NS	0.0 ± 0.5 NS	0.3 ± 0.5 NS	0.5 ± 0.5 NS
		Envirox™	-0.3 ± 0.3 NS	0.4 ± 0.8 NS	0.2 ± 0.5 NS	0.2 ± 0.5 NS	0.3 ± 0.4 NS	-0.1 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.4 NS	0.6 ± 0.3 NS
		Combusted Envirox™	-0.4 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.4 NS	-0.2 ± 0.6 NS	0.7 ± 0.5 NS	0.4 ± 0.7 NS	0.1 ± 0.4 NS	0.1 ± 0.4 NS	0.8 ± 0.4 NS

Table S4: Relative gene expression (expressed in log 2) of 8 genes (Beta-actin, catalase, MRP1, MT, PGP, GST-Pi, GABARAP & CuZnSOD) after mRNA extraction from gills of *C. fluminea* exposed in mesocosm during 21 and 28 days. Control 1.5 psu was chosen as reference for relative expression. Groups that do not share the same letter are significantly different. NS stands for no significant differences.

Day 7		1.5 psu			15 psu		
		Control	Envirox™	Combusted Envirox™	Control	Envirox™	Combusted Envirox™
1.5 psu	Envirox™	< 0.05					
	Combusted Envirox™	< 0.05	< 0.05				
	NM-212	0.11	< 0.05	< 0.05			
15 psu	Envirox™				< 0.05		
	Combusted Envirox™				0.06	0.31	
	NM-212				0.17	0.06	0.31
Day 14		1.5 psu			15 psu		
		Control	Envirox™	Combusted Envirox™	Control	Envirox™	Combusted Envirox™
1.5 psu	Envirox™	< 0.05					
	Combusted Envirox™	< 0.05	< 0.05				
	NM-212	< 0.05	< 0.05	< 0.05			
15 psu	Envirox™				< 0.05		
	Combusted Envirox™				0.05	0.06	
	NM-212				0.06	0.06	< 0.05
Day 21		1.5 psu			15 psu		
		Control	Envirox™	Combusted Envirox™	Control	Envirox™	Combusted Envirox™
1.5 psu	Envirox™	< 0.05					
	Combusted Envirox™	< 0.05	< 0.05				
	NM-212	< 0.05	0.15	< 0.05			
15 psu	Envirox™				0.92		
	Combusted Envirox™				< 0.05	< 0.05	
	NM-212				0.26	0.26	< 0.05
Day 28		1.5 psu			15 psu		
		Control	Envirox™	Combusted Envirox™	Control	Envirox™	Combusted Envirox™
1.5 psu	Envirox™	< 0.05					
	Combusted Envirox™	0.22	0.11				
	NM-212	< 0.05	0.11	< 0.05			
15 psu	Envirox™				0.57		
	Combusted Envirox™				0.80	0.80	
	NM-212				0.22	0.21	0.22

Table S5: Pairwise comparisons (Hotelling T² test) made on PLS-DA performed at 7, 14, 21 and 28 days of exposure to each contamination. Data were treated time per time and salinity was treated separately for each time step. Bold letters represent significant differences between groups.

Points-clés

- Des différences d'expression de gènes importantes permettent de départager les réponses entre les différents organes. Les branchies expriment davantage les gènes sollicités dans l'excrétion cellulaire tandis que les expressions impliquées dans la détoxification sont plus exprimées dans la glande digestive.
- La salinité impacte l'expression de certains gènes impliqués dans les défenses antioxydantes (MnSOD, Se-GPx).
- Les nanomatériaux de dioxyde de cérium, quelle que soit leur forme (NM-212, Envirox™, Combusted Envirox™), entraînent une diminution des réponses moléculaires et principalement des expressions de Se-GPx, TR et HSP70, ce qui peut témoigner à la fois d'un effet néfaste (dommages) ou bénéfique (propriétés antioxydantes).
- L'effet croisé de la salinité et de la contamination aux NM indique que les organismes répondent en premier lieu à la salinité, ce qui peut être relié à la physiologie de l'organisme qui doit faire face à un stress osmotique important. Les effets des NM ont été par conséquent moins marqués à forte salinité (15 psu).
- L'approche moléculaire s'est révélée particulièrement sensible pour détecter les effets des différents facteurs de stress (salinité, NM). L'intégration des variations observées pour la totalité des gènes à travers l'approche statistique intégrée a montré l'importance de faibles variations dans la discrimination des groupes.
- Le processus de combustion réalisé sur le produit Envirox™ pour mimer son passage dans le moteur lors de son utilisation a conduit à des modifications physico-chimiques des NM (taille, composition de surface) qui ont induit des réponses moléculaires distinctes chez les organismes exposés. Ces résultats mettent en évidence la nécessité de déterminer le risque des NM sous les différentes formes pouvant être rencontrées le long de leur cycle de vie.
- Compte tenu de la sensibilité de l'approche moléculaire, il pourrait être particulièrement pertinent de l'utiliser pour des expériences futures et de la coupler à d'autres niveaux d'organisation biologique afin d'avoir une vision plus large des effets.

Chapitre IV :

Evaluation du devenir et des effets des CuO NM

Ce chapitre est consacré à l'étude du devenir et des effets des nanomatériaux d'oxyde de cuivre (CuO NM) chez des bivalves endobenthiques vivant dans les eaux douces (*C. fluminea*) ou en eau de mer (*S. plana*). Il est présenté en deux parties correspondant à deux publications scientifiques.

Etant donné l'utilisation massive des CuO NM, notamment dans des produits à usage externe tels que les pesticides agricoles et les peintures, leur rejet dans l'environnement est inévitable. Bien que le cuivre soit un élément essentiel à la survie des organismes, c'est aussi un biocide qui peut être relativement toxique. La forme nanoparticulaire peut mener à des effets différents de la forme dissoute, qu'il est important de déterminer pour permettre une évaluation du risque convenable. Le rejet et les transformations des CuO NM sont alors à étudier plus amplement puisqu'ils devraient également impacter les organismes non-ciblés par les formulations et mettre en danger l'écosystème.

Dans la première partie de ce chapitre, les effets de différentes concentrations de CuO NM (0, 20 et 100 µg/L) ont été déterminés à travers l'exposition de *C. fluminea* en microcosmes pendant 96 heures. Etant donné que les paramètres physico-chimiques des NM sont directement reliés à leur comportement, l'évaluation des effets des NM présentant des propriétés physico-chimiques distinctes est indispensable à l'évaluation de leur risque. C'est pourquoi, l'étude a porté sur des NM de différentes tailles (12 et 30 nm). De plus, les travaux précédents ont mis évidence la sensibilité des outils moléculaires et l'utilité des approches multi-biomarqueurs au niveau cellulaire et moléculaire pour l'évaluation du risque de ces substances. C'est pourquoi ces différentes techniques ont été à nouveau employées, et complétées par l'ajout d'une approche physiologique via la mesure du taux de filtration des organismes. Des approches statistiques multivariées ont été utilisées pour le traitement des données moléculaires et cellulaires afin de mettre en évidence les effets globaux d'une telle contamination. L'article présenté dans cette partie est actuellement soumis à Environmental Pollution.

Dans la seconde partie de ce chapitre, le devenir et les effets des CuO NM ont été déterminés sur des temps plus longs (28 jours), dans des conditions plus proches de l'environnement (mésocosmes) et en exposant des bivalves d'eau douce (*C. fluminea*) et d'eau marine (*S. plana*). Cette approche a permis d'évaluer le devenir et les effets des CuO NM à des salinités

différentes. Le devenir et les effets des NM sont également importants à évaluer à différentes étapes de leur cycle de vie puisque leur incorporation dans les produits modifie leurs interactions avec l'environnement. Ces modifications peuvent alors mener à des effets différents de leur forme d'origine qu'il est impératif de déterminer pour une évaluation du risque complète. Dans cette étude, les CuO NM ont été étudiés sous leur forme libre (CuO-NOAA) et suite à leur incorporation dans une peinture acrylique les contenant (CuO_Acrl_FP). L'évaluation des réponses des organismes non exposés (Contrôles) a permis de définir les impacts de l'exposition tandis que l'ajout d'une condition comprenant cette peinture sans CuO NM (Acrl_FP) a permis de déterminer la part des effets propres aux NM. Le protocole expérimental consistait en une exposition en mésocosmes *via* des pulses de contamination à raison de 4.2 µg CuO/L et 12.5 µg CuO/L par pulse pour l'exposition en eau douce et en eau marine respectivement. Les effets de ces différentes contaminations ont été déterminés sur plusieurs niveaux d'organisation biologique via l'évaluation de réponses au niveau individuel et cellulaire chez les deux espèces. Une approche moléculaire a été également conduite sur *C. fluminea*. L'article présenté dans cette partie sera également présenté sous forme de publications scientifique au cours de l'année 2019.

Partie 1:

**A multilevel approach for an integrative assessment of CuO NP
effects on *Corbicula fluminea***

A multilevel approach for an integrative assessment of CuO NP effects on *Corbicula fluminea*.

KOEHLÉ-DIVO Vanessa¹, SOHM Bénédicte¹, GIAMBERINI Laure¹, PAULY Danièle¹, FLAYAC Justine¹, DEVIN Simon¹, AUFFAN Mélanie², MOUNEYRAC Catherine³ and PAIN-DEVIN Sandrine¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

² CEREGE, Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, Collège de France, INRA, Aix-en-Provence, France

³ Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are widely used for their biocide action and are then released in the aquatic compartment where they will likely reach the sediment. Therefore, their impact in intra-sedimentary organisms such as the freshwater endobenthic bivalve *Corbicula fluminea* needs to be assessed. In bivalves, adverse effects of CuO NP have been reported mainly via biochemical and physiological traits. Molecular studies are still in progress but appear to be very sensitive in early effect evaluation. Thus, monitoring NP effects at different biological scales may provide valuable and integrated information for risk assessment. This study aimed to assess CuO NP effects at molecular, biochemical and physiological scales after the exposure of *C. fluminea* to two CuO NPs of different size (12 nm and 30 nm) at three concentrations (0, 20 and 100 µg/L) for 96 hours. The expression of antioxidant (CuZnSOD, MnSOD, Cat, Se-GPx, Trxr) and antitoxic (GST-Pi, HSP70, MT, Pgp, MRP1) related genes was measured at the mRNA level while antioxidant (SOD, TAC) and antitoxic (GST, ACP) defenses, energetic reserves and metabolism (ETS, Tri, LDH), and cellular damages (LPO) were assessed at the biochemical scale at 0, 24 and 96 hours. The molecular and biochemical data were treated by multivariate analyses. The filtration rate was also evaluated at 96 hours in order to provide information on the physiological scale. Gene expression and filtration rate were responsive to CuO NPs contamination but differed according to the NP treatment. The results suggest that defense mechanisms may have been set up following 30nm-NP exposure. The response to 12nm-NP was lower but still showed that exposure to 12nm-NP led to activation of the cellular elimination mechanism. The lowering of the filtration rate may have protected the organisms from the contamination but this decrease should lead to further repercussions on organism biology. These results showed (i) that CuO NP may exert effects at different levels even after a short-term exposure and (ii) pointed out the precocity of molecular response.

Keywords: Copper oxide nanoparticles (CuO NP), bivalve, gene expression, biochemical effects, filtration

1. Introduction

Technological advances allow synthesis and incorporation of nanoparticles (NPs) in numerous daily commercial products. Their tiny size considerably enhances their specific surface area and confers new properties (surface reactivity, optic, catalytic, etc). Metal and metal oxide NPs are among the most manufactured NPs employed in a wide range of applications (Vance et al., 2015). Among them, copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are used in various applications such as antimicrobial agents, agricultural biocides, catalysts or gas sensors (Hou et al., 2017, Chibber and Shanker, 2017, Keller et al., 2017). Their increasing use leads inevitably to their release in the aquatic environment while their quantification and characterization in such complex matrices are not yet fully developed. Although the predictive environmental concentration (PEC) values for CuO NPs are currently estimated to be less than few $\mu\text{g/L}$ (Keller and Lazareva, 2014), their production continues to increase from 580 tons produced in 2014 *versus* 1600 tons estimated for 2025 (Hou et al., 2017).

In the framework of nanotoxicology, the assessment of NP toxicity according to their physico-chemical properties remains a work in progress. Moreover, their biocide abilities raise the question of their (eco)toxicity towards non-target organisms (Keller et al., 2017). In aquatic environments, Cu NPs would be accumulated in the sediments of freshwater and marine environments (Keller et al., 2017). Benthic species should be of particular concern because of their close contact with contaminants and their burrowing activities leading to a potential remobilization of contaminants (Roberts, 2012). The widespread endobenthic freshwater bivalve *Corbicula fluminea* is a good model for such assessments due to its ability to be both filter- and pelagic-feeder, but also due to its ability to strongly bioaccumulate a large amount of contaminants, such as metals (Inza et al., 1997; Shoults-Wilson et al., 2010; Marescaux et al., 2016; Hakenkamp et al., 2001). As estimated by Garner et al. (2017) for freshwater ecosystems, CuO NPs may accumulate in the aquatic environment over the long term in sufficient concentration to cause potential toxicity. To the best of our knowledge, there is only one publication assessing CuO NP (20-30 nm, uncoated) effects on a freshwater bivalve. This study was conducted on the endobenthic species *Anodonta cygnea* exposed to 0.25, 2.5 and 25 $\mu\text{g Cu/L}$ over 12 days and showed histopathological alterations, significant bioaccumulation in the gills, and deleterious impacts in the filtration rate (Moëzzi et al., 2018). However, in freshwater bivalves the assessment of CuO NP effects in the lowest levels of biological organization are still lacking, such as in molecular and biochemical responses.

The main toxic mechanism reported in nanotoxicology studies is the generation of reactive oxygen species (ROS) that can induce oxidative stress, resulting in further cyto- and genotoxicity (Klaper et al., 2014, Vale et al., 2016). A first line against reactive oxygen species (ROS) damages is the antioxidant defense pathway (Flora, 2009, Mustacich and Powis, 2000), that was affected by CuO NP in various aquatic organisms such as algae (Melegari et al., 2013), fish (Villarreal et al., 2014), anemones (Siddiqui et al., 2015) and marine bivalves (Mouneyrac et al., 2014; Kastsumiti et al., 2018). In bivalves, the antioxidant defense activities (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)) were increased after CuO NP exposure in the marine species *Mytilus galloprovincialis* and *Scrobicularia plana* exposed to 10 µg Cu/L for 3 to 21 days along with involvement of detoxification mechanisms (metallothionein (MT), glutathione-S-transferase (GST)) (Buffet et al., 2011, 2013; Gomes et al., 2011, 2012; Ruiz et al., 2015). These defenses were not sufficient to prevent damage since lipid peroxidation (Gomes et al., 2011; 2012), apoptosis (Buffet et al., 2013) and genotoxicity (Buffet et al., 2013; Gomes et al., 2013; Ruiz et al., 2015) were observed.

There is currently a need to investigate chemical effects at different biological levels as mentioned by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) for the development of an Adverse Outcome Pathway (AOP) approach (OECD, 2018). This approach aims to provide information of causally linked events at different biological levels of organization following the exposure to a chemical and leading to an adverse health effect, which should help for regulatory purposes. In the literature, studies relying on the impact of NP across different pathways and biological levels are underrepresented so far. In this context, the use of -omic tools such as the measurement of gene expressions, protein or metabolite activities should then be particularly informative by allowing the simultaneous monitoring of a high number of responses (Snape et al., 2004; Mussali-Galante et al., 2013). In addition, the expected precocity of answers at such levels can provide an early warning signal of contamination effect that should have further repercussions on the organism physiology, and allow unraveling of the pathways of toxicity mechanisms (Bigot et al., 2011; Chen et al., 2015). The extrapolation of effects to higher biological levels is not easy to demonstrate and needs to be also thoroughly investigated. Targeting responses implicated in various pathways and levels will provide a global and integrative vision of effects allowing a more robust evaluation of the toxic potential of a contaminant (Mussali-Galante et al., 2013).

The interactions of a contaminant with the different cellular components implicated from the cellular entry to organism response has to be taken into account. Indeed, the cellular uptake of metallic NP will occur via active transport (endocytosis) or passive diffusion through the cell membrane (Beddoes et al., 2015). P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), as part of the multi-xenobiotic-resistance (MXR) system, can act as detoxifier due to their role of multidrug transporter (Achard et al., 2004). If they manage to enter the cell, NPs can interact with cell targets, the first of them being proteins. In order to maintain the integrity of proteins, members of the Heat Shock Protein family may be solicited (Fabbri et al., 2008). As already mentioned, the induction of oxidative stress is expected in the presence of NP. Cells are armed with a battery of enzymes able to protect them against harmful effects of ROS. The most studied are superoxide dismutase (SOD) that allows the dismutation of O_2^- to H_2O_2 , Catalase (Cat) that reduces H_2O_2 to water and oxygen, and glutathione peroxidase (GPx) that reduces H_2O_2 or other hydroperoxides (Flora, 2009). Glutathione-S-transferase (GST) is also studied because of its contributions to antioxidant, and more generally, antitoxic mechanisms (Doyen et al., 2008). The contribution of Thioredoxin reductase (Trxr) which is mainly involved in antioxidant pathways, and its contribution in DNA synthesis, gene transcription, cell growth and apoptosis inhibition was also described (Mustacich & Powis, 2000). One major consequence of the ROS overproduction is the damage to membranes by peroxidation of their lipid components (Alves de Almeida et al., 2007). In the presence of metallic toxicants, the cell may trigger the synthesis of metallothioneins (MT). Finally, implementing such a battery of defenses against toxic effects may present an energy cost for cells. The assessment of parameters involved in the metabolic management in the cells (e.g. triglyceride content, electron transport system (ETS) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity) can give insights in the physiological status of the organisms and inform about the favored metabolic pathways. In addition to identifying the major pathways of response of the cells, it is relevant to address these pathways by different approaches from gene expression to enzymatic activities or metabolite synthesis and even to the physiological process such as, for example, the measurement of the filtration rate that may provide information about the exposure to the contaminant.

The aim of this work was to provide a multiparameter and multiscale assessment (molecular, biochemical and physiological) of CuO NP effects on *C. fluminea* exposed to different concentrations (0, 20 and 100 $\mu\text{g CuO/L}$) in a short-term period (96 hours). Considering the

importance of NP size on their stability, solubility and surface reactivity (Peng et al., 2017; Baker et al., 2014), we expected to observe different effects between the two CuO NP particles. A battery of gene expressions and biochemical markers involved in the previously described pathways was monitored and a filtration test was performed at the end of the exposure period. Since our aim is to depict a global modification of biological parameters associated to NP exposure, these parameters will not be analyzed individually. Instead we developed an integrated interpretation of obtained results thanks to multivariate statistical tools.

2. Materials and methods

2.1. Tested Nanoparticles

Two CuO NPs were selected in this study. The first one was provided as CuO NP powder with a particle size of 10-100 nm specified by the manufacturer (Intrinsiq Materials Limited). These NPs were previously characterized by Buffet et al. (2011). Briefly, nanoparticles were uncapped and polyhedral with a size determined by transmission electron microscopy (TEM) of 29.5 nm in average while their hydrodynamic size in deionized water (DIW) determined by dynamic light scattering (DLS) ranged from 40 to 500 nm (194 nm average). Their specific surface area (SSA) was $25.3 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. The zeta-potential was +26.3 mV, indicative of relative stability in DIW. The suspension appeared stable for approximatively 1 month. A stock suspension of 25 mg.L^{-1} was prepared in DIW according to Buffet et al. (2012) protocol, stored at room temperature and used during the whole experiment. The stock suspension was sonicated for 5 mins (Sonorex super RK 510, 160 W) before each use and was called "30nm-NP" in this study.

The second tested CuO NPs, called "12nm-NP", were supplied by PlasmaChem GmbH (Germany) and suspended by the CEREGE laboratory in Milli-Q water at 518 mg CuO/L . They were previously characterized by Ortelli et al. (2017). The particles were uncoated and semi-spherical with a size reported of $12 \pm 8 \text{ nm}$ measured by TEM. Their hydrodynamic size in DIW was 140.5 nm (DLS) and their SAA was $47 \pm 1.7 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. The zeta potential in ultrapure water was $+28.1 \pm 0.6 \text{ mV}$, indicating a relative stability in such media. This stock suspension was homogenized by magnetic stirring for a few minutes before injections (Ortelli et al., 2017).

2.2. Collection and acclimatization of organisms

Freshwater Asian clams *C. fluminea* (3.1 ± 0.3 cm) were hand-collected in June 2016 in the Moselle River, La Maxe (49°09'42.9"N 6°11'55.0"E, France) at a water temperature of 21°C. The physico-chemical characteristics of the site water were previously measured (NH₄: 0.03 mg N/L; NO₂: < 0.05 mg N/L; NO₃: 1.69 mg N/L; PO₄: 0.01 mg P/L; P tot: 0.10 mg P/L; Cl⁻: 214 mg/L; SO₄: 52 mg/L; TAC: 2.3 meq; MEST: 15.4 mg/L; MVS: 37.2%; Ca²⁺: 117 mg/L; Mg²⁺: 9.3 mg/L; Na⁺: 61.4 mg/L; K⁺: 4.2 mg/L; DCO: 52 mg/L; DBO₅: 4 mg/L; Tot A: 9.54 meq/L; Tot C: 9.4 meq/L; Bal.: -0.7%; pH: 8.0; Cond: 1040 µS/cm; dissolve Cu: 1 µg/L; Cu tot.: 1.7 µg/L). After sampling, the clams were transported to the laboratory in their water of origin in plastic coolers. They were acclimated progressively to the experimental conditions in a temperate room (15 °C) for 3 days by gradually increasing the proportion of artificial water that will be used for the experiment. The artificial water was prepared using commercial salt (TropicMarin®) at 1.5 psu. The media was continuously aerated and a natural photoperiod was kept (16h light: 8h dark). One day before the experiment, two organisms per beaker were placed in 200 mL of water in order to acclimate them to the device.

2.3. Experimental design

C. fluminea were exposed to 0 (controls), 20 and 100 µg CuO/L of each NP (30nm-NP and 12nm-NP) for 96 hours at 15°C in artificial water (1 *C. fluminea*/ 100 mL). The consideration of the SSA of each NP lead to 0.000506 m²/L and 0.00253 m²/L for 30nm-NP and 0.00094 m²/L and 0.0047 m²/L for 12nm-NP at 20 µg/L and 100 µg CuO/L respectively. The water was renewed every day. No oxygenation and no feeding were performed in order to avoid any interference with NP. The natural photoperiod (16h light: 8h dark) was kept during the entire duration of the experiment. Clams were sampled after 24 and 96 hours of exposure for biochemical and molecular analyses. After 96 hours, a filtration test was also conducted. The total copper concentrations were measured in the water column and in the organisms (digestive gland and remaining tissues).

2.4. Measurements of water and tissue copper concentrations

As the media was changed daily, the water was sampled for total Cu measurement immediately after NP introduction and after 24 hours (just before the next renewal) in 3 beakers selected randomly. This procedure was applied three times: at the start of the

exposure and at the renewal at 24 and 72 hours of exposure. Five clams per treatment were dissected after 24 hours of depuration at each time step (0, 24, 96 hours) for Cu measurement. Then, the digestive gland and the remaining soft tissues were selected, freeze-dried, weighed and digested in 69% HNO₃ for 24 hours at 60°C. Concentrations were determined by flame (Perkin-ELMER Aanalyst 100) or by graphite furnace (VARIAN Spectraa 800 with ZEEMAN correction) atomic absorption spectrophotometry depending on metal concentration. Certified water (SRM 3114) was used to check the accuracy of the quantification (20.2 ± 1.7 µg Cu/L for 20 ± 1 µg Cu/L). Metal concentration in clams are expressed as µg.g⁻¹ dry weight (DW) tissue and µg.L⁻¹ for water media.

2.5. Measurements of gene expression

2.5.1. Preparation of RNA extraction

C. fluminea digestive glands of 6 individuals per treatment were excised, rinsed in PBS 1%, and transferred into 1 mL of RNA later kept in 4°C during a maximal duration of 1 month. After a manual removal of non-digestive tissue, digestive glands were stored in -80°C until subsequent analysis.

The total RNA was extracted from the digestive gland using an RNeasy mini kit (Quiagen) according to the manufacturer protocol. Genomic DNA was digested after extraction with DNase I (Sigma Aldrich) and total RNA was purified with RNeasy mini kit. RNA purity and quantity were assessed by optical density measurements (OD 260 nm and OD ratio 260/280 and 260/230). RNA integrity was assessed by capillary electrophoresis using Bioanalyseur 2100 (Agilent, CA, USA).

2.5.2. RT-qPCR analysis

RT-qPCR was then performed on 12 genes and the sequences used in this study are listed in Supporting data Table S1. Primers were designed using Primer3Plus. The cDNA was synthesized in a final volume of 20 µL using 1 µg of RNA, 2.5 µM of random hexamer primers and SuperScript® III reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The qPCR reaction was performed as in Koehlé-Divo et al. (2019). Briefly, 45 ng of cDNA, water (no template control) or total RNA (45 ng/reaction; no RT control) were used as a template, from 200 to 300 nM of primers (see table S1) and Fast SYBR® green master mix (Applied Biosystem®, CA, USA) in a reaction mixture with a final volume of 20 µL. The cycling

conditions were 20 s at 95°C, followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. The melting curve was used to check the specificity of the amplicons and their sizes were verified on agarose gel. All PCR amplifications were performed on each biological replicate using the StepOnePlus RT-PCR system (Applied Biosystems®). Gene expression levels were analyzed using the relative quantification method ($\Delta\Delta C_t$) (Livak and Schmittgen, 2001). Two genes were selected as potential normalizing genes (S3 and β -actin), but only β -actin has revealed sufficient stability in our exposure conditions. β -actin was then used as a reference for normalization. The control condition (0 $\mu\text{g/L}$) was chosen as the reference condition. The final treated/control ratio and the pooled standard deviation were calculated based on the mean ΔC_t of the biological replicates. Statistical analyses were performed separately for each exposure duration (24 & 96 hours) as described below (§2.8).

2.6. Biochemical biomarker analysis

After removal of the shell, the *C. fluminea* digestive gland was excised, kept in ice and stored at 80°C until analysis. Digestive glands of six clams per treatment were treated as described in Sroda and Cossu-Leguille (2011) for cellular biomarker measurements. The digestive glands were defrosted, weighed and crushed in a 50 mM phosphate buffer at pH 7.6 and at 4°C and supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitor at a 8/1 volume/weight ratio. The mixture was then centrifuged at 250 $\times g$ at 4°C during 5 min and supernatant was divided in two parts: one for the assay of total protein, LPO, ACP and ETS activities, while the other part was centrifuged during 20 min at 1,000 $\times g$ at 4°C and 50 min at 20,000 $\times g$. The final supernatant corresponded to the cytosolic fraction that was used for enzyme activity.

Biomarker analysis was then performed on the automated spectrophotometer analyser (Konelab 20 XTi, Thermo Scientific) by using protocols described in Bertrand et al. (2016). Briefly, total protein content ([prot]), triglyceride content (Trigly), lipid peroxidation (LPO), acid phosphatase (ACP) and electron transport system (ETS) mitochondrial activities were measured using the whole homogenate whereas total protein content ([prot]), total antioxidant capacity (TAC), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured in cytosolic fractions. The SOD activity was assessed using the WST-1 method (Ukeda et al., 1997) adapted to *C. fluminea*. Statistical

analyses were performed separately for each exposure duration (24 & 96 hours) as described below (§2.8).

2.7. Filtration rate measurements

Five clams per treatment were placed separately in 50 mL of neutral red solution of 5 mg.L⁻¹ in the dark at 15 °C at the end of the exposure. Clams were placed in the middle of each beaker and were allowed to filter for 2 hours. Then, clams were picked up and placed in clean artificial water to let them depurate for 24 hours. The beakers containing the neutral red solution were acidified to pH 5.0 with HCl 37% immediately after removal of the organisms and agitated for homogenization. Then, 1 mL was sampled twice in each beaker and the absorbance was read at 530 nm. The neutral red concentration in each beaker was then calculated using the standard neutral red curve. Filtration rate (f) was calculated according to Coughlan (1969): $f = (V/(n \times t)) \times \log (C_0/C_t)$ with V corresponding to the total volume of neutral red solution (100 mL), n the number of individuals, t the time (h), C₀ and C_t the initial and final neutral red concentrations in the beakers respectively.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using R (R Core Team, 2014). The homoscedasticity and the normality were checked by Levene and Shapiro tests respectively for the filtration rate and the bioaccumulation results. As the conditions of use were confirmed, these data were analyzed using a one-way anova test in order to compare both NPs separately from their respective controls for the filtration rate results. A Student T test was performed on filtration rate for the comparison of both control groups. Significant results were defined with a threshold of $p < 0.05$. A two-way anova was performed on the bioaccumulation dataset in order to compare each condition over time.

The gene expression dataset as well as the biochemical markers were analyzed using multivariate analyses. First, a manova (multivariate ANOVA) was performed to assess if significant differences could be depicted according to the tested factors. These results helped us to design each Partial Least Square Discriminant Analyses (PLS-DA) highlighting the actors of those differences. Only the variables (*i.e.* gene expressions or biochemical biomarkers) with a Variable Importance in Projection (VIP) score above 0.8 were considered. Finally, Hotelling

T² tests were performed on PLS-DA results to more thoroughly explore the differences between the exposure conditions.

3. Results

3.1 Water and tissue Cu concentrations

Measurements of total Cu in the water are reported in fig. 1 and are expressed as percentage of recovery compared to the nominal introduced concentrations. Cu concentrations in water immediately after the introduction of NPs were close to the intended concentrations for both 20 µg CuO/L treatments with 98 ± 10 % and 92 ± 8 % recovery for 30nm-NP and 12nm-NP respectively. High recoveries were also measured for both 100 µg CuO/L treatments with 30nm-NP and 12nm-NP presenting 82 ± 4 % and 84 ± 8 % recovery respectively. Cu concentrations were also measured before each renewal (after 24 hours) and showed a decrease of 75 ± 1 % in all NP treatments (20 & 100 µg/L) after 24 hours in the test media. Except for some slight variations, measurements of total Cu concentrations in the *C. fluminea* digestive gland (fig. 2) showed no significant accumulation of copper during the whole experiment duration. Additional measurements of Cu were performed on the remaining soft tissues (data not shown) but no significant accumulation was measured either.

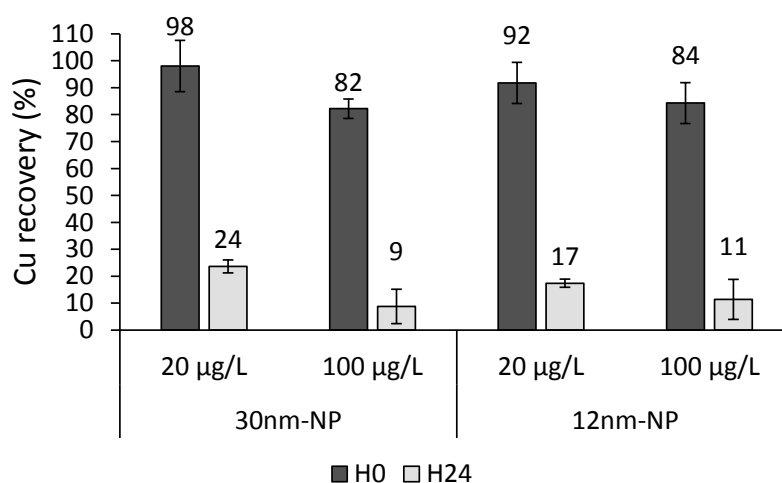


Figure 1: Percentages of Cu recovery compared to nominal Cu concentrations injected in the water column for each CuO NP treatment. These measurements are the mean $\pm$ SD (n=3) of the initial concentrations (H0) and concentrations after 24 hours (H24) for each NP treatment, obtained from samples collected at the start and after 24 and 72 hours of experiment (See 2.4).

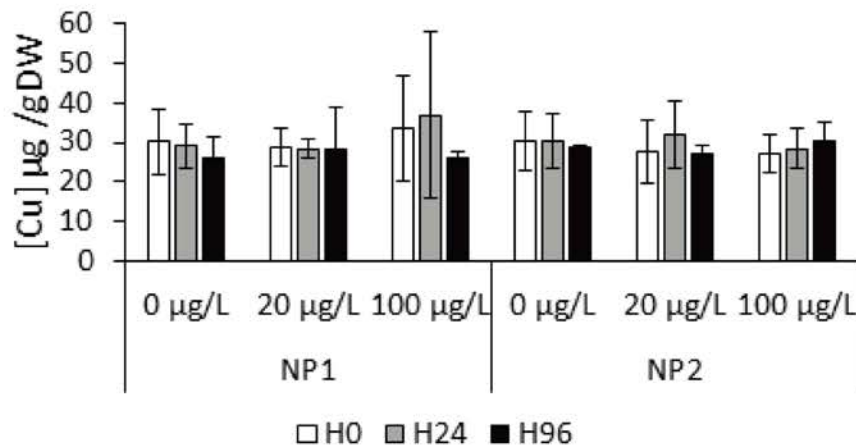


Figure 2: Total Cu concentrations (mean $\pm$ SD, n=5) in the digestive gland of *C. fluminea* exposed to two different CuO NPs during 0, 24 and 96 hours. No significant differences between groups were pointed out by statistical tests.

3.2 Gene expression

The Manova analysis performed on the 24 hour gene expression dataset indicated a significant concentration effect ($F = 3.5_{4-60}$ df, $p < 0.05$) and a significant interaction of NP type with NP concentration ($F = 5.4_{4-60}$ df, $p < 0.001$) while no effect of NP type alone ($F = 1.0_{2-29}$ df, $p = 0.37$) was recorded. The pairwise comparisons (fig. 3, Table, left side) indicated significant differences between control organisms and the ones exposed to the highest concentration (100 µg CuO/L) for 30nm-NP while the 20 µg CuO/L treatment for 12nm-NP was different from both control and 100 µg/L treatments. The PLS-DA presented in fig. 3 (left side) highlighted these differences. The horizontal axis separated 30nm-NP treatments by lowered expression of genes involved in antioxidant defenses (CAT, GST-pi, Trxr, CuZnSOD, MnSOD & Se-GPx) when exposure concentration increased. Both control and 100 µg/L treatments for 12nm-NP were relatively close while 20 µg/L treatment was different, mainly along the vertical axis, presenting more PGP, MRP1 and MT transcripts than the two other groups.

The Manova analysis conducted on the 96 hour gene expression dataset indicated a significant impact of NP type alone ($F = 17_{2-29}$ df, $p < 0.001$) and of its interaction with NP concentration ($F = 4.1_{4-60}$ df, $p < 0.01$) while no significant difference was shown for the concentration effect alone ($F = 1.1_{4-60}$ df, $p = 0.37$). The pairwise comparisons (fig. 3, table right side) only showed a clear discrimination between both NP types (30nm-NP & 12nm-NP) at the highest exposure concentration (100 µg/L). The associated PLS-DA is presented in fig. 3 (right side). Both NP types at 100 µg/L were separated by the vertical axis that showed a higher mRNA content of

MT and GST-pi in 30nm-NP exposed organisms compared to those exposed to 12nm-NP. The horizontal axis described by MRP1, PGP and Trxr expressions did not allow a clear separation between groups, but 12nm-NP exposed organisms tended to display an expression slightly more pronounced for these genes than 30nm-NP exposed ones did. This is in agreement with the results observed at 24 hours when MRP1 and PGP displayed more transcripts especially in organisms exposed to the lower concentration.

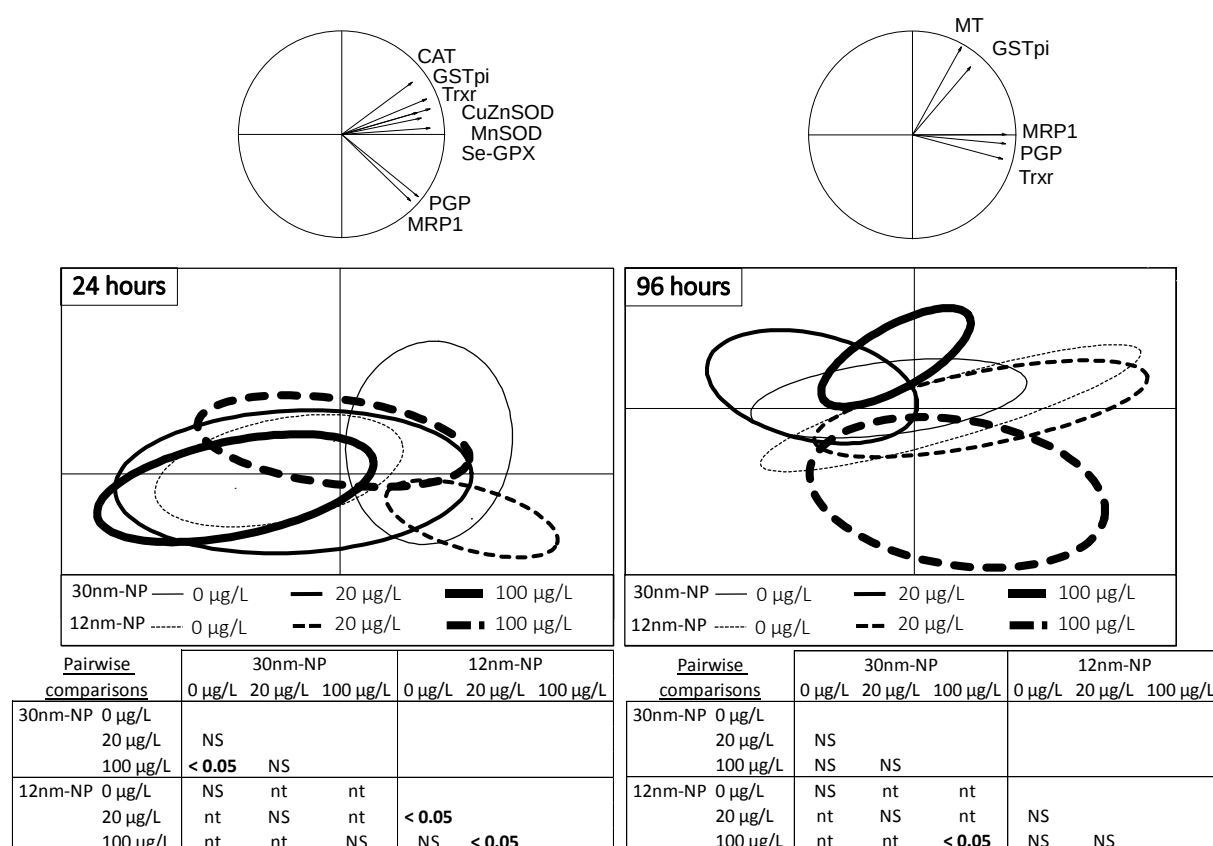


Figure 3: PLS-DA analyses using gene expressions monitored in *C. fluminea* digestive gland after 24 hours (left side) and 96 hours (right side) of exposure to different CuO NP (30nm-NP & 12nm-NP) at different concentrations (0, 20 and 100 µg CuO/L). The factorial plane represents expression differences between organisms while the correlation circle shows important variables in the projection having VIP > 0.8. The table associated with each PLS-DA shows the pairwise comparisons results. Bold values correspond to significant differences, “NS” are non-significant values and “nt” are non-tested comparisons. Quantitative PCR data were normalized using the β -actin gene.

3.3. Biochemical markers

The PLS-DA analyses using biochemical biomarkers measured in *C. fluminea* digestive gland after exposure to the two CuO NPs (30nm-NP & 12nm-NP) are presented in fig. 4. The Manova analysis performed on the 24 hour biochemical marker dataset did not indicate any significant effect of NP concentration ($F = 0.45_{2-29}$ df, $p = 0.65$), NP type ($F = 1.95_{4-60}$ df, $p = 0.11$) or

interaction between them ($F = 0.1.67_{4-60 \text{ df}}$, $p = 0.17$). The associated Hotelling T^2 tests were in accordance with the Manova's results, showing no significant difference among all experimental groups. The Manova analysis conducted on the 96 hour biochemical marker dataset did not indicate any significant effect of NP concentration ($F = 0.2.9_{2-29 \text{ df}}$, $p = 0.07$), NP type ($F = 1.99_{4-60 \text{ df}}$, $p = 0.11$) or interaction between them ($F = 0.86_{4-60 \text{ df}}$, $p = 0.49$). The associated Hotelling T^2 tests were in accordance with the Manova's results, showing no significant difference between all exposure groups.

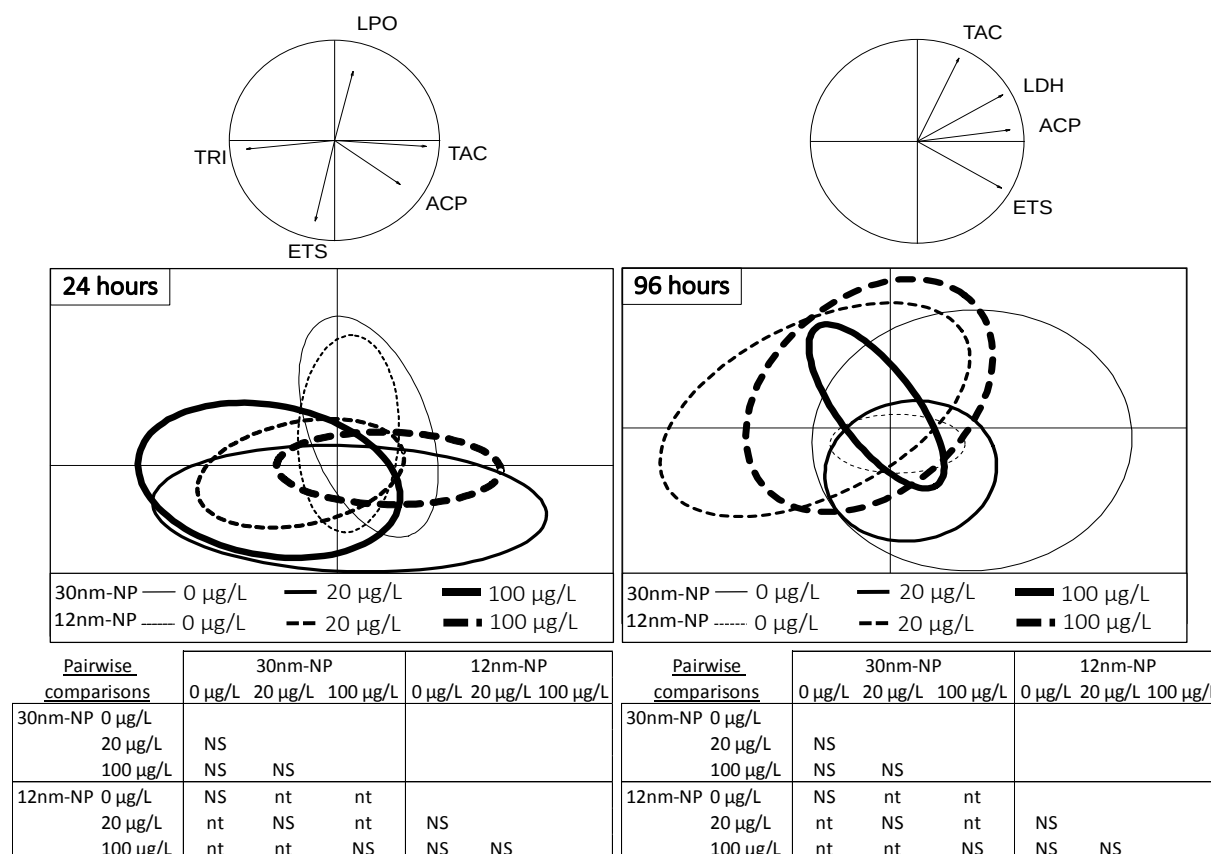


Figure 4: PLS-DA analyses using biochemical biomarkers measured in *C. fluminea* digestive gland after 24 hours (left side) and 96 hours (right side) of exposure to different CuO NP (30nm-NP & 12nm-NP) at different concentrations (0, 20 and 100 µg CuO/L). The factorial plane represents biomarkers response related to exposition groups while the correlation circle shows important variables in the projection having VIP > 0.8. The table associated with each PLS-DA shows the pairwise comparisons results. Bold values correspond to significant differences, “NS” are non-significant values and “nt” are non-tested comparisons.

3.4. Filtration rate

The filtration rates measured at the end of the exposure (96 hours) are shown in fig. 5. No significant difference was obtained between both controls ($t=2.88_{3.8 \text{ df}}$, $p = 0.48$). The organisms exposed to 30nm-NP presented a significant decrease of filtration rate when

exposed to the highest concentration (100 $\mu\text{g CuO/L}$) and the ones exposed to 12nm-NP presented a significant decrease of filtration activity for both exposure concentrations (20 & 100 $\mu\text{g CuO/L}$).

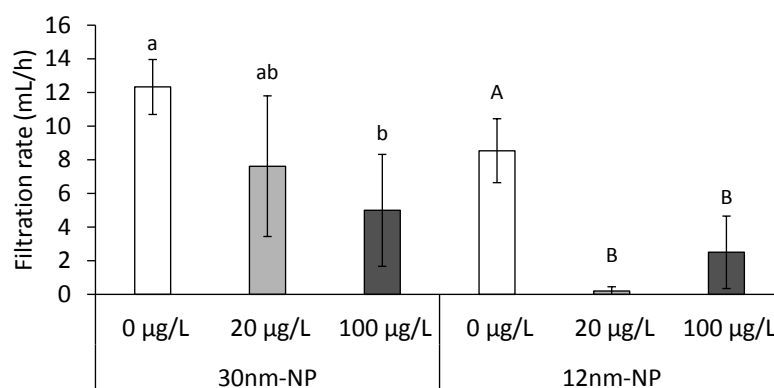


Figure 5: Filtration rate of *C. fluminea* exposed 96 hours to two CuO NPs at three concentrations (0, 20 and 100 $\mu\text{g/L}$). The results obtained for each NP were analyzed independently. Groups with different letters (lowercase for 30nm-NP, capital for 12nm-NP) are significantly different.

3. Discussion

The aim of this study was to define if different sizes of CuO NP may have different effects on *C. fluminea* exposed in a short-term period to concentrations of copper potentially found in the environment. In freshwater ecosystems, the Cu concentrations can range from 0.04 to 294 $\mu\text{g/L}$ and can even reach 20 mg/L in extremely polluted areas (Tran et al., 2003 and references therein). These concentrations generally relate to dissolved and micrometric Cu, but the nanoparticulate forms could be a part of this contamination. The selected concentrations in this study were included in the Cu concentration range measured in the environment, but also in those estimated by Chio et al. (2012) for Cu NP in Taiwanese rivers with a confidence interval of 95% (10 – 920 $\mu\text{g/L}$), but they were more than 200 times higher than the PEC values reported more recently in water by other authors (Liu and Cohen, 2014; Garner et al., 2017). Although the tested concentrations (20 and 100 $\mu\text{g/L}$) seem then relatively high from an environmental point of view, they have allowed the recovery of the contaminant in the exposure media and the assessment of CuO NP effects at lower doses than the mg/L range used in traditional ecotoxicological studies. While most studies focused on behavioral or physiological traits, molecular parameter assessment is still scarce in aquatic ecotoxicology despite its sensitivity (Châtel et al., 2018). This is due to the limited genomic information for sentinel and non-model organisms (Calzolari et al., 2007; Mussali-Galante et al., 2013), such as

bivalve species. Among bivalves, most of the studied organisms are marine species and mostly represented by *Mytilus galloprovincialis* (Rocha et al., 2015; Revel et al., 2017). The measurement of expression of known genes for *C. fluminea* is relevant since these genes might be engaged in key responses against contamination and will give additional information regarding NP toxicity in freshwater species. In addition, the sensitivity and the precocity of answer at such a biological level will allow the detection of early warning signals during a short-term period, as the one applied in this work. This monitoring may also help to provide knowledge about mechanistic events that can be integrated afterward in AOP approaches for risk characterization (Revel et al., 2017).

As many parameters influenced NP fate in the environment, the measurement of the effective exposure concentration appeared as a first crucial indication. Our results clearly showed a drop of the concentration of Cu in the water after 24 hours. As usually observed, the loss might be explained by the process of NP homoaggregation and/or heteroaggregation, which is enhanced when the concentration increases (Bundschuh et al., 2018; Baker et al., 2014; Melegeri et al., 2013; Baek and An, 2011; Lead et al., 2018). The fast aggregation kinetic of NP between the injection and the sampling would be responsible for the lower values measured than the intended ones (much lower for 100 µg/L treatments). The resulting sedimentation is then responsible for the reduction of NP concentration in the water. The adsorption of NP on different abiotic and biotic surfaces can also contribute to this reduction. Even if the concentrations measured after each renewal were slightly lower than intended values, they remained close to them and this ensures that the pressure of NP exposure was maintained as properly as possible during the whole experiment.

Bivalves are filter-feeders and are known to bioaccumulate various contaminants including nanoparticles (Hanna et al., 2014; Rocha et al., 2015; Buffet et al., 2011), but they were also reported to pack NP in pseudofeces (Montes et al., 2012; Conway et al., 2014) and in feces (Hull et al., 2011; Ward and Kach, 2009), then reducing the bioaccumulated content. In our study, neither the digestive gland nor the rest of the soft tissues showed any significant bioaccumulation. Bioaccumulation of CuO NP was reported in marine bivalves to concentrations as low as 10 µg/L in *Scrobicularia plana* (Buffet et al., 2011; 2013) and even after 3 days of exposure in *Mytilus galloprovincialis* (Gomes et al. 2011; 2012; 2013, 2014). The absence of bioaccumulation recorded in *C. fluminea* remains difficult to explain, but the short duration of the exposure period might be a first point. Secondly, a short depuration

period was applied. Other authors do not systematically do so and may have overestimated the actual accumulated concentrations including for example the Cu passing through the lumen of the digestive tracts. Finally, the filtration test we performed clearly showed that clams pre-exposed to both NPs reduced their filtration activity when further placed in clean water. *C. fluminea* was already reported to quickly respond to Cu contamination by closing their valves, even at low doses < 5 µg/L (Tran et al., 2003; Castro et al., 2018), which reduced the organism exposure to the NPs. Our experimental design does not enable us to monitor filtration activity directly during the NP exposure, but we assume that if filtration was reduced during the exposure (as it was during the test), it might partly explain why significant accumulation has not occurred. The absence of significant bioaccumulation observed does not necessarily mean an absence of contact or uptake, as already observed in other studies, using relatively low exposure concentrations, in which the absence of bioaccumulation of CeO₂ NP (Koehlé-Divo et al., 2018; Garaud et al., 2015) was measured in bivalve species while strong biochemical and/or genotoxic effects were highlighted. In order to be sure that there was effectively no bioaccumulation, the use of labelled NP as tracer should be particularly relevant since labelling make them easily detectable, even in small quantities (Dybowska et al., 2011). At the molecular level, the measurement of gene expression allowed us to evidence significant effects linked to the applied exposure. After 24 and 96 hours, significant effects were associated to the interaction of both the type and the concentration of the tested NP. After 24 hours of exposure, the results suggest that 30nm-NP may be less oxidant than 12nm-NP, because the level of transcripts of genes involved in anti-oxidant defense was reduced. At 96 hours, an increase of transcripts of detoxification genes was noticed (MT and GSTpi), but genes of anti-oxidant defense were not significantly affected. As mentioned in Klaper et al. (2014), the oxidative stress response can dissipate quickly and other molecular pathways such as drug resistance or detoxification genes can be induced at low exposure concentrations. Indeed, in the case of exposure to 12nm-NP, it seems that the mechanisms of cellular excretion (MRP1 and PGP) were elicited, especially after 24 hours at 20 µg/L. Our work demonstrated for the first time in the clam *C. fluminea* significant but not striking effects of CuO NP exposure at the molecular level. Coherent pathways were involved in the response we detected, that was based mainly upon detoxification (30nm-NP) and cellular elimination (12nm-NP). Our final results showed that the markers investigated at the biochemical level did not respond to NP contamination regardless of NP type or concentration for both times monitored. The absence

of NP effect at this biological level was already reported in *M. galloprovincialis* exposed to 10 µg Cu/L of CuO NP for 24 hours (Ruiz et al., 2015) and for 3 days (Gomes et al., 2012) but it must be duly noted that detoxification mechanisms (MT, SOD, CAT, GPx and/or GST) and/or marker of damages (LPO) were enhanced at a longer timescale ranging from 7 to 21 days. A same trend was observed in *C. fluminea* exposed to 10 and 100 µg/L of CeO₂ NP where none of the monitored biochemical markers have been modified after 2 days of exposure but significant damages (apoptosis) were observed after 6 days of exposure (Koehlé-Divo et al., 2018).

The different responses monitored in this study for both tested NP may be explained by their differing sizes and specific surface areas. Because of their smaller size, 12nm-NPs display a higher specific surface area. Consequently, for a given mass, the surface of 12nm-NP available to interact with the organisms will be larger. Per mass unit, the exposure concentrations are similar, but once normalized by the specific surface area, the exposure concentrations are twice as high for 12nm-NP. In addition, the difference of particle size may lead to a higher amount of 12nm-NP particles per mass concentration than 30nm-NP (Quik et al., 2014; Singh et al., 2009). Moreover, the kinetics of transformation as dissolution are expected to be faster for 12nm-NP because of their higher specific surface area (Auffan et al., 2009; Singh et al., 2009). Although their uncoated surfaces may have led to their fast aggregation in the exposure media, and by this, to the reduction of their surface reactivity, their interactions with the biological surfaces should allow their disaggregation through mechanical actions (gill cilia, labial palps) and/or their dissolution due to the composition change (proteins, pH) (Rocha et al., 2015; Ward and Kach, 2009; Canesi et al., 2012, Griffitt et al., 2008). The high sensitivity of *C. fluminea* to copper could perhaps explain their physiological responses and the entry of CuO NPs and ions in the cells could have also contributed to the observed responses by interacting with cellular components. Finally, our results are in agreement with those obtained in the literature which have shown different effects of NP according to their size on ecotoxicological endpoints, the smaller being usually more toxic than the bigger ones (Hu et al., 2014; Peng et al., 2017).

Conclusion

In this study, the short-term exposure of the Asian clam *C. fluminea* to relatively low concentrations of NPs (20 & 100 µg CuO/L) compared to the available literature highlighted significant modifications at different scales of biological organization from physiological to molecular levels. Integrated gene expression analysis revealed a different mechanism of action depending on NP treatment, with one enhancing antitoxic related mRNAs while the other presented gene expression modification linked to cellular elimination pathway. This analysis was performed on a restricted number of genes due to the lack of gene sequences in the clam *C. fluminea*. The filtration rate appeared also useful for the assessment of NP toxicity and induced an avoidance response of *C. fluminea* by valve closure. On a longer time scale, the reduction of the filtration rate and the gene expression modification could be increased and also lead to further side-effects. In the future, with the next generation sequencing advances, the omic tool will allow a screening of a larger set of genes involved in several pathways, like cell proliferation, cell signaling, or DNA repair. Although *C. fluminea* is considered as relatively tolerant to contaminants compared to other bivalves (Castro et al., 2018), these NPs were shown here as reactive in a short-term exposure and using a waterborne contamination. In regard to our results, the assessment of these NP impacts on *C. fluminea* should be addressed in more complex as well as in longer timescale experiments which can be achieved by the setting up of mesocosm experiments. The multi-scale approach is particularly relevant for a better evaluation and understanding of a potential toxicity on individuals and contribute to increased information regarding the first steps of an AOP approach. Such an assessment should be further developed at higher biological levels, including population and communities.

Acknowledgements

Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) and CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is also a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR- 10-LABX-21-01, Strategic metal resources of the 21st century). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology. KOEHLE-DIVO Vanessa received financial support for salary from French

Research ministry. The authors gratefully acknowledge Sharon Kruger for her English corrections.

References

Achard, M., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.014>

Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>

Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution* 157, 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.002>

Baek, Y.-W., An, Y.-J., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of The Total Environment* 409, 1603–1608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>

Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 186, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>

Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science* 218, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007>

Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giambérini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*: Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 2550–2561. <https://doi.org/10.1002/etc.3428>

Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2011. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology* 26, 623–632. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>

Buffet, P.-E., Amiard-Triquet, C., Dybowska, A., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in

sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

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*). *Environmental Science & Technology* 130110104824003. <https://doi.org/10.1021/es303513r>

Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M.S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R., Wagner, S., 2018. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe* 30. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>

Calzolari, L., Ansorge, W., Calabrese, E., Denslow, N., Part, P., Lettieri, T., 2007. Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.04.007>

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* 76, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>

Castro, B.B., Silva, C., Macário, I.P.E., Oliveira, B., Gonçalves, F., Pereira, J.L., 2018. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology* 196, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.002>

Châtel, A., Lièvre, C., Barrick, A., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2018. Transcriptomic approach: A promising tool for rapid screening nanomaterial-mediated toxicity in the marine bivalve *Mytilus edulis* —Application to copper oxide nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 205, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.01.003>

Chen, H., Zha, J., Yuan, L., Wang, Z., 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere* 119, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.062>

Chibber, S., Shanker, R., 2017. Can CuO nanoparticles lead to epigenetic regulation of antioxidant enzyme system? *Journal of Applied Toxicology* 37, 84–91. <https://doi.org/10.1002/jat.3392>

- Chio, C.-P., Chen, W.-Y., Chou, W.-C., Hsieh, N.-H., Ling, M.-P., Liao, C.-M., 2012. Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles. *Science of The Total Environment* 420, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.023>
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environmental Science & Technology* 48, 1517–1524. <https://doi.org/10.1021/es404549u>
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2, 356–358. <https://doi.org/10.1007/bf00355716>
- Doyen, P., Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.002>
- Dybowska, A.D., Croteau, M.-N., Misra, S.K., Berhanu, D., Luoma, S.N., Christian, P., O'Brien, P., Valsami-Jones, E., 2011. Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environmental Pollution* 159, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.032>
- Fabbri, E., Valbonesi, P., Franzellitti, S., 2008. HSP expression in bivalves. *Invertebrate survival journal* 5, 135–161.
- Flora, S.J., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2, 191–206.
- 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*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>
- Garner, K.L., Suh, S., Keller, A.A., 2017. Assessing the Risk of Engineered Nanomaterials in the Environment: Development and Application of the nanoFate Model. *Environmental Science & Technology* 51, 5541–5551. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05279>
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 84, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2014. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology* 155, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.015>
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus*

galloprovincialis. Aquatic Toxicology 118–119, 72–79.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>

Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environmental Science & Technology 45, 9356–9362. <https://doi.org/10.1021/es200955s>

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. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 1972–1978. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>

Hakenkamp, C.C., Ribblett, S.G., Palmer, M.A., Swan, C.M., Reid, J.W., Goodison, M.R., 2001. The impact of an introduced bivalve (*Corbicula fluminea*) on the benthos of a sandy stream. Freshwater Biology 46, 491–501. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00700.x>

Hanna, S., Miller, R., Lenihan, H., 2014. Accumulation and Toxicity of Copper Oxide Engineered Nanoparticles in a Marine Mussel. Nanomaterials 4, 535–547. <https://doi.org/10.3390/nano4030535>

Hou, J., Wang, X., Hayat, T., Wang, X., 2017. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. Environmental Pollution 221, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.066>

Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S., Dawson, K.A., Lynch, I., Blasco, J., Sheehan, D., 2014. Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: A redox proteomic investigation. Chemosphere 108, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.054>

Hull, M.S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.-Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J., 2011. Filter-Feeding Bivalves Store and Biodeposit Colloidally Stable Gold Nanoparticles. Environmental Science & Technology 45, 6592–6599. <https://doi.org/10.1021/es200809c>

Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A., 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. Chemosphere 35, 2817–2836.

Katsumiti, A., Thorley, A.J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T.D., Cajaraville, M.P., 2018. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. Toxicology in Vitro 48, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.013>

Keller, A.A., Adeleye, A.S., Conway, J.R., Garner, K.L., Zhao, L., Cherr, G.N., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., Godwin, H.A., Hanna, S., Ji, Z., Kaweeteerawat, C., Lin, S., Lenihan, H.S., Miller, R.J., Nel, A.E., Peralta-Videa, J.R., Walker, S.L., Taylor, A.A., Torres-Duarte, C., Zink, J.I., Zuverza-Mena, N., 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. NanoImpact 7, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

Keller, A.A., Lazareva, A., 2014. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Science & Technology Letters* 1, 65–70. <https://doi.org/10.1021/ez400106t>

Klaper, R., Arndt, D., Bozich, J., Dominguez, G., 2014. Molecular interactions of nanomaterials and organisms: defining biomarkers for toxicity and high-throughput screening using traditional and next-generation sequencing approaches. *The Analyst* 139, 882–895. <https://doi.org/10.1039/C3AN01644G>

Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, S., Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Sohm, B., 2019. *Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity. *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>

Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S., Giambérini, L., 2018. Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology* 198, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>

Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.-N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K., 2018. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 2029–2063. <https://doi.org/10.1002/etc.4147>

Liu, H.H., Cohen, Y., 2014. Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 48, 3281–3292. <https://doi.org/10.1021/es405132z>

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{−ΔΔCT} Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Marescaux, J., Falisse, E., Lorquet, J., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., Descy, J.-P., 2016. Assessing filtration rates of exotic bivalves: dependence on algae concentration and seasonal factors. *Hydrobiologia* 777, 67–78. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2764-0>

Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 142–143, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.015>

Mo zzi, F., Hedayati, S.A., Ghadermazi, A., 2018. Ecotoxicological impacts of exposure to copper oxide nanoparticles on the gill of the Swan mussel, *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Research* 38, 187–197. <https://doi.org/10.1080/13235818.2018.1441591>

Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *Journal of Hazardous Materials* 225–226, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.009>

Mouneyrac, C., Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Guibbolini, M., Faverney, C.R., Gilliland, D., Berhanu, D., Dybowska, A., Châtel, A., Perrein-Ettajni, H., Pan, J.-F., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Valsami-Jones, E., 2014. Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 7899–7912. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2745-7>

Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas Del Castillo, E., 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29.

Mustacich, D., Powis, G., 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 346, 1–8.

Ortelli, S., Costa, A.L., Blosi, M., Brunelli, A., Badetti, E., Bonetto, A., Hristozov, D., Marcomini, A., 2017. Colloidal characterization of CuO nanoparticles in biological and environmental media. *Environmental Science: Nano* 4, 1264–1272. <https://doi.org/10.1039/C6EN00601A>

Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y., Chen, Y., 2017. Behavior and Potential Impacts of Metal-Based Engineered Nanoparticles in Aquatic Environments. *Nanomaterials* 7, 21. <https://doi.org/10.3390/nano7010021>

Quik, J.T.K., Velzeboer, I., Wouterse, M., Koelmans, A.A., van de Meent, D., 2014. Heteroaggregation and sedimentation rates for nanomaterials in natural waters. *Water Research* 48, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.036>

R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Revel, M., Châtel, A., Mouneyrac, C., 2017. Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? *Aquatic Toxicology* 193, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.005>

Roberts, D.A., 2012. Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. *Environment International* 40, 230–243. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.11.013>

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. *Marine Environmental Research* 111, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>

Ruiz, P., Katsumiti, A., Nieto, J.A., Bori, J., Jimeno-Romero, A., Reip, P., Arostegui, I., Orbea, A., Cajaraville, M.P., 2015. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 111, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.018>

Shoults-Wilson, W.A., Unrine, J.M., Rickard, J., Black, M.C., 2010. Comparison of metal concentrations in *Corbicula fluminea* and *Elliptio hopetonensis* in the Altamaha River system, Georgia, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.235>

- Siddiqui, S., Goddard, R.H., Bielmyer-Fraser, G.K., 2015. Comparative effects of dissolved copper and copper oxide nanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. *Aquatic Toxicology* 160, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.007>
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.023>
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabau, J.-C., 2003. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic Toxicology* 65, 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00156-5)
- Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., Sawamura, M., 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-[5-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical biochemistry* 251, 206–209.
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology* 170, 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Villarreal, F.D., Das, G.K., Abid, A., Kennedy, I.M., Kültz, D., 2014. Sublethal Effects of CuO Nanoparticles on Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Are Modulated by Environmental Salinity. *PLoS ONE* 9, e88723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088723>
- Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 68, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>

Supporting data

Gene Name	Accession Number (GenBank)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon length (bp)	Concentration used for qPCR (nM)	GO biological process	Reference
Beta Actine	EF446608.1	CCTTTACCACAACAGCCGA	AGCATAGCCTCAGGGCA	191	300	Cell morphogenesis - mitotic cytokinesis - ...	Arini et col. 2014
Catalase	EF446609	CCTTCAGTGCCTAGTCTGG	CCTGTTCTCTGACCGTGG	196	200	Response to oxidative stress	Arini et col. 2014
Cu-Zn Superoxide dismutase	KF218347.1	GAATGTTGTGGCTGATGAGG	GGATCGTTCTCCTGTCAATG	76	250	Response to oxidative stress	Unpublished probes
Se-GPx	EF547366.1	TATGCCCTGTTCCCGTGTTT	CTGCCATCTGGACCAATCAG	148	200	Response to oxidative stress	Chen et col. 2015
GST-Pi	AN AY885667.1	CTGGGCGACCGAATACAAATC	GATGGCATTGGACTGGGCTA	90	250	Response to reactive oxygen species	Chen et col. 2015
HSP70	KC979064	CGCCGACGCTGATTACCTTA	AAACGGTTGATAGGACGCAAG	84	200	Cellular response to stress, heat, protein refolding,...	Chen et col. 2013
Metallothionein (isoform 1)	EF185126	CGGCTATCTCCGCGA	AGCTTTTACCAGAACCAACAGT	210	200	Cellular metal ion homeostasis, cellular response to oxidative stress	Arini et col. 2014
Mn Superoxide dismutase	EF446611	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC	GGATCATTGACGAGATGAAGGC	200	200	Response to oxidative stress	Arini et col. 2014
MRP1	KJ027659	GTGGTCGGGTCTGTTGCTA	AGGGTGGCGTTCTGTATCC	139	200	Drug transmembrane transport, xenobiotic transport	Chen et col. 2015
PGP / MDR	KJ001772	ATCCTGGTTGATGGCACTGA	AGGTTCTGGCTCACAATACC	80	200	Xenobiotic transport	Chen et col. 2015
Ribosomal protein S3	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AAACGGTTGATAGGACGCAAG	154	250	Translation (Used as housekeeping gene)	Navarro et col., 2011
Thioredoxin reductase	KF275126	AATGCGGTGGCTTCCTACA	TCTGCTGGTCAAATCCTCGC	89	200	Cell redox homeostasis	Chen et col. 2015

Table S1: Primer sequences used. Cited references: Navarro A, Faria M, Barata C, Piña B. 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut.* 159, 100-7. ; Arini A, Daffe G, Gonzalez P, Feurtet-Mazel A, Baudrimont M. 2014. Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. *Environ Pollut.* 192, 74-82. ; Chen H, Zha J, Liang X, Bu J, Wang M, Wang Z. 2013. Sequencing and de novo assembly of the Asian clam (*Corbicula fluminea*) transcriptome using the Illumina GAllx method. *PLoS One* 8, e79516. ; Chen H, Zha J, Yuan L, Wang Z. 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere.* 119, 856-62.

Points-clés

- Peu de CuO NM restent en suspension dans la colonne d'eau après 24 heures. Ceci peut être dû à leur agrégation suivie de leur sédimentation, mais également à l'activité de filtration des organismes.
- Les CuO NM ont impacté les réponses physiologiques et moléculaires des organismes de façon différente en fonction des NM utilisés. D'une part, les NM de plus petite taille (12 nm) ont plus fortement impacté le taux de filtration des organismes comparé aux NM de plus grande taille (30 nm) en le réduisant. D'autre part, leur taille (12 et 30 nm) et leur concentration (20 et 100 µg/L) ont eu des impacts sur l'expression des gènes mesurés.
- Aucun impact n'a été observé au niveau cellulaire à travers l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs durant le temps de l'exposition.
- La diminution, voire l'arrêt de la filtration des organismes pourrait être responsable de l'absence de bioaccumulation du cuivre mesuré chez *C. fluminea*. Cette absence de bioaccumulation n'a pas empêché la génération d'effets au niveau moléculaire qui peuvent alors être dus à la fois aux NM et à la fermeture de valves.
- La mesure d'un grand nombre de marqueurs à des niveaux biologiques différents a permis de mettre en avant des signaux précoces de contamination aux niveaux moléculaire et physiologique tandis que le niveau cellulaire n'a pas été impacté. Le couplage de ces analyses permet de clarifier les mécanismes d'action possibles. Dans le cadre de cette étude, les mécanismes particulièrement impactés sont impliqués dans la détoxification (MT, GSTpi) et la protection (arrêt de la filtration). Ces mécanismes ont permis d'éviter l'induction de dommages aux membranes cellulaires sur un temps d'exposition court mais les effets à plus long terme sont encore à déterminer.

Partie 2:

**From freshwater to estuarine environment: similar trends for
different fates of commercial CuO NMs**

From freshwater to marine environment: similar ecotoxicological trends for different fates of commercial CuO nanomaterials

KOEHLE-DIVO Vanessa¹, PAIN-DEVIN Sandrine¹, SOHM Bénédicte¹, DEVIN Simon¹, LACHAUX Nicolas¹, METAIS Isabelle², CHATEL Amélie², BRUNEAU Mélanie², AUFFAN Mélanie³, PERREIN-ETTAJANI Hanane², MOUNEYRAC Catherine², GIAMBERINI Laure¹.

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

² Université Catholique de l'Ouest, Laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS, EA2160), 3 Place André Leroy, F-49000 Angers Cedex 01, France

³ CEREGE, Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, Collège de France, INRA, Aix-en-Provence, France

Abstract

CuO nanomaterials (NMs) are incorporated in numerous daily life products such as antimicrobial paints from which passive liberation may occur, what will lead to their gradual introduction into the environment. The pristine forms of NMs may present fate and toxicity features distinct from those of NMs that are incorporated inside the products. Thus, the risk assessment of NMs should be conducted by taking into account their different forms encountered along their life-cycle but also through environmentally realistic exposure scenarios. The likely accumulation of NMs and fragmented paints in the sediment lead to an increasing exposure of benthic organisms such as burrowing bivalve species. In this study, freshwater (*Corbicula fluminea*) and seawater (*Scrobicularia plana*) clams were exposed for 28 days in mesocosm to pulses of acrylic paint containing CuO NMs and of NMs pristine form, reaching 50 and 150 µg CuO/L at the end for fresh- and marine- water respectively. Cu distribution within different compartments (water, sediment, organisms) was assessed and the effects were monitored using a multiscale approach. Thereby, behavioral (filtration and burrowing activity) and biochemical effects (anti-oxidant and detoxification processes, damages, energetic reserves and metabolism) were monitored in both species. In addition, the molecular level was investigated in *C. fluminea* by measuring the expression of 15 genes. The results confirmed the high concentration of NMs and paint particles in the sediments and the impacts of the salinity on the dissolution rate of the pristine form of CuO NMs. Regarding the effects, all the studied levels were impacted, with the molecular one being the most sensitive. Both of the treatments containing CuO NMs were the most impactful for both species, but the paint containing CuO NMs often induced the strongest effects, that were sometimes different from those of NM pristine form. Clams of both species triggered similar responses related to detoxification processes and burrowing disturbances but they did not respond similarly to all of the exposure conditions. The combination of the distribution measurements and the multilevel monitoring of effects provided useful tools for the risk assessment and are recommended for future studies.

Keywords: bivalve, copper oxide nanomaterials (CuO NMs), mesocosm, gene expression, biochemical effects, physiological effects

1. Introduction

Engineered nano-objects, their aggregates and agglomerates (NOAA) are currently incorporated in daily life products because their nano-size provides new features and new properties compared to the classical bulk forms. They are found in various domains such as electronic, food, automotive and health sectors and their production is continuously increasing (Keller et al., 2013; Vance et al., 2015). Their rapid expansion will then lead to the elevation of environmental NOAA concentration, since their release may occur throughout their entire life cycle (Nowack and Wang, 2018). According to an estimate of 2010, the release of anthropogenic NOAA, that are not found naturally, may represent 69,200 metric tons per year for the aquatic compartment (Keller and Lazareva, 2014). As their fate and effects could considerably differ from conventional substances, they may pose new risks through their unique physico-chemical characteristics. Increasing the dataset for risk assessment of such potentially hazardous substances remains of particular concern.

Copper (Cu) compounds have been used for long time for their antimicrobial and antifungal properties (Adeleye et al., 2016). Today, they are used under nanoparticulate forms in agriculture, food preservation, textiles, paints, coatings and water treatments (Keller et al., 2017). Their introduction in paints and their use in agriculture will constitute the main sources of environmental release (Keller et al., 2017). The environmental concentrations of Cu-based NOAA are estimated in the $\mu\text{g/L}$ range, but their accumulation in the long term may eventually lead to concentrations high enough to cause toxicity to organisms (Keller et al., 2017). The passive leaching of copper from fragmented paints (FP) may also lead to locally high concentrations of NOAA, potentially resulting in ecological damages (Adeleye et al., 2016; Keller et al., 2017). Both NOAA and FP may fall into the sediments in aquatic compartment, becoming available for benthic organisms (Turner, 2010; Soroldoni et al., 2017; Rocha et al., 2015; Baker et al., 2014; Dai et al., 2013). Their bioavailability towards and their effects on benthic organisms such as bivalve species appeared as a major concern since these organisms are able to bioaccumulate a large range of contaminants, including FP (Turner et al., 2009) and NOAA (Gomes et al., 2012, 2013, 2014 ; Buffet et al., 2011, 2013; Conway et al., 2014; Hanna et al., 2014).

In aquatic organisms, Cu-based NOAA were already reported to disturb defense mechanisms such as anti-oxidant and detoxification processes (Buffet et al., 2011, 2013; Gomes et al., 2011,

2012; Siddiqui et al., 2015; Ganesan et al., 2016). They were also able to cause behavioral disturbances (Buffet et al., 2011, 2013) and histological alterations (Vicario-Pares et al., 2018; Griffitt et al., 2007; Hu et al., 2014) as well as lipid peroxidation (Gomes et al., 2011, 2012), apoptosis (Buffet et al., 2013; Wang et al., 2015) and genotoxicity (Gomes et al., 2013). Some of these effects were observed at 10 µg Cu/L in marine water (Buffet et al., 2011, 2013; Gomes et al., 2011, 2013), highlighting their potential repercussions on aquatic organisms at environmentally realistic concentrations. The monitored effects in marine species should nonetheless differed from freshwater ones since the salinity can strongly affect NOAA properties. Indeed, its influence on NOAA lead to their rapid aggregation and sedimentation at high salinity (Peng et al., 2017, Keller et al., 2010; Bertrand et al., 2016). The salinity impact also NOAA dissolution rate and the speciation of the rejected ions (Auffan et al., 2017; Peng et al., 2017, Quik et al., 2014, Park et al., 2014). The dissolved copper was reported as more toxic than CuO-NOAA (Adam et al., 2015; Tavares et al., 2014) and the speciation of copper affects its bioavailability (Rossetto et al., 2014) and its related toxicity. Hence the salinity may also strongly impact the organism response. The assessment of NOAA effects should therefore be carried out at different salinities to enable the achievement of a comprehensive environmental risk assessment. In addition, the effects will differ between pristine NOAA and NOAA incorporated in a product (Nowack and Mitrano, 2018). Thus, the risk assessment of Cu-based NOAA should be performed using exposure designs mimicking as much as possible the environmental conditions regarding the complexity of the matrices, the concentration of NOAA and their actual forms in the environment. The use of mesocosm that refers to “an experimental system that simulates real-life conditions as closely as possible, while allowing the manipulation of environmental factors” appears a suitable tool for studying the environmental effects of NOAA (Buffet et al., 2013, Garaud et al., 2016; Auffan et al., 2015). The aim of this study was to assess the fate and the effects of CuO-NOAA on aquatic species under a complex exposure scenario. At present, most of the studies focused on the fate and toxicity of pristine forms of NOAA. As mentioned by Nowack and Mitrano (2018), the use of pristine forms is convenient for such evaluation, but the aged or released forms will be much more likely present in the environment than the pristine ones. Thereby, this study intended to assess fate and effects of NOAA incorporated in a product along with its pristine form. As salinity was demonstrated as crucial for NOAA bioavailability and because it affects FP leaching rates (Turner et al., 2010, Adeleye et al., 2016), we studied two species from both freshwater

and marine environments. The likely fate of the NOAA contaminants in the sediment conducted to the selection of endobenthic bivalve species, the Asiatic clam *Corbicula fluminea* in freshwaters and the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* in marine waters. They were exposed by pulse dosing to CuO-NOAA or to different forms of FP (with and without CuO-NOAA). As the assessment of NOAA effects at different levels of biological organization appeared particularly informative regarding their toxicity evaluation in bivalves exposed to CeO₂ (Garaud et al., 2015; Koehlé-Divo et al., 2018), Ag (Bertrand et al., 2016) and CuO NOAA (Buffet et al., 2011, 2013), the effects were monitored at different biological scales in both bivalve species. Indeed, the burrowing behavior and the filtration rate were determined along with the solicitation of defenses mechanism such as anti-oxidative and anti-toxic compounds, some markers of energetic demand as well as markers of damage at 14 and 28 days for both species. A deeper focus on molecular response was investigated in *C. fluminea* by studying the expression of genes involved against oxidative and toxic stresses, in membrane transport as well as in the apoptotic process. Multivariate tools were used to provide a global vision of the toxic effects.

2. Material and methods

2.1. CuO-NOAA and acrylic paints

Commercial CuO nanopowder (CuO-NOAA) was supplied by PlasmaChem GmbH (Germany) and solubilized in Milli-Q water at 518 mg CuO/L by the CEREGE. These NOAA were previously characterized by Ortelli et al. (2017). They were uncoated and spherical, with a primary particle size of 12 ± 8 nm measured by transmission electron microscopy (TEM), an hydrodynamic size in the stock suspension of 140 ± 5 nm, a specific surface area (SSA) of $47 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ and an isoelectric point at pH 10.3 (Ortelli et al., 2017).

These NOAA were incorporated at the rate of 1.5% (weight) in an acrylic paint containing 43% of white pigment TiO₂ (non-nano) passivated with an alumina coating (Pantano et al., 2018). The paint was also obtained without NOAA. The production of fragmented products (FP) of CuO-NOAA acrylic paint (called CuO_Acryl_FP) and of CuO-free acrylic paint (called Acryl_FP) was performed by the CEREGE and described in Auffan et al. (2018). Briefly, these paints were deposited on polyethylene (PE) foils and let dry for 3 days. Then, paint films were removed from the foils, cut into squares, placed in a polypropylene vial and stored at -10  C before being

manually grinding with liquid nitrogen (LN₂). A sieving was then performed to suppress the largest paint fragments (Auffan et al., 2018).

2.2. Collection and acclimation of organisms

Corbicula fluminea (2.8 ± 1.5 cm shell length) were collected in March 2017 in the Meurthe River at Rosières-aux-Salines (48° 36'05.6" N, 6° 20'31.8"E, France) and *Scrobicularia plana* (2.7 ± 0.2 cm shell length) were collected in May 2017 in the French Atlantic coast in the Bay of Bourgneuf (47°01'47.6"N, 1°59'02.4"W, France). All organisms were hand-collected, transported to the laboratory in plastic coolers and acclimated progressively to the exposure temperature (15°C). Water physico-chemistry measured in the field using ODEON probes (Ponsel, Caudan, France) was pH 7.4, redox 3.6 mV, salinity 0.4 psu, T°C 8 °C, O₂ 10 mg/L for the Meurthe river and pH 7.96, redox 171 mV, salinity 35 psu, T°C 22 °C, O₂ 10 mg/L for the Bay of Bourgneuf. Back to the laboratory, the clams were placed in tanks containing (1) aerated artificial water (TropicMarine®) at 1 and 30 psu for *C. fluminea* and *S. plana* respectively and (2) synthetic sediment (90% sand, 9% kaolin, 1% CaCO₃) adapted from OECD guideline (OECD, 2004), during one week in a temperate room at 15°C. They were fed every 2 days with 1×10^5 cells/ml of *Chlorella sp.* for *C. fluminea* and *Tetraselmis suecica* for *S. plana*. The organisms were placed in each mesocosm units for three days before the beginning of the exposure for their acclimation to the device before being exposed to the contaminants.

2.3. Algae inoculum preparation

Chlorella sp. were cultured as described in Bertrand et al. (2017). Briefly, they were cultured in 10 L flasks filled with 5L of algae growth medium (Lefevre-Czarda) at 20 °C temperate room under a 16:8 (light/dark) photoperiod. The concentration was assessed by counting cells after the exponential phase growth using Mallassez counting chamber. They were concentrated from the culture medium by decantation and injected in mesocosm device to obtain a final concentration of 1×10^5 cells/ml. *Tetraselmis suecica* algae were purchased in F/2 medium by Teramer® (Montpellier, France). The cell counting and the injection were performed as for *Chlorella sp.*

2.4. Experimental design

Two distinct experiments were conducted, one for each of the species. For each experiment, eight experimental units were used, allowing the duplication of four conditions of exposure

(Control, CuO-NOAA, CuO_Acrl_FP, Acrl_FP). Each of the experimental unit was filled with synthetic sediment (90% sand, 9% kaolin, 1% CaCO₃) adapted from OECD guideline (OECD, 2004) and artificial water (TropicMarine®).

For the experiment in freshwaters, the eight experimental units (75 x 20 x 60 cm) were filled with 14 kg of synthetic sediment and 45L of artificial water at 1 psu, continuously circulating thanks to one pump (Ekeim compact 300 L/h), as previously described (See Auffan et al., 2014; Tella et al., 2015; Garaud et al., 2016). Twelve injections of 4.2 µg CuO/L (eg. to 3 per week) were performed in order to obtain a final concentration of 50 µg CuO/L. Algae were added 10 hours after the introduction of the contaminant in order to reduce the putative interferences between NOAA and algae. Physico-chemical parameters including temperature (°C), salinity (psu), pH, redox potential (mV) and dissolved oxygen (mg/L) were monitored during the whole experiment in the water column.

For the experiment in marine water, slight modifications have been made in order to mimic the tidal cycle as described by Buffet et al. (2013). The eight experimental units (75 x 20 x 60 cm) were composed by two tanks (the exposure tank and the reservoir tank), two pumps (Ekeim compact 300 L/h) and mechanical timers (IDK PMTF 16A) allowing the establishment of a tidal cycle (6h low tide, 6h high tide, two tides per day). Each exposure tank was filled with 14 kg of synthetic sediment and 35L of artificial water at 30 psu. The reservoir tank was filled with a minimum of 25L of artificial water at 30 psu allowing the circulation of water between both of the tanks. The sedimentation of the contaminants in the reservoir tank was prevented by the addition of an air diffuser. Despite these precautions, sedimentation occurred in previous experiments in the reservoir tank, leading to a loss of NOAA concentration in the exposure tank (personal data). This loss was anticipated by increasing NOAA concentration compared to the freshwater design. Consequently, twelve injections of 12.5 µg CuO/L (eg. to 3 per week) were performed in order to obtain a final concentration of 150 µg CuO/L. In this experiment, the food was provided at high tides, what reduces the time between the injections of the contaminant and algae compared to freshwater devices. Algae were then added 6 hours after the introduction of the contaminant. Physico-chemical parameters including temperature (°C), salinity (psu), pH, redox potential (mV) and dissolved oxygen (mg/L) were monitored during the whole experiment in the reservoir tank due to the tidal cycle.

For each experiment, the experimental units were stabilized during 3 weeks without organisms before proceeding with the injection of the contaminants. Bivalves were then exposed 3 days without contaminant in the devices (n= 96 par mesocosm). For each experiment, the nominal Cu concentration ($\mu\text{g Cu/L}$) injected was identical for the treatments containing Cu (CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP). The concentration of Acryl_FP injected was equivalent to the CuO_Acryl_FP treatment ($\mu\text{g FP/L}$). Deionized water was injected in uncontaminated (control) devices in order to avoid any potential effects of the mechanical injection.

2.5. Quantification of Cu and Ti in water and sediment

Total Cu concentrations have been measured at day 28 in order to determine the distribution of the added Cu in each compartments (water, sediment, organisms) at the end of the experiment. As the paints tested contained titanium (> 40%, TiO_2 250 nm), it was also quantified in each compartment. The measurement of dissolved Cu and Ti was also performed using amicon 3kDa tubes (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices) in both of the treatments containing CuO NOAA (CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP) in order to assess the dissolved fraction. Three samples of water were collected at 10 cm from the sediments and pooled for Cu and Ti quantification in each condition. An aliquot of this pool was directly taken for centrifugation in Amicon tube (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices). Then, the pool of water and the filtered water were kept at 4°C before being digested (2% HNO_3) and used for quantification of Cu and Ti. Three samples of surficial sediment were collected at 3 mm in depth, pooled and dried, before being digested (5 mL HNO_3 , 5 mL HF and 2 mL HClO_4) and used for quantification of Cu and Ti. All Cu and Ti digestions and quantifications (by inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) were performed by Micropolluants Technologie SA. (Metz, France). Water concentration of Cu and Ti was expressed in $\mu\text{g/L}$ while sediment concentration was in mg/kg DW for each element.

2.6. Quantification of Cu and Ti in clam tissues

The digestive gland of bivalves (n=6 per experimental unit, n=12 per treatment) were dissected at day 28 immediately after the filtration test and placed in an oven at 50°C for 5 days. After the dry weight determination, one mL of HNO_3 was added to the samples. They were then placed at 65°C during 45 h to release total Ce contained in the tissues.

Quantifications of Ce into homogenate were performed by Micropolluants Technologie S.A. (Metz, France) using ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies France). Results were expressed in mg/kg dry weight for each element.

2.7. Mortality and condition index measurements

The inability of bivalves to close their valves after a mechanical stimulus was considered as mortality and this parameter was monitored daily during the whole experiment period.

Individuals of both species were kept before the first injections and after the exposure period to determine the condition index (CI). For the freshwater, clams selected for the bioaccumulation measurement (n=6) were taken at day 0 and those of the burrowing test (n=10 per experimental unit) were taken at day 28. For the seawater, clams used for the filtration test (n=6 at day 0, n=6 per at day 28) were selected. The soft tissues of clams were weighted fresh and dry, just before and after being placed in an oven at 50°C for 5 days. Bivalves CI were calculated following the formula: $CI = (\text{total dry tissue weight} / \text{total dry weight}) \times 100$.

2.8. Filtration rate

The measurement of the filtration rate was performed at both sampling dates (day 14 and day 28). The neutral red assay was performed according to Potet et al. (2016) and adapted for *C. fluminea*. As *S. plana* did not filter in neutral red solution, their filtration rate was assessed using the protocol of Buffet et al. (2011) with slight modifications.

For *C. fluminea*, six individuals of each condition were placed separately in 100 mL of neutral red solution at 4 mg.L⁻¹ in the dark, at 15°C. Beakers containing the neutral red solution after the filtration of bivalves were acidified to pH 5.0 with HCl 37% and well agitated. Twice sampling of 1 mL was performed in each beaker and the 530 nm absorbance was measured. The filtration rates (f) were calculated following the Coughlan (1969) formula: $f = (V / (n \times t)) \times \log (C_0 / C_t)$ with V the total volume of the neutral red solution (100 mL), n the number of individuals (n=6), t the duration (2 hours), C₀ the initial and C_t the final neutral red concentrations in the beakers. Results were expressed in mL.hour⁻¹.

For *S. plana*, six individuals of each condition were placed by two in 400 mL of clean water containing 10⁴ cell.mL⁻¹ of *T. suecica*. After 1 hour, the remaining concentration of algae was measured by flow cytometry and expressed in mL.hour⁻¹. Algae numeration were done on an

Accuri C6 cytometer by using the volumetric based protocol according to the manufacturer. The cytometer was equipped with a 488nm laser and the chlorophyll fluorescence of algae was collected on FL3 filter (670 LP) for events counting.

2.9. Burrowing behavior

The burrowing behavior of both bivalve species was assessed at 28 days in each experiment as described in Bertrand et al. (2016). Briefly, artificial water and sediment were prepared in a 3L crystallizer, one day before the experiment. At day 28, 12 organisms per condition were placed on the sediment in the dark at 15°C. The number of burrowed organisms were determined during 3 hours (every 5 minutes during the first hour, every 10 minutes during the second hour and every 20 minutes during the last hour).

2.10. Biochemical biomarker analysis

At both sampling times (14 & 28 days), six individuals per treatment for each species were dissected and the digestive gland was excised, kept in ice and stored at -80°C until analysis. As *S. plana* is a gonochoric specie, the sex of each individual was determined. Cellular effects have been measured as described by Garaud et al. (2016), Bertrand et al. (2016, 2017) and Koehlé-Divo et al. 2018, using the automated chemistry analyzer Konelab 20 XTi (Thermo Scientific). Briefly, the whole digestive gland of each clam was treated as described in Sroda and Cossu-Leguille (2011). They were first defrosted, weighted and crushed at 4°C in a 50 mM phosphate buffer at pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture at a 8/1 volume/weight ratio for *C. fluminea* and 6/1 for *S. plana*. Then, the mixture was centrifuged at 4°C at 250xg during 5 min and each supernatant was divided into two parts. One part was used for the assay of total protein, lipid peroxidation (LOOH), acid phosphatase (ACP) and electron transport system (ETS) activities. The other part was centrifuged during 20 min at 4°C at 1,000xg and the final supernatant corresponded to the cytosolic fraction. The cytosolic fraction has been used to measure the total protein content, antioxidant and antitoxic responses (superoxide dismutase: SOD, glutathione-S-transferase: GST) and energetic reserves and metabolism (triglycerides: TRI, lactate dehydrogenase: LDH). The SOD activity was assessed using the WST-1 method (Ukeda et al., 1997) adapted to *C. fluminea* and to the spectrophotometer analyzer (paper in preparation).

Six additional individuals per treatment for each species were dissected at both times. A half of the digestive gland was used for NOAA localization (still in process) while the remaining half gland was kept for metallothionein (MT) measurements and was proceeded for storage as previously described for the set of biomarker measurements. The determination of MT has been carried out according to Buffet et al. (2011) by using a differential pulse polarography (DPP) technique.

2.11. Gene expression at mRNA level (*C. fluminea* only)

In this study, we used the same protocol as previously described in Koehlé-divo et al (Koehlé-Divo et al., 2019). Six individuals per treatment (*C. fluminea* only) were dissected after 14 and 28 days, and the digestive gland was excised, rinsed in PBS 1%, sponged on clean absorbent paper and transferred into 1 mL of RNA later that was kept in 4  C during a maximal duration of 1 month. After a manual removal of non-digestive tissue, digestive glands were placed at -80  C until analysis. The total RNA was extracted using an RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer protocol. Contaminating DNA was digested after extraction with DNase I (Sigma Aldrich) and total RNA was purified with RNeasy mini kit. The purity and the quantity of RNA were assessed by optical density measurements (OD 260 nm and OD ratio 260/280 and 260/230). The integrity of RNA was investigated using Bioanalyseur 2100 (Agilent, CA, USA).

The RT-qPCR was then performed on 17 genes and the sequences used are listed in Supporting data Table S1. The primers were designed using Primer3Plus. According to the manufacturer's instructions, the cDNA was synthesized in a final volume of 20   L using 1   g of RNA, 2.5   M of random hexamer primers and SuperScript   III reverse transcriptase. The qPCR reaction was performed as in Koehlé-Divo et al. (2019). As a template, 45 ng of cDNA, water (no template control) or total RNA (45 ng/reaction; no RT control) were used, from 200 to 300 nM of primers (see table S1) and Fast SYBR   green master mix (Applied Biosystem  , CA, USA) in a reaction mixture with a final volume of 20   L. The cycling conditions were 20 s at 95  C, followed by 40 cycles of 3 s at 95  C and 30 s at 60  C. The melting curve was used to check the specificity of the amplicon. All PCR amplifications were performed on each biological replicate using the StepOnePlus RT-PCR system (Applied Biosystems  ). Gene expression levels were analyzed using the relative quantification method ($\Delta\Delta C_t$) (Livak & Schmittgen., 2001). Two genes were selected as normalizing genes (S3 and β -actin) and the control condition was chosen as the

reference condition. The final treated/control ratio and the pooled standard deviation were calculated based on the mean ΔC_t of the biological replicates.

2.12. Statistical analyses

All the statistical analyses have been conducted using R (R Core Team, 2014). For the filtration rates and the bioaccumulation data, the homoscedasticity was checked by Levene test and the normality by Shapiro test. As the conditions were confirmed, these data were then analyzed using a one-way anova test in order to highlight the effects of the contamination on the bioaccumulation, and using a two-ways anova test in order to highlight both the effects of contamination and time for the filtration rates. The kinetic of burrowed individuals over time was determined using generalized nonlinear model based on raw data according to Buffet et al. (2014). The biochemical effects were checked using the Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA). Because it was impossible to measure all the battery on the same digestive gland, we plotted the average value of each group. The correlation only showed the variables (*i.e.* biochemical markers) with a Variable Importance in Projection (VIP) score above 0.8. For the additional gene expression dataset in *C. fluminea*, we first performed a manova-multivariate ANOVA in order to assess if significant differences could be determined according to the tested factors at each time. A PLS-DA was then performed for each date (day 14 and 28). The correlation circle only showed the variables (*i.e.* gene expressions) with a VIP score above 0.8. Finally, Hotelling T^2 tests were conducted on the PLS-DA results in order to explore more deeply the differences between the exposure conditions.

3. Results

3.1. Water physico-chemistry

In freshwater experiment, the main physico-chemical parameters were: pH 7.8 ± 0.2 ; salinity 1.04 ± 0.01 psu; redox potential 243.4 ± 26.6 mV; oxygen concentration 10.2 ± 0.7 mg/L; temperature 14.2 ± 0.1 °C. In seawater experiment, they were: pH 8.2 ± 0.1 ; salinity 34.36 ± 0.32 psu; redox potential 169.6 ± 46.8 mV; oxygen concentration 10.5 ± 0.7 mg/L; temperature 14.0 ± 0.6 °C.

3.2. Quantification of Cu and Ti in water and sediment

The total Cu concentration in freshwater was below the detection limit (< 2.5 µg/L) for all the conditions except for CuO-NOAA. Under this experimental condition the metal concentration

reached $3.33 \pm 0.9 \mu\text{g Cu/L}$ (fig.1), corresponding to less than 10% of the nominal final concentration. No dissolved Cu was measured (below the detection limit; see supplementary material fig. S1). The total Ti concentration in water was similar in each exposure condition. Higher Cu concentrations were measured in the surficial sediments in experimental condition of exposure containing Cu compared to the control, with $17.9 \pm 11.2 \text{ mg Cu/kg}$ and $12.9 \pm 1.3 \text{ mg Cu/kg}$ for CuO-NOAA and CuO_Acrl_FP respectively. In sediments, the Ti was 1.5 times higher in both paint treatments (Acrl_FP & CuO_Acrl_FP) than in control and CuO-NOAA treatments.

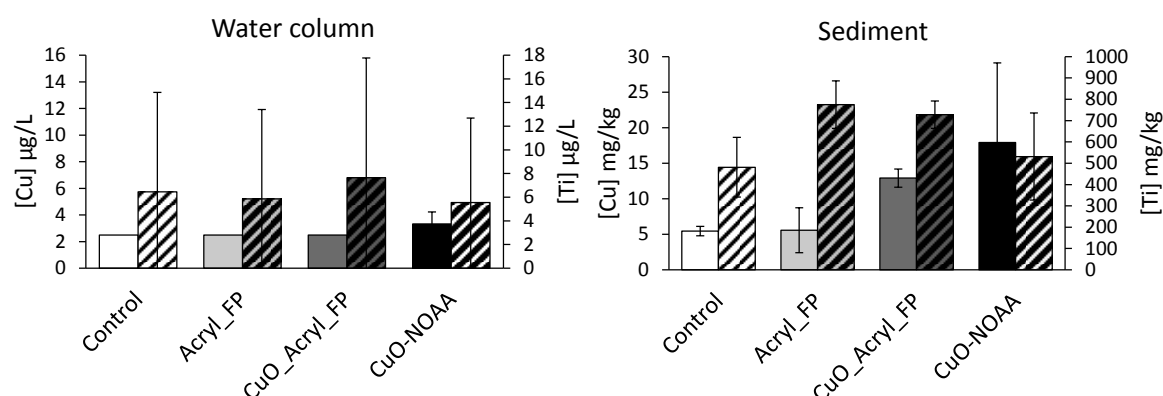


Figure 1: Concentrations (n=2) of copper (whole bars) and titanium (hatched bars) in the water column (left side) and in the surficial sediment (right side) of the freshwater mesocosms after 28 days of contamination by pulse. Results without error bars are below the quantification limit ($2.5 \mu\text{g/L}$).

For the experiment in marine water, the total Cu concentration in water was about $9.4 \pm 4.8 \mu\text{g Cu/L}$ in CuO-NOAA with $6.2 \pm 5.2 \mu\text{g Cu/L}$ present as dissolved copper (see supplementary material Fig. S1), while in CuO_Acrl_FP condition, the copper concentration (ionic and particulate) was below the quantification limit ($5 \mu\text{g/L}$). In water, the Ti content was similar in each exposure condition. Lower than the freshwater ones, Cu concentrations were also measured in marine surficial sediments in conditions containing copper, with $7.6 \pm 3.9 \text{ mg Cu/kg}$ and $4.5 \pm 2.5 \text{ mg Cu/kg}$ for CuO-NOAA and CuO_Acrl_FP respectively. Control and Acrl_FP conditions were below 2.5 mg Cu/kg . In sediments, no significant differences were observed concerning the Ti concentrations either or not the formulation contains Ti.

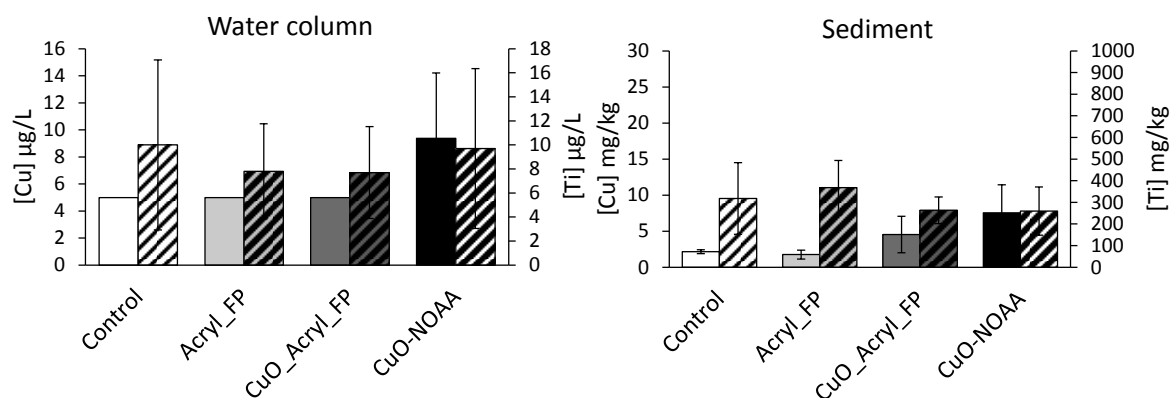


Figure 2: Concentrations (n=2) of copper (whole bars) and titanium (hatched bars) in the water column (left side) and in the surficial sediments (right side) of the marine mesocosms after 28 days of contamination by pulse. Results without error bars are below the quantification limit (5 µg/L).

3.3. Quantification of Cu and Ti in clam tissues

C. fluminea did not show any significant accumulation of copper whatever the conditions, with concentrations around 150 mg Cu/kg (Fig. 3, left part). The control group showed high individual variations in Cu content with concentrations ranging from 64 to 336 mg Cu/kg. The Ti contents were higher in the clams exposed to both formulations containing Ti but significantly different only in the organisms under Acryl_FP condition (46.5 ± 20.9 mg Ti/kg) compared to controls (22.6 ± 8.7 Ti/kg).

S. plana exposed to the CuO-NOAA condition accumulated almost twice as much Cu (36.3 ± 11.1 mg Cu/kg) as the control (20.1 ± 6.9 mg Cu/kg). The Acryl_FP and CuO_Acryl_FP treatments were not significantly different from the control. No significant difference in the accumulation of Ti was found between the different conditions for *S. plana*.

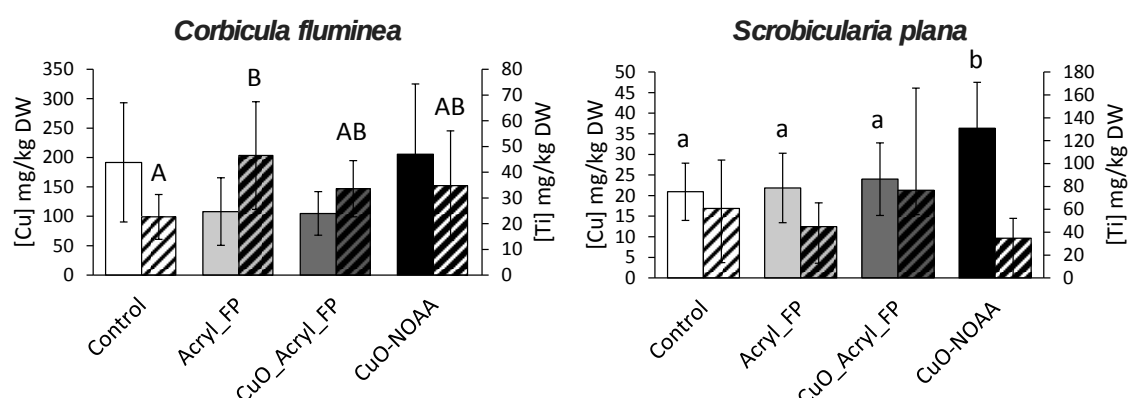


Figure 3: Concentrations (n=8) of copper (whole bars) and titanium (hatched bars) in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (left side) and in the marine bivalve *Scrobicularia plana* (right side) after 28 days of exposure. Group showing different letters for Cu (lowercase) and Ti (capital) measurements are significantly different ($p < 0.05$).

3.4. Mortality and CI measurements

After 28 days of exposure, less than 3% of *C. fluminea* individuals and less than 1% of *S. plana* individuals have died. The CI remained stable during the time-course of the experiment in both species (see supplementary material fig. S2).

3.5. Burrowing behavior

The burrowing behavior of *C. fluminea* is illustrated in fig.4 (left side). The control and Acryl_FP groups showed almost no burrowing with approximately 10% of burrowed organisms after 3 hours. Both groups exposed to NOAA forms (CuO_NOAA and CuO_Acryl_FP) showed a higher burrowing than the others with almost 50% of burrowed organisms. The burrowing behavior of *S. plana* is shown in fig.4 (right side). A half of the organisms was burrowed in control, CuO_NOAA and Acryl_FP conditions while the CuO_Acryl_FP exposed organisms were all burrowed after 3 hours.

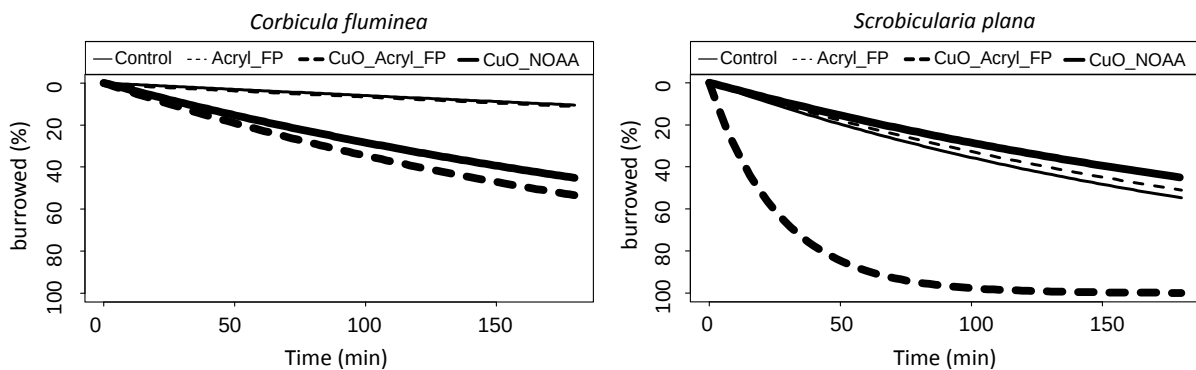


Figure 4: Burrowing behavior (n=12) of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (left side) and of the marine bivalve *Scrobicularia plana* (right side) after 28 days of exposure.

3.6. Filtration rate

For *C. fluminea*, no significant effect of exposure was measured whatever its duration was (fig. 5, left). However all exposed groups (CuO-NOAA, Acryl_FP and CuO_Acryl_FP) tended to filter more compared to controls at the end of the experimental period. The filtration rate of the CuO_Acryl_FP exposed organisms was significantly higher at 28 days compared to 14 days. No significant differences were recorded for *S. plana* (fig. 5 right), neither over time, nor between exposure conditions.

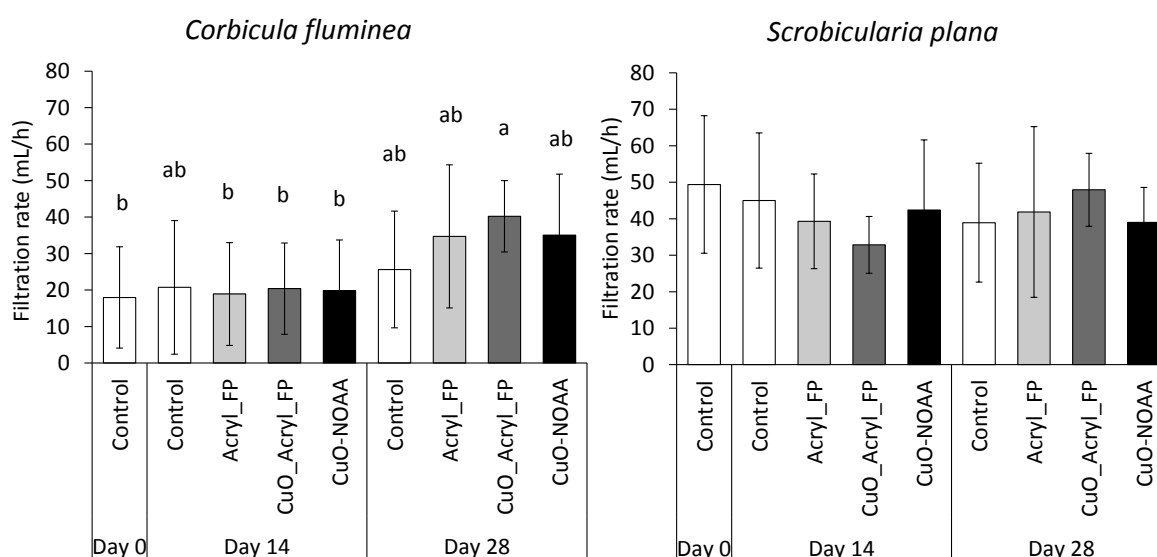


Figure 5: Filtration rate (n=6) of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (left side) and of the marine bivalve *Scrobicularia plana* (right side) after 28 days of exposure. Groups showing different letters are significantly different ($p < 0.05$). No significant differences were observed for the marine bivalve *Scrobicularia plana*.

3.7. Biochemical biomarkers

The PLS-DA analysis presenting the results of the biochemical markers measured in *C. fluminea* is presented in fig 6 (left side). All the biomarker of the battery deployed in this study correspond to the important markers ($VIP > 0.8$) involved in the discrimination of the different groups were related to oxidative stress (SOD), detoxification mechanism (MT, GST, and ACP), energetic reserves (TRI) and metabolism (LDH). At day 14, all exposed groups displayed higher values of MT, GST and LDH than the control. At day 28, the Acryl_FP condition was close to the control while both treatments containing CuO NP (CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP) presented lower values for ACP and SOD but higher ones for MT and TRI contents.

For *S. plana*, all the measured biomarkers also appeared useful to discriminate the experimental groups with MT and LDH presented the higher values (Fig. 6, right side) as for *C. fluminea*. Both control groups from the two sampling times were relatively close in the factorial plane. At day 14, the Acryl_FP condition was close to the control while both treatments containing NP (CuO_NOAA and CuO_Acryl_FP) presented higher values of MT and LDH. At Day 28, all exposed groups presented higher values of MT, LDH, SOD, ACP and GST, but lesser values of ETS and TRI than the control organisms. Both Acryl_FP conditions (Acryl_FP and CuO_Acryl_FP) were more apart from the control than CuO-NOAA.

The most important marker involved in the discrimination between the contaminations was the MT for each PLS-DA (VIP > 1.3). This is coherent with the individual data that showed significant differences in MT content in both CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP treatments at 14 days for both species while only an upward trend at 28 days (see supplementary material table SII).

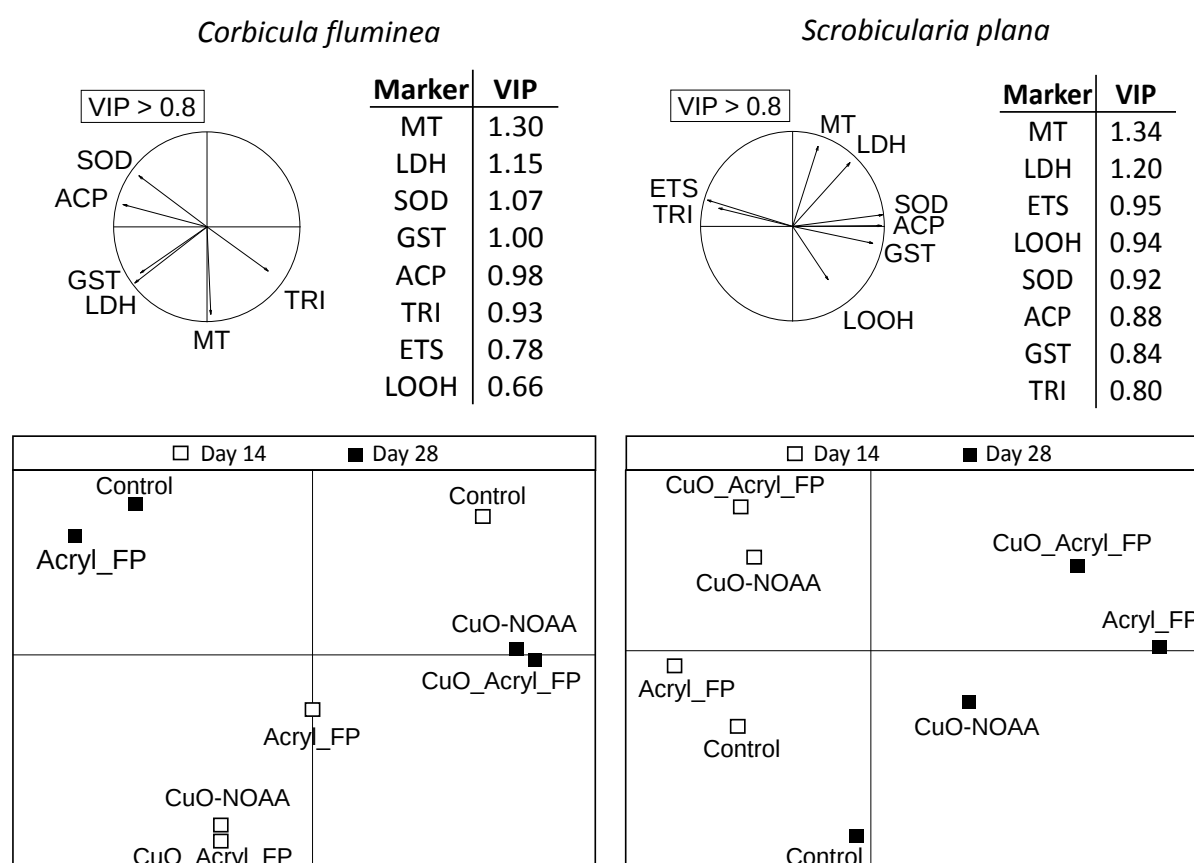


Figure 6: PLS-DA of the biomarkers responses in *Corbicula fluminea* (left side) and *Scrobicularia plana* (right side) exposed for 14 and 28 days. The factorial planes represent the exposure groups at day 14 (black square) and at day 28 (white square). The correlation circles represent the variables explaining each model (eg. biomarkers) with a VIP > 0.8 while the tables represent their weight.

3.8. Gene expression

At day 14 (fig.7, left side), the manova indicated a significant effect of the conditions tested ($F = 9.26_{-74 \text{ df}}$, $p < 0.001$). The hoteling T^2 test was in accordance with manova's results and showed significant differences between all groups except for Acryl_FP compared with CuO_Acryl_FP. The 8 most important gene expressions (VIP > 0.8) among the 15 measured gene expressions involved in the discrimination of the different groups were related to oxidative stress (CuZnSOD, CAT, Se-GPx, Trxr) and detoxification mechanisms (MT, GSTpi,

MRP1, Pgp). All exposed organisms presented more transcripts for MRP1, Pgp and Trxr than the control. Both treatments containing CuO-NOAA presented also more transcripts for GSTpi, MT and CuZnSOD compared to the control. In the Acryl_FP condition, Se-GPx and CAT expression was lower than in the control and both CuO_NOAA conditions.

At day 28 (fig.7, right side), the manova also indicated a significant effect of the conditions tested ($F= 5.3_{6-72 \text{ df}}$, $p < 0.001$). The pairwise comparisons were in accordance with the manova's results and showed significant differences between each group except between CuO-NOAA and both paint forms. The 9 most important gene expressions ($VIP > 0.8$) involved in the discrimination of the different groups were related to oxidative stress (MnSOD, CuZnSOD, CAT, Se-GPx), detoxification mechanisms (GSTpi, MRP1, HSP90), autophagy (GABARAP) and apoptosis (BCL2). The organisms exposed to the three conditions (CuO-NOAA, Acryl_FP & CuO_Acryl_FP) presented gene expressions different from those of the control. Both Acryl_FP and CuO-NOAA conditions presented more transcripts of MnSOD, GABARAP and BCL2 than the control group. The CuO_Acryl_FP condition had a level of expression for all the monitored genes lower than the control and Acryl_FP groups.

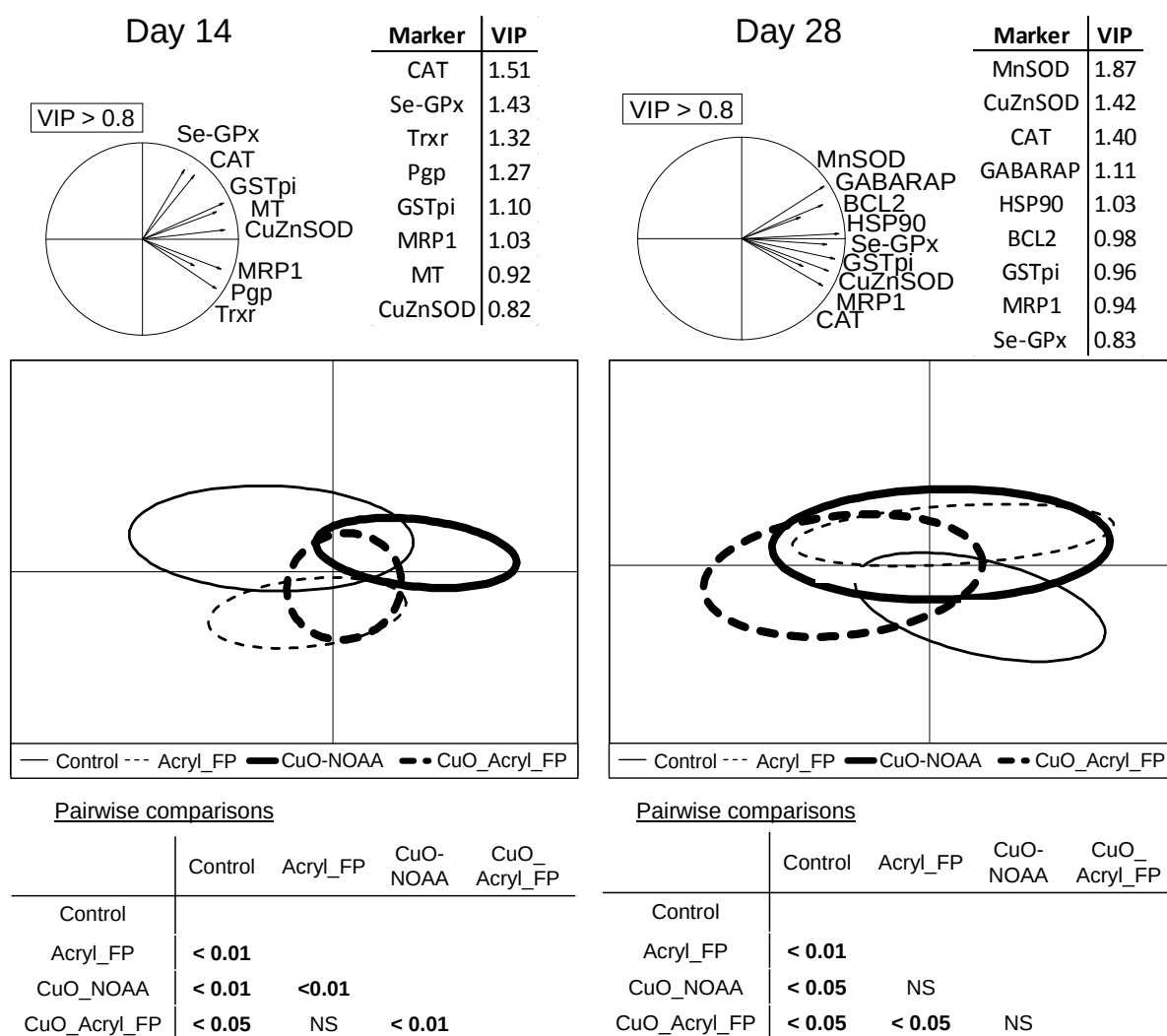


Figure 7: PLS-DA of the gene expressions (RT-qPCR) in *Corbicula fluminea* exposed for 14 and 28 days. The factorial planes represent the exposure groups at day 14 (left side) and at day 28 (right side). The correlation circle represents the variables explaining each model (eg. gene expressions) with a VIP > 0.8 and the table beside each correlation circle represent their weight. The tables below the factorial planes shows the results of the pairwise comparisons for each PLS-DA models.

4. Discussion

Among the huge amount of literature published on nanoecotoxicology, this study brings original data on less studied NOAA and their different stages all along their life-cycle under two environmental aquatic conditions. The general aim of this study was to assess particularly the potential effects caused by several CuO-NOAA under different forms mimicking different step of their life cycle on non-target organisms living in fresh- and marine- water continuum. The first objective was to determine the fate of the different NOAA under two salinities and physico-chemical conditions relevant for both aquatic ecosystems (1.5 and 30 psu). Then, integrated ecotoxicological impacts were evaluated on two endobenthic freshwater and marine bivalve species, *C. fluminea* and *S. plana*, after studying bioaccumulation and cellular localization of metals composing the CuO-NOAA in order to correlate the exposure and potential biological responses.

4.1. Distribution of Cu and Ti in the mesocosm device

In order to have a view of the distribution of the contaminants inside the experimental mesocosm device, both Cu and Ti were measured in the water column and in the surficial sediment.

In the water column contaminated with CuO-NOAA, the remaining Cu represented less than 10% of the nominal concentrations at 28 days for both tested salinities, suggesting that a great part of the initial Cu may have reached the sediment (see below). Concerning freshwaters, the same behavior has been observed previously by Auffan et al. (2018). They have recovered 10% of Cu from CuO-NOAA and less than 1% of Cu from CuO_Acryl_FP in the water column after 28 days. Based on this results, authors estimated that at least 90% of Cu for both treatments settled down at the surficial sediments. In the water of the marine experimental units, our results showed that 66% of the remaining Cu was dissolved, highlighting a marked effect of salinity on the dissolution rate of the tested CuO-NOAA, whereas no dissolution occurred in the freshwater experimental units. A strong effect of salinity on the release of dissolved Cu from CuO-NOAA was also reported in other studies (Peng et al., 2017; Adeleye et al., 2014), supporting our observations. However only the pristine form of CuO-NOAA was affected by the salinity. Indeed, Cu was not detected at significant concentrations in the water column contaminated with CuO_Acryl_FP. This result was in accordance with Auffan et al. (2018) findings and could be due to the CuO-NOAA incorporation in the acrylic paint matrix, what

could reduce their interactions with the environment (dissolution, complexation) compared to their pristine form. Consequently, this distinct behavior of both Cu-NOAA forms indicates a lifetime in the water column longer for the pristine form than for the CuO_Acryl_FP.

In the surficial sediments, both of the measured elements (Cu and Ti) were recovered in large quantities, supporting the reported sedimentation of nanomaterials (Keller et al., 2017; Baker et al., 2014, Garner and Keller, 2014) and fragmented paints (Jones, 2007) in the aquatic compartment. However, the concentrations of both elements (Cu and Ti) measured in the sediments was two times higher in the freshwater system than in the seawater one, even though the injected concentration was three times lower. Regarding the initial concentrations and the absence of remaining Cu and Ti in the water, it may be surprising that so few Cu and Ti was measured in the sediment of the seawater system. The presence of a reservoir tank for the tidal cycle, where particles could have also sedimented could be one of the explanations. The deeper burrowing and the longer siphons of *S. plana* could have also contributed to these differences by leading to a higher mixing of the surficial sediment. These observations indicated that even though the exposure was weak or even negligible through the water column, the organisms were actually exposed through the sediment.

4.2. Bioaccumulation of Cu and Ti

The digestive gland was targeted because of its ability to accumulate contaminants of diverse nature and because of its role in detoxification processes (Faggio et al., 2018; Rocha et al., 2015). The measured bioaccumulations may be strongly explained both by the fate of the contaminants inside the devices and by the sensitivities of the studied species for each contaminant. Indeed, the highest concentration of Cu from CuO-NOAA measured in the water column in the marine mesocosm could be responsible for the accumulation of Cu in *S. plana*, whereas the concentration in the freshwater one was three times lower and did not conducted to Cu bioaccumulation in *C. fluminea*. The dissolved Cu was the main form measured in the seawater and may also contribute to this explanation since the bioavailability is different between the nanoparticulate and the dissolved forms. Finally, the Cu bioaccumulated by *S. plana* in the CuO-NOAA treatment can come from both the water and the sediments and could result from the exposure to both NOAA and/or dissolved forms. For *C. fluminea*, the absence of bioaccumulation is probably not only due to the concentration or to the physico-chemistry of the CuO-NOAA, but also to the life traits of these organisms.

Indeed, the high content and variability of Cu measured from the beginning (site population) to the end of the experiment (28 days) could indicate that these organisms were already coping with Cu in the natural environment and could perhaps explain the absence of bioaccumulation for this element. On the other hand, *C. fluminea* was able to bioaccumulate Ti directly from the sediments since the exposure concentration in the water column did not differed. No such accumulation was measured in *S. plana* but can be due to the weak presence of Ti in the marine sediments compared to the freshwater ones. In addition, the presence of Cu inside the FP seemed to reduce the bioavailability of Ti in *C. fluminea*. It is not clear if this differences were due to the physico-chemical modifications occurring in the paint formulation or to the sensitivity of the species that can cope with the contamination (through burrowing for example).

4.3. Behavioral effects on clams

As the measurement of organism behavior may provide a better understanding of the environmental consequences such as the effects at the population level (Amiard-Triquet, 2009), behavioral tests were performed in this study. Bivalves generally responded to contaminations by decreasing their burrowing rate, which was related to a higher vulnerability to predators (Buffet et al., 2011; 2013; Bertrand et al., 2016; Bonnard et al., 2009). Even though the weak burrowing of control bivalves of both species was quite surprising in this study, the burrowing behavior has been rather coherent with the bioaccumulation measurements. In *C. fluminea*, the weak burrowing led to a higher bioaccumulation of Ti from Acryl_FP while no bioaccumulation occurred when the burrowing increased, such as in the CuO_Acryl_FP treatment. A close observation was done on *S. plana* that bioaccumulated Cu only from the condition where no more burrowing compared to the control was measured. The highest burrowing behavior could then have protected both species by reducing the bioaccumulated metal content whereas the bivalves that burrowed less were more exposed to the contaminated media. On the other hand, the filtration rate tended to be affected by CuO_Acryl_FP at day 28 for each species. This is coherent with the measured burrowing behaviors since both species have been buried when exposed to the CuO_Acryl_FP treatment. However, the high variability obtained for each treatment did not allowed to depict a clear effect on the filtration rate for any treatment. These results shows anyway that the exposure to CuO-NOAA from different sources (pristine or incorporated in a product) led to a different

fate of the contaminants and to distinct behavioral responses, which consequently affected the exposure of bivalve species.

4.4. Biochemical effects on clams

The use of multi-biomarker approach was recommended for a more complete assessment of toxicological effects and environmental relevance (Moore et al., 2004) and was useful in the assessment of NOAA effects on aquatic species (Garaud et al., 2015; Bertrand et al., 2016; 2017; Buffet et al., 2011; 2013). Such an approach was used in this study and indicated that the metallothionein (MT) content and LDH activity had a fundamental role since they were the two most impacted biomarkers for both species. MTs have a predominant role on metabolism and bioavailability of essential metals (Cu, Zn...) and is induced for detoxification processes against metallic compounds and oxidative stress (Bigot et al., 2009; Amiard et al., 2006). LDH have a fundamental role in the anaerobic metabolism and its increase in activity is particularly important when a considerable amount of energy is rapidly required, as it may occur in a situation of stress (Diamantino et al., 2001). These results suggested that even in the absence of measurable dissolved copper in the water column, the exposed organisms detected the Cu and triggered defense processes at both salinities.

At day 14, all the treatments tended to induce responses different from controls with more pronounced changes for CuO_NOAA and CuO_Acryl_FP. In both species, a significantly higher amount of MT was measured in both of these treatments. MT induction was already reported after Cu exposures (NOAA and Cu²⁺) in other studies (Buffet et al., 2011; 2013; Gomes et al., 2012). A slight increase was also observed in the Acryl_FP treatment but may be explained by the matrix composition (0.5% biocides, 43% TiO₂...). The increasing activity of LDH in both species indicated interferences with the metabolism since LDH acts in anaerobic conditions (environmental and physiological). As the oxygen content remained stable (10.2 ± 0.7 mg O₂ /L) throughout the whole duration of the experiment and the filtration rate did not significantly differed, its solicitation should have contributed to give additional energy to counter a toxic stress (Moreira et al., 2006). The additional activity of the GST by *C. fluminea* provided a complementary response for detoxification. This enzyme acts in the excretion process of conjugated compounds out of the cell. Thus, at day 14, both species (*C. fluminea* and *S. plana*) tended to fight against the contaminant by increasing detoxification processes without requiring anti-oxidant defenses for preventing damages.

At day 28 for *C. fluminea*, the responses measured in clams exposed to both CuO NOAA treatments (CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP) remained similar and distant from the control. On the contrary, the ones measured for the Acryl_FP treatment returned close to those of the control. These results suggest a transient effect of the Acryl_FP treatment but a more persistent one for both conditions containing CuO NOAA (CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP). In that case, the fragmented paint containing the CuO NOAA (CuO_Acryl_FP) involved relatively similar biochemical effects than the bulk form of NOAA (CuO-NOAA). For those two treatments, MT content was still high but less than at day 14. MT associated with copper could be sequestered by the lysosomal compartment (Amiard et al., 2006). Thus, the inhibitory effect observed on the lysosomal biomarker (ACP) could be related to the sequestration of copper in lysosomes. The increase of triglycerides content monitored in the present study could also be related to lysosomal perturbations since lipid droplets are degraded by lysosomal lipases. Abnormal accumulation of fatty acid was already reported after Cu exposure (Chen et al., 2016; Chen et al., 2013; Song et al., 2013), highlighting this possibility.

At day 28 for *S. plana*, the CuO-NOAA affected the biochemical markers to the same extent than at day 14. Both fragmented paint treatments (Acryl_FP and CuO_Acryl_FP) involved similar response pattern and were the most differing conditions from control. In that case, both the CuO-NOAA and the fragmented paint (Acryl_FP) forms have affected the exposed clams. The incorporation of CuO NOAA inside the paint (CuO_Acryl_FP) seems to accentuate the effects. Regarding the involved responses, the presence of all contaminants increased cytoplasmic responses for detoxification processes (MT, GST, SOD). Alterations in lysosomal compartment (ACP) and energetic metabolism (LDH) also occurred. For both species, the involved detoxification processes could reflect the beginning of a toxic response. However, as no damage (LOOH) was measured, the cellular machinery seemed sufficient at this time to prevent deleterious effects. Finally, the global vision provided by the PLS-DA analyses showed that both CuO treatments induced quite similar response in *C. fluminea*. In *S. plana*, the responses to both treatments were close at 14 days but differed at 28 days, indicating different effects over time in the marine clam. Nevertheless, for both of these species, the CuO_Acryl_FP treatment had the greatest impact on their biochemical responses at each date.

In the literature, the increase of antioxidant activities (SOD, CAT, GPx) and detoxification processes (GST, MT), but also the alteration of the lysosomes and the genotoxicity were observed for the nanoparticulate and the dissolved forms of Cu in bivalve species (CuO NOAA:

Buffet et al., 2011, 2013; Gomes et al., 2012, 2013 ; Chelomin et al., 2017; Cu²⁺: Buffet et al., 2011, 2012; Bonnail et al., 2016, Bigot et al., 2011). Thereby, the measured effects in this study could be associated to the two forms of Cu, both in the CuO-NOAA and in the CuO_Acryl_FP treatments, since the dissolution should not only occurs in the exposure media but also in the biological interfaces. On the other hand, the alteration of these biological pathways seems to constitute a quite common response during a metallic contamination, since these pathways were often altered by other metallic NOAA (Ag: Buffet et al., 2013, 2014; Bertrand et al., 2016; Au: Pan et al., 2012;; ZnO: Buffet et al., 2012; CeO₂: Garaud et al., 2016; Koehlé-Divo et al., 2018...) and by dissolved metals (Ag: Buffet et al., 2014; Cd: Desouky et al., 2012...). Finally, the treatment inducing the highest effects (CuO_Acryl_FP) could highlight additive responses despite the absence of bioaccumulation measured. Thus, even though the CuO NOAA in the FP will be less bio-physically-chemically transformed compared to the pristine form (Auffan et al., 2018), its interactions with the FP content (acrylic, TiO₂, biocide...) should also lead to different bioavailability and effects, that could be responsible for this stronger responses which should then be more thoroughly studied.

4.5. Molecular effects on *C. fluminea*

Considering the sensitivity and the precocity of molecular parameters, the monitoring of molecular disturbances may help to gain in comprehension about the mechanistic events. Thus, a complementary analysis was performed on *C. fluminea* by monitoring the expression of 15 genes of interest at both sampling dates. The molecular approach was not implemented in *S. plana* due to the scarcity of gene sequences for this species. Gene expressions were significantly impacted by all the contaminants at each exposure date. At day 14, all the treatments induced a higher mRNA content of Trxr, which is mainly related to the antioxidant system. The increased expression of genes involved in excretion pathways (MRP1, Pgp) is linked to the elimination of endogenous and exogenous toxicants (Achard et al., 2004; Navarro et al., 2012). The higher expression of MT, GSTpi and CuZnSOD mRNAs, mainly for CuO-NOAA and CuO_Acryl_FP, suggested the need of detoxification mechanisms. Both paint forms also affected antioxidant related expressions (CAT, Se-GPx) what can reflect the need of the antioxidant machinery. At Day 28, the MT gene expression is not anymore a part of the VIP as it is at the biochemical level. Both mRNA and proteins can have different time scale of presence linked to the molecular stability and to post-translational regulations, what can

explain these differences. The increase expression of MnSOD by Acryl_FP suggested impacts on mitochondria while the higher Gabarap expression could reflect the induction of autophagy (Zhang et al., 2014). Moreover, changes of both Bcl2 and Gabarap expressions could highlight apoptotic responses (Zhang et al., 2014; Chen et al., 2000). Zhao et al., (2009) showed the induction of apoptosis through the mitochondria mediated pathway in epidermal mouse cells (JB6) exposed to TiO₂ NOAA (≈ 35 nm) and to TiO₂ particles (≈ 1 μ m). TiO₂ NOAA also affected gene expressions associated to the regulation of cell death in zebrafish (Park and Yeo, 2013). In our study, the TiO₂ present in the FP was not in the nanoparticulate form (250 nm) but its presence and concentration could perhaps have led to these effects. Furthermore, *C. fluminea* exposed to the CuO-NOAA treatment had a similar molecular response than those exposed to Acryl_FP. Cu-based-NOAA were also reported to induce apoptosis through the mitochondrial pathway in fish (Wang et al., 2019) and such a response was also suggested for another bivalve, *Mytilus galloprovincialis* (Gomes et al., 2014). Finally, this mechanism is not solely associated to metallic NOAA but rather to the substances being able to alter the mitochondrial functioning. The present results will thus highlight the alteration of the mitochondrial functions by both the Acryl_FP and the CuO-NOAA treatments. Furthermore, the presence of Cu in the paint formulation (CuO_Acryl_FP) often led to stronger effects at the individual and the cellular biological scales, and had strong effects at the molecular one by decreasing the expression of all the monitored genes. Such a decrease in gene expressions could highlight an inefficiency of the detoxification mechanism and lead to further deleterious effects (Doyen et al., 2015). Moreover, other authors showed higher damages in zebrafish exposed to Cu-doped TiO₂ NOAA than exposed to the TiO₂ NOAA alone (Yeo and Park, 2012). These observations suggests then that the inclusion of CuO-NOAA inside the paint formulation affects the resulting toxicity, leading to stronger and worrying effects than the pristine form of NOAA. Even though we did not observed any damages through the biochemical biomarker measurements in this study, such an observation should be done over a longer period of time.

5. Conclusion

In this study, the combination of the distribution measurements and the multilevel monitoring of effects provided useful tools to assess the effects of contaminants. Measurements in the mesocosm device confirmed the exposure of benthic organisms to NOAA and paint fragments while the bioaccumulation potential differed according to the species. The salinity influenced

the pristine NOAA dissolution rate in seawater without affecting the paint form. Results indicated marked effects of CuO_Acrl_FP in the burrowing behavior and at the biochemical level in both bivalves while Acrl_FP did not have so marked effects. The incorporation of CuO-NOAA inside the paint had thus additional effects compared to the formulation without CuO-NOAA. The monitored effects were not easily related to the accumulation of the measured elements in both species. At day 14, MT content presented an important role in both CuO NOAA treatments (CuO-NOAA and CuO_Acrl_FP) and its role for detoxification, coupled with the slight modifications of biomarkers of defense (GST) and energetic metabolism (LDH), may have contributed to prevent lipid peroxidation. In both CuO treatments at 28 days, *S. plana* seemed to go through toxic and oxidative stress while *C. fluminea* lysosomal functions seemed compromised. The additional molecular assessment performed on *C. fluminea* proved was rather sensitive and allowed the differentiation of all exposed groups from controls. Molecular results were consistent with the biochemical ones and showed gene expressions involved in detoxification at day 14 while energetic, autophagic and/or apoptotic pathways were affected at day 28. Both clams involved fewer responses at the first sampling date compared to the last, potentially highlighting the need of more defenses to deal with the contamination after these 28 days.

Finally, worrying effects were observed by using complex exposure scenarios to relatively low concentrations whatever the salinity was. Both *C. fluminea* and *S. plana* were affected by the different treatments despite the weak proportion of the contaminants in the water column. This underlines very well the relevance of our approach using both water and sediment through mesocosm devices to better integrate all routes of exposure. In addition, the inclusion of CuO-NOAA in paint formulation induced different effects from its pristine form. This study highlighted then the need to perform exposures closer to the environmental realism in terms of concentrations, complexity and NOAA forms. The use of a multilevel monitoring including behavioral, biochemical and molecular scales appeared particularly relevant to assess such effects.

Acknowledgements

Financial supports were provided by the French National Agency (ANR-3-CESA-0014/NANOSALT project) and CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21 (ANR- 10-LABX-21-01,

Strategic metal resources of the 21st century). The authors gratefully acknowledge CNRS for funding the iCEINT International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology. KOEHLE-DIVO Vanessa received financial support for salary from French Research ministry. The authors gratefully acknowledge Justine Flayac and Danièle Pauly for technical help and Sharon Kruger for her English corrections.

References

Achard, M., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.014>

Adam, N., Schmitt, C., De Bruyn, L., Knapen, D., Blust, R., 2015. Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. *Science of The Total Environment* 526, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.064>

Adeleye, A.S., Conway, J.R., Perez, T., Rutten, P., Keller, A.A., 2014. Influence of Extracellular Polymeric Substances on the Long-Term Fate, Dissolution, and Speciation of Copper-Based Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 48, 12561–12568. <https://doi.org/10.1021/es5033426>

Adeleye, A.S., Oranu, E.A., Tao, M., Keller, A.A., 2016. Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint. *Water Research* 102, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.056>

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. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>

Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>

Auffan, M., Liu, W., Brousset, L., Scifo, L., Pariat, A., Sanles, M., Chaurand, P., Angeletti, B., Thiéry, A., Masion, A., Rose, J., 2018. Environmental exposure of a simulated pond ecosystem to a CuO nanoparticle-based wood stain throughout its life cycle. *Environmental Science: Nano*. <https://doi.org/10.1039/C8EN00712H>

Auffan, M., Tella, M., Liu, W., Pariat, A., Cabié, M., Borschneck, D., Angeletti, B., Landrot, G., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Rose, J., 2017. Structural and physical–chemical behavior of a CeO₂ nanoparticle based diesel additive during combustion and environmental release. *Environ. Sci.: Nano* 4, 1974–1980. <https://doi.org/10.1039/C7EN00494J>

Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2015.

An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep05608>

Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 186, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>

Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators* 74, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>

Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giambérini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*: Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 2550–2561. <https://doi.org/10.1002/etc.3428>

Bigot, A., Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F., 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.014>

Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2011. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology* 26, 623–632. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>

Bonnard, M., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of Copper on the Burrowing Behavior of Estuarine and Coastal Invertebrates, the Polychaete *Nereis diversicolor* and the Bivalve *Scrobicularia plana*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 11–26. <https://doi.org/10.1080/10807030802614934>

Buffet, P.-E., Amiard-Triquet, C., Dybowska, A., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>

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*). *Environmental Science & Technology* 130110104824003. <https://doi.org/10.1021/es303513r>

Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-

- Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>
- 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., 2014a. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Science of The Total Environment* 470–471, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.114>
- Buffet, P.-E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014b. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Science of The Total Environment* 470–471, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.114>
- Chelomin, V.P., Slobodskova, V.V., Zakhartsev, M., Kukla, S., 2017. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus*. *Journal of Ocean University of China* 16, 339–345. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3133-y>
- Chen, F., Luo, Z., Chen, G.-H., Shi, X., Liu, X., Song, Y.-F., Pan, Y.-X., 2016. Effects of waterborne Cu exposure on intestinal copper transport and lipid metabolism of *Synechogobius hasta*. *Aquatic Toxicology* 178, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.001>
- Chen, Q., Gong, B., Almasan, A., 2000. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 227–233. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400629>
- Chen, Q.-L., Luo, Z., Liu, X., Song, Y.-F., Liu, C.-X., Zheng, J.-L., Zhao, Y.-H., 2013. Effects of Waterborne Chronic Copper Exposure on Hepatic Lipid Metabolism and Metal-Element Composition in *Synechogobius hasta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 301–315. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9835-7>
- Conway, J.R., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2014. Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environmental Science & Technology* 48, 1517–1524. <https://doi.org/10.1021/es404549u>
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2, 356–358. <https://doi.org/10.1007/bf00355716>
- Dai, L., Syberg, K., Banta, G.T., Selck, H., Forbes, V.E., 2013. Effects, Uptake, and Depuration Kinetics of Silver Oxide and Copper Oxide Nanoparticles in a Marine Deposit Feeder, *Macoma balthica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1, 760–767. <https://doi.org/10.1021/sc4000434>

Desouky, M.M.A., 2012. Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminum, exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 65, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2012.07.008>

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.

Doyen, P., Morhain, E., Rodius, F., 1 Université du Littoral Côte d’Opale, Institut Charles Viollette, Equipe Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Boulevard du Bassin Napoléon, 62327 Boulogne-sur-Mer, France;, 2015. Modulation of metallothionein, pi-GST and Se-GPx mRNA expression in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* transplanted into polluted areas. *AIMS Environmental Science* 2, 333–344. <https://doi.org/10.3934/environsci.2015.2.333>

Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of The Total Environment* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., Perumal, E., 2016. Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos: Oxidative stress and teratogenicity of CuO-NPs. *Journal of Applied Toxicology* 36, 554–567. <https://doi.org/10.1002/jat.3224>

Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>

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*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>

Garner, K.L., Keller, A.A., 2014. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research* 16. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2503-2>

Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 84, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 118–119, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>

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*. *Marine Environmental Research* 101, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.004>

Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology* 45, 9356–9362. <https://doi.org/10.1021/es200955s>

Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D.S., 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology* 41, 8178–8186.

Hanna, S., Miller, R., Lenihan, H., 2014. Accumulation and Toxicity of Copper Oxide Engineered Nanoparticles in a Marine Mussel. *Nanomaterials* 4, 535–547. <https://doi.org/10.3390/nano4030535>

Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S., Dawson, K.A., Lynch, I., Blasco, J., Sheehan, D., 2014. Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: A redox proteomic investigation. *Chemosphere* 108, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.054>

Jones, R.J., 2007. Chemical contamination of a coral reef by the grounding of a cruise ship in Bermuda. *Marine Pollution Bulletin* 54, 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.02.018>

Keller, A.A., Adeleye, A.S., Conway, J.R., Garner, K.L., Zhao, L., Cherr, G.N., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., Godwin, H.A., Hanna, S., Ji, Z., Kaweeteerawat, C., Lin, S., Lenihan, H.S., Miller, R.J., Nel, A.E., Peralta-Videa, J.R., Walker, S.L., Taylor, A.A., Torres-Duarte, C., Zink, J.I., Zuverza-Mena, N., 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. *NanoImpact* 7, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

Keller, A.A., Lazareva, A., 2014. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Science & Technology Letters* 1, 65–70. <https://doi.org/10.1021/ez400106t>

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 15. <https://doi.org/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. *Environmental science & technology* 44, 1962–1967.

Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S., Giambérini, L., 2018. Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology* 198, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>

Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, S., Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Sohm, B., 2019. *Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity. Environmental Science and Pollution Research. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04927-3>

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. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028>

Moreira, S., Lima, I., Ribeiro, R., Guilhermino, L., 2006. Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. Aquatic Toxicology 78, 186–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.001>

Navarro, A., Wei bach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. Aquatic Toxicology 122–123, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.008>

Nowack, B., Mitrano, D.M., 2018. Procedures for the production and use of synthetically aged and product released nanomaterials for further environmental and ecotoxicity testing. NanoImpact 10, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.12.001>

Ortelli, S., Costa, A.L., Blosi, M., Brunelli, A., Badetti, E., Bonetto, A., Hristozov, D., Marcomini, A., 2017. Colloidal characterization of CuO nanoparticles in biological and environmental media. Environmental Science: Nano 4, 1264–1272. <https://doi.org/10.1039/C6EN00601A>

Pan, J.-F., Buffet, P.-E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Joubert, Y., Pilet, P., Guibbolini, M., Risso de Faverney, C., Rom o, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. Environmental Pollution 168, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.051>

Pantano, D., Neubauer, N., Navratilova, J., Scifo, L., Civardi, C., Stone, V., von der Kammer, F., Müller, P., Sobrido, M.S., Angeletti, B., Rose, J., Wohlleben, W., 2018. Transformations of Nanoenabled Copper Formulations Govern Release, Antifungal Effectiveness, and Sustainability throughout the Wood Protection Lifecycle. Environmental Science & Technology 52, 1128–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04130>

Park, H.-G., Yeo, M.-K., 2013. Comparison of gene expression changes induced by exposure to Ag, Cu-TiO₂, and TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos. Molecular & Cellular Toxicology 9, 129–139.

Park, J., Kim, S., Yoo, J., Lee, J.-S., Park, J.-W., Jung, J., 2014. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: The difference between metal ions and nanoparticles. Marine Pollution Bulletin 85, 526–531. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.038>

- Peng, C., Shen, C., Zheng, S., Yang, W., Hu, H., Liu, J., Shi, J., 2017a. Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials* 7, 326. <https://doi.org/10.3390/nano7100326>
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y., Chen, Y., 2017b. Behavior and Potential Impacts of Metal-Based Engineered Nanoparticles in Aquatic Environments. *Nanomaterials* 7, 21. <https://doi.org/10.3390/nano7010021>
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Quik, J.T.K., Velzeboer, I., Wouterse, M., Koelmans, A.A., van de Meent, D., 2014. Heteroaggregation and sedimentation rates for nanomaterials in natural waters. *Water Research* 48, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.036>
- 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. *Marine Environmental Research* 111, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>
- Rossetto, A.L. de O.F., Melegari, S.P., Ouriques, L.C., Matias, W.G., 2014. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Science of The Total Environment* 490, 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.056>
- Siddiqui, S., Goddard, R.H., Bielmyer-Fraser, G.K., 2015. Comparative effects of dissolved copper and copper oxide nanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. *Aquatic Toxicology* 160, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.007>
- Song, Y.-F., Luo, Z., Huang, C., Liu, X., Pan, Y.-X., Chen, Q.-L., 2013. Effects of calcium and copper exposure on lipogenic metabolism, metal element compositions and histology in *Synechogobius hasta*. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 1641–1656. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9816-4>
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials* 330, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.023>
- Tavares, K.P., Caloto-Oliveira, A., Vicentini, D.S., Melegari, S.P., Matias, W.G., Barbosa, S., Kummrow, F., 2014. Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 9, 43–50. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.006>
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Morel, E., Proux, O., Chanéac, C., Angeletti, B., Pailles, C., Artells, E., Santaella, C., Rose, J., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2015. Chronic dosing of a simulated

pond ecosystem in indoor aquatic mesocosms: fate and transport of CeO₂ nanoparticles. Environ. Sci.: Nano 2, 653–663. <https://doi.org/10.1039/C5EN00092K>

Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. Marine Pollution Bulletin 60, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.004>

Turner, A., Barrett, M., Brown, M.T., 2009. Processing of antifouling paint particles by *Mytilus edulis*. Environmental Pollution 157, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.001>

Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., Sawamura, M., 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine–xanthine oxidase. Analytical biochemistry 251, 206–209.

Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. Beilstein Journal of Nanotechnology 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>

Vicario-Parés, U., Lacave, J.M., Reip, P., Cajaraville, M.P., Orbea, A., 2018. Cellular and molecular responses of adult zebrafish after exposure to CuO nanoparticles or ionic copper. Ecotoxicology 27, 89–101. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1873-5>

Wang, T., Long, X., Liu, Z., Cheng, Y., Yan, S., 2015. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology 44, 674–682. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.030>

Wang, T., Wen, X., Hu, Y., Zhang, X., Wang, D., Yin, S., 2019. Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*. Fish & shellfish immunology 84, 648–655.

Wang, Y., Nowack, B., 2018. Environmental risk assessment of engineered nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots: Environmental risk assessment of engineered nanomaterials. Environmental Toxicology and Chemistry 37, 1387–1395. <https://doi.org/10.1002/etc.4080>

Yeo, M.-K., Park, H.-G., 2012. Gene expression in zebrafish embryos following exposure to Cu-doped TiO₂ and pure TiO₂ nanometer-sized photocatalysts. Molecular & Cellular Toxicology 8, 127–137.

Zhang, Y., Zhou, Q., Ke, C.-H., Huang, H.-Q., 2014. Cloning and expression analysis of γ-aminobutyrate type A receptor-associated protein (GABARAP) in Asiatic hard clam, *Meretrix meretrix*. Aquaculture 432, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.025>

Zhao, J., Bowman, L., Zhang, X., Vallyathan, V., Young, S.-H., Castranova, V., Ding, M., 2009. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 72, 1141–1149.

Supporting informations

Gene Name	Accession Number (GenBank)	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Amplicon length (bp)	Concentration used for qPCR (nM)	Reference
Ribosomal protein S3	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG	154	250	Navarro et al., 2011
Beta Actine	EF446608.1	CCTTTACCACAACAGCCGA	AGCATAGCCTCAGGGCA	191	300	Arini et al., 2014
Catalase	EF446609	CCTTCAGTGCCTAGTCTGG	CCTGTTCTCTGACCGTGG	196	200	Arini et al., 2014
Mn Superoxide	EF446611	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC	GGATCATTGACGAGATGAAGGC	200	200	Arini et al., 2014
Metallothionein (isoform 1)	EF185126	CGGCTATCTCCCGCGA	AGCTTTTACCAGAACCAAACAGT	210	200	Arini et al., 2014
GABARAP	KF218343	AAAGCCCGTGTAGGAGACTTG	AAGAGATCCCATAGTCGCACT	150	250	Chen et al., 2013
Se-GPx	EF547366.1	TATGCCCTGTTCCCGTGTC	CTGCCATCTGGACCAATCAG	148	200	Chen et al., 2013
Thioredoxin reductase	KF275126	AATGCGGTGGCTTCCTACA	TCTGCTGGTCAAATCCTCGC	89	200	Chen et al., 2015
PGP	KJ001772	ATCCTGGTTGATGGCACTGA	AGGTTCTGGCTCACAATACC	80	200	Chen et al., 2015
MRP1	KJ027659	GTGGTCGGGTCTGTTGGTA	AGGGTGGCGTTCTGTATCC	139	200	Chen et al., 2015
GST-Pi	AN AY885667.1	CTGGGCGACCGAATACAAATC	GATGGCATTGGACTGGGCTA	90	250	Chen et al., 2015
Cu-Zn Superoxide dismutase	KF218347.1	GAATGTTGTGGCTGATGAGG	GGATCGTTCTCTGTCAATG	76	250	Unpublished probes
Cytochrome C	KX279940	GGACGAAAACTGGACAAGC	ACCAGCAAACACCATCTTCG	144	250	Unpublished probes
Bcl-2	KX279941	CGTTGGGGAAATCTATCTGG	ACATCAACAGCGATGGCTTC	119	250	Unpublished probes
Na K ATPase A	KJ001782.1	CATGGTTCCCAATATGGTC	GGAGGAGTTGTCCACCTTGA	163	250	Unpublished probes
HSP90	KT781099	ACCTTGAGCGTGGAACAATC	ATTGCGAGTGCTTCTTCACC	102	250	Unpublished probes
HSP70	KC979064	AAGAAGGTTGGTGGTGAACG	TCCCAAATGTGTGTCTCCTG	121	250	Unpublished probes

Table I: Primer sequences used. Cited references: Navarro A, Faria M, Barata C, Piña B. 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut.* 159, 100-7. ; Arini A, Daffe G, Gonzalez P, Feurtet-Mazel A, Baudrimont M. 2014. Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. *Environ Pollut.* 192, 74-82. ; Chen H, Zha J, Liang X, Bu J, Wang M, Wang Z. 2013. Sequencing and de novo assembly of the Asian clam (*Corbicula fluminea*) transcriptome using the Illumina GAllx method. *PLoS One.* 2013 8:e79516. ; Chen H, Zha J, Yuan L, Wang Z. 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere.* 119, 856-62.

Points-clés

- Seules les CuO-NOAA ont été retrouvées dans la colonne d'eau à raison de 10% de leur concentration initiale. La plus forte salinité (30 psu) a favorisé la dissolution des CuO-NOAA mais n'a pas impacté celle des NM incorporés dans le NAP. Une concentration élevée de contaminants (NM et peintures) a été retrouvée sur le sédiment aux deux salinités d'exposition. L'ajout du mécanisme des marées a cependant mené à quelques incohérences dans les mesures puisque les plus fortes concentrations d'exposition en milieu marin correspondent aux concentrations les plus basses dans les sédiments. Ce phénomène peut être expliqué par une fuite du contaminant dans le bac récupérateur et pourrait potentiellement souligner l'effet mécanique de la marée en milieu naturel.
- Les organismes marins (*S. plana*) ont bioaccumulé le cuivre du traitement CuO-NOAA. Cependant, la forme (nano ou ionique) et l'origine (colonne d'eau ou sédiment) de cette bioaccumulation n'est pas connue. Le titane qui sert de traceur de la peinture n'a pas été significativement bioaccumulé chez cette espèce.
- Les organismes d'eau douce (*C. fluminea*) n'ont pas accumulé significativement le cuivre dans leurs tissus. Par contre, le titane a été fortement bioaccumulé suite à l'exposition à la peinture seule (Acryl_FP), suggérant des interactions différentes en absence de NM.
- Plusieurs niveaux biologiques ont été impactés par les contaminations : individuel, cellulaire et moléculaire. Les deux organismes ont dans un premier temps déclenché des mécanismes de détoxification, puis des mécanismes supplémentaires ont été sollicités à 28 jours, suggérant des réponses additionnelles nécessaires à la protection. Pour *S. plana*, il s'agissait de réponses antioxydantes et antitoxiques tandis que pour *C. fluminea*, les réponses pourraient refléter un dysfonctionnement au niveau des lysosomes.
- Le NAP a impacté plus fortement les organismes que la forme libre des CuO-NOAA. Compte tenu du fait que ces formes seront les plus abondantes dans l'environnement, il apparaît indispensable de les prendre en compte pour en déterminer le risque.

Chapitre V: Discussion générale

L'objectif général de ce travail de thèse a consisté à évaluer le devenir et les effets de différents nanomatériaux (NM) et nanoproduits (NAP) de dioxyde de cérium (CeO_2) et d'oxyde de cuivre (CuO) chez deux espèces de bivalves endobenthiques représentatives des eaux douces (*C. fluminea*) et des eaux marines (*S. plana*). L'une des originalités de cette thèse réside dans la mise en place et le suivi de réponses à l'échelle moléculaire à travers la mesure d'une quinzaine d'expressions de gènes par RT-qPCR chez *C. fluminea*. L'approche adoptée a également permis l'évaluation des effets à d'autres niveaux d'organisation biologiques chez les deux espèces, permettant ainsi d'avoir une vision intégrée des effets. Le devenir des contaminants a également été déterminé à 3 salinités et à travers différents scénarios d'exposition de complexité croissante (microcosmes, mésocosmes).

Dans ce chapitre, l'approche moléculaire et l'approche multi-marqueurs adoptées y sont tout d'abord discutées. Les effets des NM et des NAP mesurés dans ces travaux sont ensuite mis en perspective. Ceci permet d'approfondir les réflexions sur l'intérêt d'étudier ces effets en prenant en compte les différentes formes de NM au cours de leur cycle de vie, et dans des conditions se rapprochant de l'environnement.

A. Approche moléculaire pour l'évaluation des effets des nanomatériaux

Depuis une vingtaine d'années, les technologies « - omiques » sont en plein développement et pourraient être utilisées à terme dans l'évaluation du risque posé par les composés chimiques. Le grand nombre de réponses pouvant être suivies lorsque le génome est bien annoté rend possible le suivi simultané de nombreuses voies, permettant une approche plus mécanistique pour la compréhension des effets des contaminants. Actuellement, les données ont principalement été recueillies sur le génome humain ou de mammifères, mais elles restent encore assez parcellaires chez les organismes eucaryotes pertinents pour l'évaluation du risque environnemental. De ce fait, les approches moléculaires sont encore peu courantes dans l'évaluation des effets des NM chez les bivalves malgré leur intérêt pour la biosurveillance de la pollution des eaux.

Les outils « -omiques » soulèvent beaucoup d'espoirs mais présentent quelques inconvénients à ne pas négliger. Dans un premier temps, le coût élevé de ces techniques constitue un premier frein dans la mise en place de ces études en écotoxicologie. De plus,

l'extrapolation des effets mesurés à l'échelle moléculaire vers des échelles biologiques supérieures n'est pas chose aisée du fait des nombreuses régulations qui interviennent. Les niveaux d'expressions géniques sont également dépendants du tissu analysé, comme démontré lors de l'exposition en mésocosme (Chapitre III, partie 2). Cette particularité permet d'interpréter des effets des contaminations différents selon le tissu étudié (Bigot et al., 2011 ; Châtel et al., 2018). La présence de tissus autres que le tissu d'intérêt peut alors conduire à une variabilité supplémentaire dans les mesures. Chez *C. fluminea*, les branchies sont facilement prélevées tandis que la glande digestive est en contact étroit avec les gonades. Un traitement supplémentaire a été mis en place au cours de cette thèse afin de mieux sélectionner le tissu digestif après son prélèvement et a effectivement conduit à une meilleure homogénéité des résultats.

Un autre point de vigilance à prendre en compte concerne la nécessité d'utiliser des gènes normalisateurs qui vont permettre de corriger toute variation non-biologique issue de la manipulation de l'échantillon et des erreurs de traitement. Ces gènes doivent théoriquement être exprimés dans de nombreux tissus et ne présenter aucune variation d'expression face au contaminant. L'utilisation de gènes ne présentant pas ces caractéristiques peut considérablement impacter les résultats obtenus, c'est pourquoi il est conseillé de systématiquement vérifier leur stabilité pour chaque expérience (Volland et al., 2017). Malgré tout, la plupart des études menées sur les bivalves (> 60%) n'ont pas réalisé cette validation et utilisent principalement comme gènes normalisateurs la β -actine ou le 18S qui se sont révélés être généralement de mauvais candidats, comme par exemple pour le bivalve *Ruditapes philippinarum* (Volland et al., 2017). Le nombre de séquences disponibles pour les organismes non-séquencés ne permet pas toujours la sélection d'un grand nombre de gènes, et nécessiterait du temps et un coût supplémentaire pour en découvrir de nouveaux, ce qui réduit actuellement le choix des gènes candidats. La stabilité des deux gènes normalisateurs utilisés au cours de cette thèse (β -actine et protéine S3) a été vérifiée lors de chaque expérience et a été variable en fonction des contaminations (CeO_2 NM, CuO NM, Cu^{2+}), ce qui est en accord avec la nécessité de systématiquement vérifier leur stabilité. Récemment, Arini et al. (2019) ont également utilisé comme normalisateur chez *C. fluminea* le gène *rpl7*, qu'il serait intéressant d'ajouter à ce présent set de gènes pour les études futures.

Malgré ces difficultés, ces outils sont particulièrement prometteurs pour mettre en évidence des perturbations précoces. De plus, aucun équivalent à la technique de qPCR ne permet de mesurer des variations quantitatives aussi fines au niveau des protéines. La technique de Western blot par exemple est semi-quantitative et nécessite de disposer d'un anticorps spécifique. L'accroissement des connaissances sur le génome des espèces d'intérêt permettra de suivre un plus grand nombre de voies que celles classiquement mesurées du fait d'une meilleure accessibilité des séquences génomiques comparé aux séquences protéiques dans les bases de données. Les modifications d'expressions observées au niveau moléculaire pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs d'intérêt dont les mesures ne sont pas encore actuellement disponibles aux échelles supérieures. De plus, le nombre conséquent de réponses pouvant être suivies permet d'ajouter de la compréhension sur les interactions moléculaires des contaminants et sur leur mode d'action. L'évaluation des effets des faibles doses est particulièrement pertinente à travers l'utilisation de ces outils compte tenu de la sensibilité de ces techniques et de la précocité des réponses à cette échelle de mesure. C'est pourquoi, une des premières démarches de ce travail de thèse a été de mettre en place une batterie de plusieurs amorces ciblant des gènes d'intérêts pour l'évaluation des effets NM chez le bivalve d'eau douce *C. fluminea*. Ce travail a permis l'acquisition de connaissances fondamentales sur une espèce pour laquelle peu d'informations sont disponibles à ce niveau d'organisation. Actuellement, cette étude est la seule qui rapporte les effets moléculaires des NAP et des effets croisés de la salinité et des NM/NAP chez une espèce de bivalve. Cette approche a permis de départager les effets des deux NM étudiés (CeO_2 NM et CuO NM), des concentrations d'exposition (20, 100 $\mu\text{g/L}$), des tailles de NM (12 et 30 nm) et des formes de NM (NM libres, NAP), tandis que ces différences n'étaient pas systématiquement visibles aux niveaux d'organisation supérieurs. Elle a également permis d'évaluer les effets du stress salin sur différents organes, procurant ainsi des éléments essentiels à la compréhension des mécanismes biologiques chez ces organismes.

Les données acquises au cours de cette thèse indiquent que les réponses classiquement rapportées en nanotoxicologie, telles que l'activation ou l'inhibition de défenses antioxydantes, ne représentent pas la seule voie impactée. Les processus antitoxiques reliés à la complexation (MT, GSTpi) ou l'excrétion cellulaire des contaminants (système MXR), mais également l'autophagie, l'apoptose et le cytosquelette ont été impactés par les contaminants.

Il apparaît alors indispensable d'étudier ces différentes voies plus amplement afin de déterminer le mode d'action du contaminant. Ces études pourraient être réalisées par des approches couplées transcripto- protéo- métabolo-miques permettant un criblage complet du fonctionnement cellulaire. Ceci souligne également la nécessité de mettre en place des expositions plus réalistes en termes de concentrations, puisque de fortes concentrations induisent plutôt un stress général via l'apparition de stress oxydant et de voies associées à la nécrose, tandis que des doses plus faibles peuvent induire des réponses plus subtiles et des voies différentes de celles rapportées pour les concentrations élevées (Klaper et al., 2014).

Le grand nombre de données générées par ces approches « -omiques » rend également nécessaire le développement d'outils statistiques intégratifs permettant de traiter l'ensemble des résultats et de départager les groupes d'exposition. Ce type d'outils a été particulièrement efficace pour décrire les variations de réponses observées à des niveaux biologiques supérieurs tel qu'au niveau cellulaire (Garaud et al., 2015, 2016 ; Bertrand et al., 2016, 2017; Potet et al., 2016), tandis qu'il est encore peu représenté chez les bivalves pour décrire les effets moléculaires. En effet, ces données ont jusqu'alors été majoritairement traitées de façon individuelle, mais l'augmentation du nombre de séquences disponibles va inévitablement conduire à un besoin d'outils statistiques spécifiques. De plus, les nombreuses variations d'expressions observées ont parfois rendu particulièrement difficile l'interprétation des résultats pris individuellement. L'intégration et la modélisation de ces données complexes semblent indispensables à réaliser pour améliorer la compréhension sur les activités biologiques et les processus toxiques des contaminants (Ge et al., 2013). L'utilisation d'outils statistiques multivariés tels que l'analyse en composante principale ou la régression par les moindres carrés partiels (Partial Least Squares, PLS) couplée à l'analyse discriminante (Discriminant Analysis, DA) semble constituer une bonne option (Simmons et al., 2015). Le choix s'est porté sur la PLS-DA, qui s'est révélée être particulièrement adaptée lorsqu'un grand nombre de données est acquis sur un nombre limité d'échantillons. Cette technique a été particulièrement utile pour décrire les effets moléculaires et cellulaires et met en évidence l'intérêt de la prise en compte de faibles variations pour départager les effets globaux des différents groupes. Les marqueurs ayant une forte importance pour la création des modèles n'ont pas été systématiquement impactés d'un point de vue statistique, cependant le faible nombre de réplicas (n=6) et la forte variabilité des mesures ont certainement contribué à

réduire leur significativité. Malgré ces aspects, l'interprétation des données obtenues à travers les modèles multivariés a permis d'émettre des hypothèses plausibles et indique que ces faibles variations semblent importantes à prendre en compte dans l'évaluation des effets des substances.

B. Approche multi-marqueurs : vers une meilleure compréhension des mécanismes d'action des contaminants

L'approche adoptée permet d'apporter des connaissances novatrices concernant les réponses moléculaires de bivalves d'eau douce faisant face aux NM, NAP et/ou à la salinité. Le nombre de séquences disponibles sur *C. fluminea* est encore limité mais a permis dans cette thèse une évaluation des effets précoces sur différentes voies, connues pour être impactées au niveau cellulaire. La mesure simultanée de marqueurs moléculaires et cellulaires impliqués dans des processus similaires devrait alors nous procurer des informations sur les régulations mises en place par la cellule et en conséquence, sur les liens entre ces niveaux. Ce type d'approche est vivement conseillé puisque les organismes ne répondent pas aux perturbations à travers une seule molécule, ou à travers une seule voie, mais font intervenir différentes voies cellulaires menant à des interactions à plusieurs niveaux. Ainsi, la mesure de marqueurs impliqués dans les réponses antioxydantes (SOD, CAT, GPX) et antitoxiques (GST, MT) a été réalisée au cours de ces travaux sur ces deux niveaux biologiques. Aucune corrélation nette n'a cependant pu être effectuée pour ces marqueurs entre ces niveaux et peut être due à la fois (i) aux différents isoformes concernés par les mesures, (ii) à la précocité des réponses aux différents niveaux d'étude, (iii) à la sensibilité des techniques de mesure et (iv) aux différents mécanismes de régulation intervenant entre ces niveaux. Des réponses supplémentaires ont été mesurées dans les différentes batteries de marqueurs et ont souligné au niveau cellulaire des effets sur le métabolisme énergétique des individus et au niveau moléculaire, l'importance du système autophagique et apoptotique lors d'une contamination aux NM. Un problème technique rencontré au cours de cette thèse n'a pas permis l'évaluation de l'apoptose à ces deux niveaux simultanément mais les impacts sur le système lysosomal sont en cours d'analyse pour la dernière étude. Cette approche multi-marqueurs et multi-niveaux a permis l'acquisition de nombreuses données informatrices sur le mécanisme d'action des contaminants au sein des cellules. Cependant, certaines réponses mesurées peuvent être dues aux réponses comportementales (fermeture des valves par exemple) des organismes qui influencent leur

exposition. La mesure de différentes réponses au niveau de l'individu semble alors indispensable à réaliser et a permis dans le cadre de cette thèse d'évaluer l'exposition des organismes. Afin d'approfondir les connaissances sur les liens entre ces niveaux, il pourrait être judicieux d'ajouter des mesures aux niveaux biologiques inférieurs (cellulaire, moléculaire) de marqueurs reliés comportement, tels que l'acétylcholine estérase (Ache). Malgré les difficultés rencontrées pour relier les réponses mesurées à ces différents niveaux, l'approche adoptée visant à définir les effets des NM et NAP sur plusieurs niveaux d'organisation biologique (individuel, cellulaire et moléculaire) à travers l'utilisation de marqueurs multiples est vivement conseillée pour les études futures.

Alors que le développement de marqueurs situés aux niveaux biologiques inférieurs permet une détection précoce des effets, il est souvent difficile de les relier aux effets populationnels ou écosystémiques qui ont plus de valeur pour la mise en place des réglementations. Récemment, le concept d'AOP (Adverse Outcomes Pathways) a été développé afin d'assembler les connaissances sur les liens entre les événements moléculaires initiateurs et les effets néfastes à des niveaux plus pertinents pour l'évaluation du risque des produits chimiques tels que les effets populationnels ou écosystémiques (Figure 21).

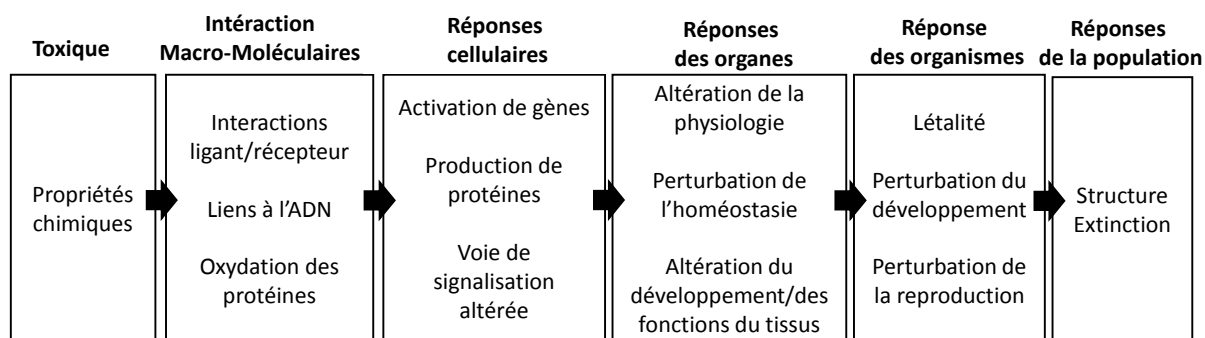


Figure 21 : Schéma conceptuel de l'Adverse Outcomes Pathways (AOP) (à partir de OECD, 2012)

Le développement de l'approche AOP devrait faciliter la compréhension des liens entre les différents niveaux et pourrait à terme rendre possible l'identification du risque associé aux substances toxiques de façon relativement précoce, notamment à travers l'utilisation et le développement des outils « -omiques ». L'évaluation des impacts précoces devrait rendre possible la mise en place des mesures protectrices avant l'apparition des effets toxiques aux niveaux supérieurs mais est encore particulièrement difficile actuellement. C'est pourquoi, l'acquisition de données et le développement des approches AOP font partie des

recommandations pour permettre l'accroissement des connaissances sur le risque posé par les contaminants. Cette présente étude participe à l'accroissement des connaissances sur les effets des NM et NAP et/ou de la salinité qui pourront être associées aux premiers niveaux d'une AOP. Ceci mène à la question : à partir de quels critères peut-on considérer que les réponses soient assez importantes pour générer des effets toxiques ? Pour répondre à cette question, il semble important de développer davantage des approches intégrées qui permettraient de déterminer des valeurs seuils de toxicité pour les organismes. Ces valeurs pourraient alors être utilisées plus facilement pour l'évaluation du risque des substances toxiques.

C. Vers la compréhension des effets écotoxicologiques des nanomatériaux et nanoproduits

La toxicité des NM est dépendante de l'exposition des organismes, des propriétés physico-chimiques des NM (élément, taille, dissolution...), des paramètres environnementaux (température, pH, salinité...) et des capacités de réponses des organismes face au contaminant. Ces nombreux paramètres pouvant influencer la toxicité des NM rendent difficile la comparaison des études et mènent à un fort besoin de caractérisation des NM lors des expositions. Au cours de cette thèse, cinq expériences ont été menées sur les NM métalliques : deux sur les CeO₂ NM et trois sur les CuO NM. Les différents NM sélectionnés ont été préalablement utilisés et caractérisés dans d'autres études en permettant ainsi l'approfondissement des connaissances sur un même NM. En règle générale, les NM étudiés sont restés peu de temps dans la colonne d'eau, suggérant une sédimentation rapide sur le fond des dispositifs. Le choix d'espèce endobenthiques est alors particulièrement judicieux puisqu'il permet d'étudier les effets de NM lorsque les organismes sont physiquement en contact avec le contaminant, que ce soit à travers la filtration de la colonne d'eau, leur nutrition possible sur la surface sédimentaire, ou à travers la bioturbation du milieu par ces espèces. Les deux NM étudiés (CeO₂ NM et CuO NM) ont présenté relativement peu de dissolution dans la colonne d'eau, indiquant que les effets mesurés ont certainement été induits par une exposition à la forme nanoparticulaire, à l'exception des CuO NM en milieu marin où une dissolution importante a été mesurée après 28 jours (Chapitre IV, partie 2). Les données acquises aux différentes échelles de mesures ont été synthétisées dans le tableau III pour les CeO₂ NM et dans le tableau IV pour les CuO NM. Les informations recueillies aux

échelles cellulaires et moléculaires ont été plus amplement détaillées dans le tableau V qui reprend les variables importantes pour l'établissement des modèles multivariés.

L'exposition des organismes est importante à déterminer puisqu'elle va avoir des impacts directs sur les réponses mesurées. Lors de nos travaux, les NM n'ont pas été bioaccumulés par *C. fluminea* lors des expositions en microcosmes. En mésocosmes, une bioaccumulation de CuO NM a été mesurée uniquement chez *S. plana* alors que les CeO₂ NM ont été bioaccumulés par les deux espèces. Les comparaisons entre les microcosmes et les mésocosmes ne sont pas simples puisque la durée des expositions, la composition des milieux (absence/présence de sédiment et de nourriture), la concentration et la fréquence des injections, mais également le site de prélèvement des organismes n'ont pas été identiques. Ces différences peuvent impacter considérablement les réponses des organismes et des contaminants et sont alors à ne pas négliger. Par exemple, les critères de sélection menant à la bioaccumulation sont liés aussi bien à la contamination aux NM et NAP (concentration, fréquence, taille, propriétés de surface), qu'aux facteurs environnementaux (salinité, nourriture) mais également à la physiologie des organismes. Les différences de bioaccumulation entre espèces peuvent alors être dues (i) à la biologie des espèces, (ii) au comportement des NM dans les différents milieux, (iii) à l'influence du mécanisme des marées, mais également (iv) aux traits de vie des espèces sélectionnées.

Les réponses individuelles telles que les observations au niveau de la filtration et du comportement d'enfouissement sont également importantes à prendre en compte pour l'évaluation de l'exposition des organismes. Ces réponses peuvent être particulièrement sensibles et permettent d'évaluer les effets sub-létaux des contaminants (Amiard-Triquet et Amiard, 2012). Elles sont fréquemment affectées chez les bivalves exposés aux NM (CuO NM : Buffet et al., 2011, 2013 ; ZnO NM : Buffet et al., 2012 ; CeO₂ NM : Bertrand et al., 2016), et généralement diminuées, ce qui peut être relié à un comportement d'évitement (Buffet et al., 2011, 2013, Pan et al., 2012). Des précautions doivent cependant être prises lors de leur interprétation, car le suivi de ce type de réponse nécessite souvent l'exposition des organismes dans un milieu différent et non contaminé. Certaines techniques existent pour évaluer les réponses individuelles directement dans le milieu d'exposition mais sont plus rarement représentées puisqu'elles nécessitent du matériel et/ou des dispositifs spécifiques.

Dans la littérature, les effets ont majoritairement été mis en évidence à travers la mesure de biomarqueurs cellulaires qui ont fortement répondu aux contaminations aux NM. Les études ont rapporté l'importance du système antioxydant (TAC, SOD, CAT, GPX), des mécanismes antitoxiques (GST, MT) et du métabolisme énergétique (LDH) lors d'expositions d'organismes aquatiques aux NM métalliques (Mouneyrac et al., 2014 ; Tella et al., 2014 ; Garaud et al., 2016 ; Bertrand et al., 2016, Gomes et al., 2012, 2014) tandis que les marqueurs de dommages à cette échelle (LOOH, Casp-3) ont plus rarement été rapportés. Au cours de nos travaux, les réponses mesurées à ce niveau biologique ont généralement été expliquées à travers des tendances mais elles indiquent que les CeO₂ NM et les CuO NM ont impacté des voies similaires, ce qui est en accord avec la littérature. Le caractère peu marqué de ces réponses peut être lié aux différences expérimentales entre études et aux différentes sensibilités entre espèces. De plus, les problèmes techniques rencontrés n'ont pas permis d'incorporer systématiquement certains biomarqueurs cellulaires qui se sont révélés particulièrement sensibles aux NM métalliques dans la littérature tels que les MT, l'activité des catalases et des GPx, ou de l'activité des caspases-3 qui a été particulièrement sensibles lors de l'exposition de *C. fluminea* aux CeO₂ NM sur du court terme (Chapitre III, partie 1). Ces biais ont conduit à une diminution du nombre de biomarqueurs mesurés et peuvent avoir mené à une sous-estimation des effets du fait de l'absence de mesures sur un ou des marqueur(s) pouvant avoir réagi à la contamination. Le nombre de biomarqueurs composant la batterie utilisée et la diversité des voies d'action de ceux-ci ont tout de même permis d'évaluer les effets sur un spectre de réponse assez large concernant des réponses classiquement perturbées par les NM. Même en l'absence d'effet significatif sur les biomarqueurs mesurés à ce niveau d'étude, des effets individuels et moléculaires (transcription de gènes et/ou dommages à l'ADN) importants ont été observés dans les deux organismes.

Au niveau moléculaire, les réponses ont été particulièrement sensibles dans les différentes expositions, qu'elles aient été menées sur du court terme (< 6 jours) ou sur un plus long terme (28 jours). Les deux NM ont induit des réponses communes qui impliquent les défenses antioxydantes (CuZnSOD, MnSOD et Trxr), les défenses antitoxiques (GSTpi et MT) et la génération de génotoxicité. L'ajout de marqueurs reliés à la réparation de l'ADN pourrait être particulièrement informateur pour déterminer si les cellules activent ces voies et dans quelle mesure. La batterie d'expressions de gènes suivie a également permis de nous aiguiller sur

certaines voies qui pourraient être impactées à l'échelle cellulaire mais qui n'ont pas été mesurées dans nos études, tels que la détoxification par excrétion cellulaire (système MXR).

Certaines expressions de gènes ont été spécifiquement impactées par certains NM, laissant supposer que ces différences soient dues à leur composition. L'analyse globale des données acquises sur les CeO₂ NM et NAP indique que ces contaminants ont fortement impacté la transcription de Se-GPx et/ou de HSP70 en la diminuant. Dans la littérature, il est relativement difficile de se procurer des informations sur une diminution d'expression de gènes. Une diminution de transcription de Se-GPx a été mise en évidence par d'autres auteurs dans les branchies du bivalve *Dreissena polymorpha* (Garaud et al., 2016) et pourrait être reliée à l'activité antioxydante des CeO₂ NM. D'autres auteurs suggèrent qu'une telle diminution pourrait être reliée à l'inefficacité des mécanismes de détoxification (Doyen et al., 2015). Une diminution de transcription ou de synthèse d'HSP70 a été plutôt associée à des pathologies et principalement à l'augmentation de procédés apoptotiques (Feng et al., 2001; Nylandsted et al., 2000). De ce fait, les effets des CeO₂ NM dans les branchies seraient témoins d'effets bénéfiques, tandis que les NAP seraient plutôt responsables d'effets toxiques. Alors que chaque contaminant (CeO₂ NM et NAP) a fortement impacté la transcription de HSP70 et/ou de Se-GPx dans les branchies sur toute la durée de l'exposition, seul le traitement aux NAP Envirox™ a affecté ces paramètres dans la glande digestive à 28 jours, ceci malgré la forte bioaccumulation des deux NM de plus petite taille (Envirox™ et NM-212). La charge plus négative liée à la présence de surfactant organique pourrait avoir contribué à ces effets en menant à des interactions cellulaires différentes. Il semblerait alors judicieux d'évaluer plus en détail les effets sur ces deux marqueurs dans le cadre des expositions aux CeO₂ NM.

A l'opposé, ces expressions ont rarement participé à la discrimination des groupes pour les organismes exposés aux CuO NM. Les CuO NM ont plutôt impacté les processus d'excrétion cellulaire (système MXR : Pgp et MRP1) et les défenses antioxydantes (Cat). L'activité MXR n'a pas été impactée chez *Dreissena polymorpha* exposée aux CeO₂ NM (Garaud et al., 2016) mais a été fortement augmentée chez *M. galloprovincialis* exposée à des CuO NM, des Ag NM, du Cu²⁺ et des Ag⁺ (Katsumiti et al., 2015, 2018). De nombreuses comparaisons ne sont cependant pas possibles pour un même NM du fait du faible nombre d'études ayant évalué cette activité. Ces réponses indiquent la prise en charge des CuO NM ou de leurs ions dissous par la cellule. Dans la littérature, il semble avéré que les CuO NM peuvent impacter les

fonctions lysosomales, ce qui peut mener à des phénomènes de mort cellulaire (Zhang et al., 2018). La réduction de transcription d'un gène impliqué dans l'autophagie (GABARAP) et la réduction de transcription du marqueur anti-apoptotique (Bcl2) observée chez *C. fluminea* après 28 jours pourrait être témoins de la mise en place d'effets similaires. L'évaluation des effets des CuO NM sur les lysosomes et la localisation des NM dans ces échantillons par de la technique de microscopie hyperspectrale (Cytoviva™) est en cours de réalisation et pourra apporter éventuellement des explications à nos résultats.

Dans le cadre de l'ANR NanoSALT, nous avons également montré que la salinité a un impact fort sur les réponses aux différents niveaux biologiques et a rendu plus difficile l'évaluation des effets des NM. Les données recueillies sont en accord avec la littérature et indiquent qu'une modification de salinité affecte les paramètres énergétiques et structuraux et mènent à des modifications de l'environnement oxydant-réducteur des cellules (Carregosa et al., 2014; Freitas et al., 2017). Chez les bivalves, leur capacité de fermeture de valves peut être responsable à la fois de la décroissance des réserves énergétiques et des réponses antioxydantes et antitoxiques observées au niveau cellulaire (Bertrand et al., 2016) et/ou moléculaire (Chapitre III, partie 2) chez *C. fluminea* dans nos travaux. Ce comportement d'isolement devrait cependant être provisoire puisque qu'il réduit ou empêche les échanges des organismes avec le milieu environnant, compromettant les fonctions essentielles de respiration et de nutrition. Une telle exposition pourrait alors entraîner à plus long terme des effets sur la croissance des organismes et impacter leurs capacités de réponse face à d'autres situations de stress.

L'exposition des organismes à des stress multiples tels qu'à une élévation de salinité et de concentration en NM pourrait mener à des effets différents de ceux observés lors des expositions à ces substances seules. Alors que les effets de la salinité ont largement été étudiés chez les organismes aquatiques de manière individuelle, les études disponibles portant sur l'évaluation des effets croisés de la salinité et des NM chez les bivalves sont au nombre de 2 et ont été déterminées au niveau comportemental et cellulaire (Bertrand et al., 2016; De Marchi et al., 2018). Nos travaux ont permis d'apporter les premières informations sur les effets croisés de la salinité et des NM et NAP chez *C. fluminea* au niveau moléculaire. D'une part, les effets moléculaires des NM et NAP n'ont pas été identiques chez les bivalves exposés aux différentes salinités et ont généralement été moins prononcés lors de l'exposition

hyper-saline. D'une autre part, les organismes ont répondu de façon similaire face au stress salin même lorsqu'ils ont été exposés aux contaminants. La salinité semble alors constituer un facteur de stress particulièrement important qu'il semble judicieux d'étudier sur des durées plus longues afin de déterminer quelles seront les conséquences futures d'une telle exposition. Les NM et NAP n'ont pas été inertes pour autant, ce qui semble indiquer qu'un contact, même réduit, avec ces différentes formes peut avoir des impacts sur leur physiologie.

Tableau III : Synthèse des résultats acquis lors des expositions aux CeO₂ NM et NAP chez *C. fluminea* (Cf) et chez *S. plana* (Sp). Le symbole « Ø » correspond à l'absence d'effets significativement différents. Les données des observations réalisées à la salinité optimale des organismes ont été mises en vert tandis que celles relatives aux expositions au stress salin ont été colorées en rouge. L'absence d'indication signifie une absence de mesures.

Exposition	Etude	Esp	CeO ₂ NM	Organe	Tps	Echelle moléculaire	Echelle cellulaire	Echelle de l'organisme
	Chap. III Partie 1	Cf	NM-212	GD	J2	↗ dommages à l'ADN	Ø	Ø bioaccumulation
					J6	↗ dommages à l'ADN	↗ défenses antioxydantes et apoptose	Ø bioaccumulation Ø mortalité
	Chap. III Partie 2 Et Bertrand et al. (2016)	Cf	NM-212	GD	J28	Ø	Ø	↗ bioaccumulation Ø enfouissement Ø mortalité
				BR	J28	↘ défenses antioxydantes		Ø mortalité
			Envirox™	GD	J28	↗ défenses antioxydantes et cytosquelette	Ø	↗ bioaccumulation Ø enfouissement
				BR	J28	↘ défenses antioxydantes et antitoxiques		Ø mortalité
			Combusted Envirox™	GD	J28	Ø	↗ paramètres énergétiques ↘ défenses antioxydantes	Ø bioaccumulation ↗ enfouissement
				BR	J28	Ø		Ø mortalité
			NM-212	GD	J28	Ø	↘ défenses antioxydantes	↗ bioaccumulation ↗ enfouissement
				BR	J28	Ø		Ø mortalité
			Envirox™	GD	J28	Ø	↘ défenses antioxydantes	Ø bioaccumulation Ø enfouissement
				BR	J28	Ø		Ø mortalité
			Combusted Envirox™	GD	J28	Ø	↘ défenses antioxydantes	↗ bioaccumulation Ø enfouissement
				BR	J28	Ø		Ø mortalité
		Sp	NM-212	GD	J28		Ø	Ø bioaccumulation ↗ enfouissement
			Envirox™	GD	J28		Ø	↗ bioaccumulation ↗ enfouissement
			Combusted Envirox™	GD	J28		↗ réserves énergétiques	Ø bioaccumulation ↗ enfouissement
			NM-212	GD	J28		Ø	Ø bioaccumulation ↗ enfouissement
			Envirox™	GD	J28		Ø	↗ bioaccumulation ↘ enfouissement
			Combusted Envirox™	GD	J28		↗ métabolisme énergétique et apoptose	Ø bioaccumulation ↘ enfouissement

Tableau IV : Synthèse des résultats acquis lors des expositions aux CuO NM et NAP chez *C. fluminea* (Cf) et chez *S. plana* (Sp). Le symbole « Ø » correspond à l'absence d'effets significativement différents. L'absence d'indication signifie une absence de mesures.

Exposition	Etude	Esp	CuO NM	Organe	Tps	Echelle moléculaire	Echelle cellulaire	Echelle de l'organisme
	Chap. IV Partie 1	Cf	30nm_CuO	GD	J1	↘ défenses antioxydantes	Ø	Ø bioaccumulation
					J4	↗ défenses antitoxiques	Ø	Ø bioaccumulation ↘ filtration Ø mortalité
			12nm_CuO	GD	J1	↗ défenses antitoxiques	Ø	Ø bioaccumulation
					J4	↗ défenses antitoxiques	Ø	Ø bioaccumulation ↘ filtration Ø mortalité
			CuO-NOAA	GD	J14	↗ défenses antioxydantes et antitoxiques	↗ défenses antioxydantes, métabolisme énergétique	Ø filtration
					J28	↗ défenses antioxydantes et antitoxiques, autophagie, apoptose	↗ réserves énergétique ↘ défenses antioxydantes et antitoxiques	Ø bioaccumulation Ø filtration ↗ enfouissement Ø mortalité
	Chap. IV Partie 2	Cf	CuO_Acryl_FP	GD	J14	↗ défenses antioxydantes et antitoxiques	↗ défenses antioxydantes et métabolisme énergétique	Ø filtration
					J28	↘ défenses antioxydantes et antitoxiques, autophagie, apoptose	↗ réserves énergétique ↘ défenses antioxydantes et antitoxiques	Ø bioaccumulation Ø filtration ↗ enfouissement Ø mortalité
			CuO-NOAA	GD	J14	↗ dommages à l'ADN	↗ défenses antioxydantes, métabolisme énergétique	Ø filtration
					J28	↗ dommages à l'ADN	↗ métabolisme anaérobie ↘ défenses antioxydantes et antitoxiques, réserves énergétiques	↗ bioaccumulation Ø filtration Ø enfouissement Ø mortalité
		Sp	CuO_Acryl_FP	GD	J14	↗ dommages à l'ADN	↗ défenses antioxydantes et métabolisme énergétique	Ø filtration
					J28		↗ métabolisme anaérobie ↘ défenses antioxydantes et antitoxiques, réserves énergétiques	Ø bioaccumulation Ø filtration ↗ enfouissement Ø mortalité

Tableau V : Biomarqueurs ayant permis la création des modèles PLS-DA. Seules les variables ayant un rôle significatif dans la création des modèles (VIP pour Variable Importance in the Projection) ont été prises en compte (VIP > 0.8). Pour chaque échelle de mesure, les réponses fortement impactées par les CeO₂ NM (bleu), par les CuO NM (rouge) ou par les deux NM (vert) ont été mises en couleur. TL : tail length, représente les dommages à ADN.

Exposition	Contaminant	Organe	Durée	Echelle cellulaire	Echelle moléculaire
CeO ₂ NMs 10 et 100 µg/L C. fluminea	NM-212	GD	0,2,6 jours		TL, ACP, Casp-3, GST, LDH, TAC, CAT
CuO NMs 20 et 100 µg/L C. fluminea	30nm-NP 12nm-NP	GD	1 jour 4 jours	TRI, LPO, ETS, TAC, ACP ETS, TAC, LDH, ACP	MRP1, Pgp, Cat, MnSOD, CuZnSOD, Se-GPx, Trxr, MT MT, Trxr, GSTpi, Pgp, HSP70, MRP1
CeO ₂ NMs 11 * 90,9 µg/L 1.5 psu C. fluminea	NM-212 Envirox™ Combusted Envirox™	BR GD	7 jour 14 jours 21 jours 28 jours 28 jours		MnSOD, MRP1, HSP70, β-actine, GABARAP, Pgp, GSTpi, Cat Se-GPx, HSP70, MT, Trxr, Cat, GSTpi, MnSOD, β-actine Se-GPx, HSP70, Cat, MRP1, MnSOD, CuZnSOD, β-actine, MT, GSTpi Se-GPx, MRP, HSP70, Trxr, MnSOD, GABARAP MnSOD, β-actine, Se-GPx, HSP70, MT, GSTpi
CeO ₂ NMs 11 * 90,9 µg/L 15 psu C. fluminea	NM-212 Envirox™ Combusted Envirox™	BR GD	7 jour 14 jours 21 jours 28 jours 28 jours		MRP1, HSP70, Se-GPx, Trxr, GABARAP, Pgp GSTpi, MRP1, Trxr, HSP70, CuZnSOD, MnSOD, Pgp, Se-GPx Se-GPx, GSTpi, MnSOD, GABARAP, CuZnSOD, MT, HSP70, MRP1 HSP70, β-actine, CuZnSOD, Pgp, GABARAP, MT Cat, GSTpi, GABARAP, CuZnSOD, MT, HSP70, β-actine
CuO NMs 12 x 4,2 µg/L 1.5 psu C. fluminea	CuO-NOAA CuO_Acryl_FP Acryl_FP	GD	14 jours 28 jours	SOD, ACP, MT, TRI, LDH, GST, ETS ETS, GST, SOD, MT, ACP, LDH, TRI	Cat, Se-GPx, Trxr, Pgp, MRP1, MT, MnSOD, CuZnSOD MnSOD, CuZnSOD, Cat, Gabarap, HSP90, BCL2, GSTpi, MRP1
CuO NMs 12 x 4,2 µg/L 15 psu S. plana	CuO-NOAA CuO_Acryl_FP Acryl_FP	GD	14 jours 28 jours	MT, LDH, GST, LPO, SOD, ACP, TRI LPO, GST, TRI, MT, ACP, ETS, LDH, SOD	TL TL

D. Nécessité de prendre en compte le cycle de vie des nanomatériaux pour l'évaluation de leurs effets

Alors qu'actuellement de nombreux projets de recherche visent à développer de nouveaux NM dans un but d'améliorer les produits quotidiens, les projets financés permettant de déterminer leurs effets toxiques sur l'environnement sont bien moins représentés. Les avancées dans le domaine des nanotechnologies ont toutefois permis l'acquisition de données fondamentales sur le devenir et la toxicité des NMM sous forme individuelle. Ces NMM ne représentent cependant qu'une faible partie des formes retrouvées dans l'environnement (Nowack et Mitrano, 2018). Les transformations qu'ils subissent (i) suite à leur incorporation dans le nanoproduct (NAP), (ii) suite à leur utilisation ou (iii) lors de leur fin de vie sont également à prendre en compte pour l'évaluation de leur risque. A ce jour, peu d'études ont été menées sur l'évaluation des effets des NMM le long de leur cycle de vie mais sont de plus en plus reconnues comme étant indispensables (Nowack et al., 2018 ; Selck et al., 2016 ; Holden et al., 2016 ; Bour et al., 2015).

L'une des originalités de l'ANR NanoSALT a été d'étudier les effets des NM issus de NAP tels que les Ag NM issus de pansements (Acticoat™), les CeO₂ NM issus d'un additif à carburant (Envirox™) et les CuO NM issu de peinture antisalissure (projet FP7 SUN). De façon quasiment systématique, les effets induits par l'exposition aux NAP ont été différents de ceux des NM libres. De ce fait, la composition de la matrice receveuse, la taille des contaminants, les modifications de surface des NM et leur dissolution devraient avoir un rôle essentiel dans la génération des effets. Finalement, les NAP ont été généralement moins bioaccumulés mais ont souvent induit des réponses plus prononcées que celles mesurées lors des expositions aux formes libres de NM. L'évaluation des effets des NAP semble alors indispensable à l'évaluation de leur risque puisque les nombreuses transformations des (i) NM lors de leur incorporation dans le NAP et (ii) des NAP au cours du temps, peuvent aboutir à des effets très distincts parfois même additifs, comme démontré au cours de ces travaux.

E. Complexification des milieux d'exposition : une étape clé pour l'évaluation du risque des nanomatériaux.

La difficulté de mesurer les concentrations en NMM dans les milieux naturels rend particulièrement complexe l'évaluation de leur risque directement dans l'environnement et conduit à la nécessité de mettre en place des expositions en laboratoire. L'exposition en laboratoire d'espèces prélevées dans l'environnement constitue généralement un stress pour les organismes. De ce fait, il peut être difficile de les maintenir dans de bonnes conditions sur de longues durées, perturbant l'évaluation des effets des substances à des échelles écologiquement parlantes. Comme démontré dans le chapitre I de ce manuscrit, les effets populationnels ou communautaires ont encore peu été déterminés chez les espèces aquatiques, et les effets sur les niveaux d'organisation biologique inférieurs ont majoritairement été observés sur les organismes modèles, généralement exposés à des concentrations très élevées en NM. Compte tenu de l'impact fort que peut avoir la concentration des NM sur leurs effets, mais également sur leurs caractéristiques physico-chimiques, l'évaluation de leur risque devrait être menée dans des conditions d'exposition plus réalistes. La particularité de ce travail de thèse a été de sélectionner des concentrations d'expositions relativement faibles comparées aux données dans la littérature, tout en permettant leur quantification dans les milieux d'exposition.

Les expositions ont dans un premier temps été réalisées en microcosmes, dont la taille et la composition des milieux permet de mettre en place des répliques et d'augmenter ainsi la reproductibilité des résultats. L'absence de nourriture ou de sédiment lors de ces expérimentations a permis de s'affranchir de facteurs confondants tels que l'ajout d'une voie d'entrée pour le contaminant (trophique) et des interactions entre les NM et ces composés. Ce mode d'exposition a permis de déterminer les effets des NM de façon précoce et de valider la sensibilité des réponses au niveau moléculaire et à l'échelle de l'organisme. Cependant, la mise en place de réglementations nécessite aussi l'évaluation des effets chroniques. Ainsi, l'évaluation des effets sur un plus long terme nécessite l'introduction de nourriture, qui peut modifier les réponses des organismes face aux contaminants. Bertrand et al. (2016) ont mis en évidence l'influence du régime alimentaire sur les réponses des bivalves *C. fluminea* et *S. plana* dès 2 jours. L'introduction de nourriture peut également affecter le comportement des NM et en conséquence leur biodisponibilité. Chez le poisson *Carassius auratus*, la présence de

nourriture a réduit la bioaccumulation de CuO NM et de ZnO NM (Ates et al., 2015) tandis que chez l'escargot *Lymnea stagnalis*, les CuO NM et les Ag NM ont été accumulés préférentiellement à travers la voie trophique (Croteau et al., 2011, 2014). Pour le bivalve *S. plana*, les Ag NM ont été plus fortement accumulés à travers la colonne d'eau qu'au travers de la voie trophique mais les effets ont été plus prononcés lorsque la contamination provenait de la voie trophique (Buffet et al., 2013). Chez *C. fluminea*, les Au NM ont été plus accumulés lors de l'exposition des organismes à la colonne d'eau, et ont également induits des effets moléculaires plus prononcés dans cette condition (Arini et al., 2019). De ce fait, la biodisponibilité et la toxicité des NM dans l'environnement naturel devraient être difficilement prédites à travers les études qui ne prennent pas en compte la source alimentaire. De plus, l'environnement naturel est bien plus complexe et sa composition impacte fortement le devenir et les effets des contaminants. Par exemple, la présence de sédiment permet la complexation de NM avec les particules sédimentaires, modifiant sa biodisponibilité pour les espèces aquatiques. Elle impacte également le comportement des organismes benthiques en comparaison avec les études en microcosmes puisqu'ils pourront avoir un comportement plus proche de celui observé dans l'environnement (bioturbation, enfouissement). Ainsi, la toxicité des NM est fortement dépendante de leur environnement. De ce fait, l'évaluation de leurs effets dans des expositions comportant plusieurs niveaux trophiques et/ou des milieux plus complexes est nécessaire. C'est pourquoi, de nombreux auteurs recommandent la mise en place d'exposition en mésocosmes (Bour et al., 2015; Holden et al., 2016). La mise en place de ces expositions permet aussi d'étudier les effets sur un temps plus long et dans des conditions plus réalistes d'un point de vue de l'environnement mais présente quelques désavantages. Par exemple, la mise en place d'une chaîne trophique et/ou d'un milieu plus complexe (sels, sédiment, marées...) mène à des interactions des NM et des organismes avec ces paramètres, ce qui rend plus difficile l'acquisition et l'interprétation des données. De plus, la mise en place et la gestion des mésocosmes est plus fastidieuse et plus coûteuse que pour les microcosmes, ce qui mène à un nombre limité voire à une absence de réplica. L'utilisation de milieux artificiels (eau, sédiment) est un bon moyen pour permettre une meilleure reproductibilité des expositions en mésocosmes et a également permis dans le cadre de nos études d'augmenter la salinité à travers l'apport d'ions similaires. Bien que la complexité de ces expositions soit encore loin des conditions environnementales,

elles ont procuré des informations essentielles sur le devenir et les effets des NMM et NAP sur les organismes aquatiques et sont par conséquent vivement recommandées.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le devenir et les effets écotoxicologiques des nanomatériaux (NM) et nanoproduits (NAP) à différentes étapes de leur cycle de vie sur deux espèces de bivalves endobenthiques vivant en eau douce (*C. fluminea*) et en eau marine (*S. plana*). Des expositions en microcosmes et en mésocosmes ont permis l'évaluation de ces paramètres dans des milieux de plus en plus complexes mais l'originalité de cette thèse repose surtout sur l'utilisation des outils moléculaires pour la détermination des effets chez *C. fluminea*.

Les réponses moléculaires ont été particulièrement sensibles aux différentes conditions expérimentales et ont mis en évidence des effets sur des voies peu étudiées aux échelles biologiques supérieures. D'après les résultats obtenus, des réponses liées à l'activité du système MXR, l'autophagie et les protéines de choc thermique ont été particulièrement impactées par ces NM. De plus, les expressions de gènes impliqués dans la réparation à l'ADN auraient été particulièrement intéressantes à mesurer dans le cadre de nos études compte tenu des dommages à l'ADN induits par les deux NM étudiés, mais les séquences ne sont pas encore disponibles pour cette espèce. L'un des inconvénients des mesures à l'échelle moléculaire réside dans la difficulté d'interprétation des résultats. L'évaluation conjointe du nombre de transcrits, de la quantité et de l'activité des protéines d'intérêt permettrait d'approfondir nos connaissances sur ces régulations. Cependant, la mise en place d'une telle approche chez *C. fluminea* nécessite encore quelques avancées dans ces domaines.

L'approche moléculaire a également mis en évidence les impacts de la salinité sur différents organes de *C. fluminea*. L'exposition des organismes à une salinité élevée (15 psu) a conduit à une réduction de la transcription de différents gènes dans les branchies et dans la glande digestive. L'élévation de salinité a aussi mené à une atténuation des réponses face aux contaminants au profit des réponses liées au stress salin. La capacité d'isolation des organismes pourrait avoir conduit à certaines réponses moléculaires mesurées ainsi qu'à la diminution de réponses face au contaminant, soulignant d'autant plus la nécessité de déterminer les réponses sur plusieurs échelles de mesures.

L'approche adoptée visait à mesurer les réponses de plusieurs marqueurs agissant à un même niveau d'organisation biologique et/ou à différents niveaux d'organisation biologique

(moléculaire, cellulaire, individuel), et est apparue particulièrement informatrice et indispensable pour une évaluation plus précise du risque des contaminants. Ce type d'approche doit être mise en place plus fréquemment pour le développement de l'approche AOP qui devrait procurer des informations essentielles sur les modes d'action menant aux effets toxiques et dont ces premiers travaux contribuent à l'accroissement des connaissances sur les premiers niveaux. Les différents marqueurs étudiés au cours de ces travaux au niveau moléculaire et cellulaire ont permis de se focaliser sur des voies classiquement impactées par les contaminants, mais leurs liens avec le niveau individuel sont relativement difficiles à évaluer. L'ajout de marqueurs plus étroitement reliés aux échelles biologiques supérieures, tel que l'acétylcholine estérase (AChE), pourrait ajouter de la compréhension entre les différentes échelles de mesures. De plus, l'évaluation des effets des NM sur des voies plus facilement transposables aux niveaux biologiques supérieurs, telles que celles liées à la reproduction, pourrait être un premier lien à effectuer.

Alors que les réponses moléculaires se sont révélées particulièrement sensibles aux différentes conditions d'exposition, les effets cellulaires ont plus rarement permis de distinguer les réponses des organismes exposés aux NM. Des comparaisons entre niveaux d'organisation biologique ont été effectuées sur les marqueurs communs mais n'ont pas présenté de corrélation. Certaines réponses mesurées à l'échelle moléculaire n'ont pas été possible de suivre à l'échelle cellulaire dans le cadre de cette thèse mais semblent particulièrement prometteuses à mesurer dans les études futures (MXR, autophagie) compte tenu des réponses acquises au cours de cette thèse et des informations recueillies dans la littérature.

L'ajout de mesures à l'échelle individuelle a permis d'approfondir nos connaissances sur l'exposition des organismes face aux contaminants. La filtration et le comportement d'enfouissement des organismes ont été particulièrement sensibles mais ont induit des difficultés d'interprétation. Il est important d'améliorer ces techniques de mesure en permettant leur mesure *in situ*. De plus, de fortes variations dans la filtration et la bioaccumulation des organismes ont également été observées, et auraient peut-être pu être réduites avec un nombre de réplicas plus important. Pour les études futures, il pourrait être pertinent de définir la variabilité des réponses intraspécifiques chez ces espèces afin de définir le nombre d'organismes adéquat pour l'obtention d'une vision fidèle des effets en prélevant le moins d'organismes possibles.

La bioaccumulation mesurée dans les tissus mous des organismes n'a pas systématiquement pu être reliée aux effets puisque les organismes ont répondu aux contaminations même en l'absence de bioaccumulation. Le temps de dépuración, la formation de pseudo-fèces ou les réponses comportementales des organismes tels que la réduction de la filtration et la fermeture de valves pourraient avoir contribué à ces observations et sont autant de facteurs qu'il serait pertinent d'étudier. L'évaluation des cinétiques d'accumulation et de dépuración de ces NM pourrait nous renseigner sur leurs capacités de prise en charge des NM et nous éclairer sur les différences de bioaccumulation observées entre ces espèces. L'utilisation de NM marqués serait également utile pour cette évaluation en permettant leur détection même lorsque les concentrations internes ne sont pas mesurables avec les techniques classiques.

Dans la colonne d'eau, les concentrations en NM ont été relativement faibles tandis que les fortes concentrations retrouvées sur la surface sédimentaire confirment leur présence en forte quantité au niveau des sédiments. De ce fait, les bivalves endobenthiques constituent de bons modèles d'étude dans le cadre de l'évaluation des effets des NM. D'après les dosages, la forme nanoparticulaire a été majoritaire pour chaque exposition mais la forme dissoute peut avoir contribué aux effets des CuO NM à 30 psu. De plus, les interactions des NM avec les matrices biologiques contribuent à des modifications de propriétés, qui peuvent également mener à davantage de dissolution. Il serait particulièrement enrichissant de localiser les NM dans les tissus des organismes, notamment via l'utilisation de microscopie hyperspectrale afin de déterminer si les formes nanoparticulaires sont présentes dans les tissus.

Différents paramètres sont alors à prendre en compte dans l'évaluation du devenir des NM tels que (i) leurs paramètres intrinsèques et leur préparation (composition, taille, forme, propriétés de surface, concentration...), (ii) la composition et les paramètres du milieu d'exposition (algues, sédiment, salinité, luminosité, pH...) et (iii) les propriétés des organismes. En milieu aquatique, les NM devraient se déposer sur les premiers millimètres de surface sédimentaire mais l'activité biologique des organismes telle que la bioturbation peut mener à la fois à leur remise en suspension dans la colonne d'eau et à leur incorporation dans des strates sédimentaires plus profondes. L'ajout de mesures dans les carottes de sédiment qui ont été réalisées à l'arrêt des mésocosmes pourrait nous procurer des informations supplémentaires sur la localisation des NM dans les dispositifs. Dans les études futures,

l'étude de dispositif abiotique permettrait de déterminer la part de l'activité biologique sur le comportement des NM.

Au cours de cette thèse, l'exposition des deux espèces de bivalves à des concentrations en NM et NAP de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ a eu des impacts à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, individuel). Des défenses ont été mises en place chez les organismes même en absence de bioaccumulation, et ont pu mener à des dommages (apoptose, génotoxicité) dans des expositions différentes (microcosmes, mésocosmes). Alors qu'il est encore difficile de déterminer si une exposition prolongée à ces contaminations mènera à des perturbations populationnelles ou écosystémiques, le niveau individuel a systématiquement été impacté. Des impacts à plus long terme sont alors à envisager. L'approche adoptée a également mis en avant la nécessité de prendre en compte les différentes formes de NM pouvant être rencontrées le long de leur cycle de vie pour l'évaluation de leur risque puisque les NAP ont induit des réponses différentes des NM, qui se sont parfois révélées additives. Les défenses mises en place par les bivalves semblent avoir été efficaces pour lutter contre ces contaminations lors de ces expérimentations, mais l'utilisation des réserves énergétiques et la synthèse de mécanismes de détoxification impactent leur allocation d'énergie, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leur croissance et leur reproduction dans des temps plus longs.

Alors que les bivalves ont été impactés par les NM et NAP, leur activité biologique peut participer au transfert des contaminants dans la chaîne trophique et à leurs transformations. La multitude de formes nouvelles synthétisées, de NAP créés et de leurs transformations biotiques et abiotiques pouvant intervenir au cours de leur cycle de vie complique l'évaluation de leur devenir et de leur risque et mène à un besoin supplémentaire d'études qu'il serait particulièrement judicieux de mener dans des conditions mimant au mieux l'environnement. Pour ces études futures, il serait important de développer des outils statistiques intégratifs qui permettront à la fois de créer une vision fidèle des effets et de faire avancer les problématiques de réglementations. Cette approche serait utile pour déterminer les effets des NM ainsi que pour l'évaluation des effets de différents types de stressors biotiques et abiotiques.

Références bibliographiques

- Adam, N., Vakurov, A., Knapen, D., Blust, R., 2015. The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials* 283, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.037>
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley Jr, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Hinton, D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28, 459–464.
- Adeleye, A.S., Oranu, E.A., Tao, M., Keller, A.A., 2016. Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint. *Water Research* 102, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.056>
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C. (Eds.), 2015. *Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M., 1993. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)(Bivalvia: Corbiculidae) in Europe.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment* 407, 1461–1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
- Ates, M., Arslan, Z., Demir, V., Daniels, J., Farah, I.O., 2015. Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of goldfish (*Carassius auratus*): Accumulation and Toxicity of CuO and ZnO NPs. *Environmental Toxicology* 30, 119–128. <https://doi.org/10.1002/tox.22002>
- Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiery, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO₂ nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water Research* 47, 3921–3930. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.063>

- Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., Rose, J., 2014. Long-term aging of a CeO₂ based nanocomposite used for wood protection. *Environmental Pollution* 188, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.016>
- Auffan, M., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Thill, A., Zeyons, O., Proux, O., Masion, A., Chaurand, P., Spalla, O., Botta, A., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology* 3, 161–171. <https://doi.org/10.1080/17435390902788086>
- Auffan, M., Tella, M., Liu, W., Pariat, A., Cabié, M., Borschneck, D., Angeletti, B., Landrot, G., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Rose, J., 2017. Structural and physical–chemical behavior of a CeO₂ nanoparticle based diesel additive during combustion and environmental release. *Environ. Sci.: Nano* 4, 1974–1980. <https://doi.org/10.1039/C7EN00494J>
- Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Thiéry, A., Bottero, J.-Y., 2015. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep05608>
- Baek, Y.-W., An, Y.-J., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of The Total Environment* 409, 1603–1608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>
- Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 186, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
- Balbi, T., Camisassi, G., Montagna, M., Fabbri, R., Franzellitti, S., Carbone, C., Dawson, K., Canesi, L., 2017. Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation. *Chemosphere* 186, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.120>
- 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*. *Science of The Total Environment* 493, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.146>
- Banni, M., Sforzini, S., Balbi, T., Corsi, I., Viarengo, A., Canesi, L., 2016. Combined effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: A transcriptomic and immunohistochemical study. *Environmental Research* 145, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.003>
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357–389.
- Batley, G.E., Halliburton, B., Kirby, J.K., Doolette, C.L., Navarro, D., McLaughlin, M.J., Veitch, C., 2013a. Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel

fuel catalyst: Characterization and risk of nano-CeO₂ as a diesel catalyst. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1896–1905. <https://doi.org/10.1002/etc.2246>

Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J., 2013b. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Accounts of Chemical Research* 46, 854–862. <https://doi.org/10.1021/ar2003368>

Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science* 218, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007>

Bertrand, C., Zalouk-Vergnoux, A., Giambérini, L., Poirier, L., Devin, S., Labille, J., Perrein-Ettajani, H., Pagnout, C., Châtel, A., Levard, C., Auffan, M., Mouneyrac, C., 2016. The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*: Salinity influences Ag NM-300K behavior and toxicity in clam. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 2550–2561. <https://doi.org/10.1002/etc.3428>

Bigot, A., Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F., 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.014>

Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2011. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology* 26, 623–632. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>

Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Toxicity of CeO₂ nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology* 1–11. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1053422>

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015b. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *Journal of Hazardous Materials* 283, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>

Brancotte, V., Vincent, T., 2002. L'INVASION DU RÉSEAU HYDROGRAPHIQUE FRANÇAIS PAR LES MOLLUSQUES CORBICULA SPP. MODALITÉ DE COLONISATION ET RÔLE PRÉPONDÉRANT DES CANAUX DE NAVIGATION. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 325–337. <https://doi.org/10.1051/kmae:2002038>

Braz-Mota, S., Campos, D.F., MacCormack, T.J., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2018. Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish

species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). Science of The Total Environment 630, 1168–1180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.216>

Brinch, A., Hansen, S., Hartmann, N., Baun, A., 2016. EU Regulation of Nanobiocides: Challenges in Implementing the Biocidal Product Regulation (BPR). Nanomaterials 6, 33. <https://doi.org/10.3390/nano6020033>

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*). Environmental Science & Technology 130110104824003. <https://doi.org/10.1021/es303513r>

Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere 84, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M.S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R., Wagner, S., 2018. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? Environmental Sciences Europe 30. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>

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., Frenzilli, G., Balbi, T., Bernardeschi, M., Ciacci, C., Corsolini, S., Della Torre, C., Fabbri, R., Faleri, C., Focardi, S., Guidi, P., Kočan, A., Marcomini, A., Mariottini, M., Nigro, M., Pozo-Gallardo, K., Rocco, L., Scarcelli, V., Smerilli, A., Corsi, I., 2014. Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 153, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.002>

Carregosa, V., Velez, C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2014. Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 177–178, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>

Castro, B.B., Silva, C., Macário, I.P.E., Oliveira, B., Gonçalves, F., Pereira, J.L., 2018. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. Aquatic Toxicology 196, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.002>

Châtel, A., Lièvre, C., Barrick, A., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2018. Transcriptomic approach: A promising tool for rapid screening nanomaterial-mediated toxicity in the marine bivalve *Mytilus edulis* —Application to copper oxide nanoparticles. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 205, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.01.003>

Chelomin, V.P., Slobodskova, V.V., Zakhartsev, M., Kukla, S., 2017. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus*. Journal of Ocean University of China 16, 339–345. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3133-y>

Chen, H., Zha, J., Liang, X., Bu, J., Wang, M., Wang, Z., 2013. Sequencing and De Novo Assembly of the Asian Clam (*Corbicula fluminea*) Transcriptome Using the Illumina GALLx Method. PLoS ONE 8, e79516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079516>

Chen, Q., Gong, B., Almasan, A., 2000. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. Cell Death Differ 7, 227–233. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400629>

Collin, B., Auffan, M., Johnson, A.C., Kaur, I., Keller, A.A., Lazareva, A., Lead, J.R., Ma, X., Merrifield, R.C., Svendsen, C., White, J.C., Unrine, J.M., 2014a. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. Environ. Sci.: Nano 1, 533–548. <https://doi.org/10.1039/C4EN00149D>

Collin, B., Auffan, M., Johnson, A.C., Kaur, I., Keller, A.A., Lazareva, A., Lead, J.R., Ma, X., Merrifield, R.C., Svendsen, C., White, J.C., Unrine, J.M., 2014b. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. Environ. Sci.: Nano 1, 533–548. <https://doi.org/10.1039/C4EN00149D>

Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Pereira, E., Freitas, R., 2018. Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety 147, 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.051>

Croteau, M.-N., Misra, S.K., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2014. Bioaccumulation and Toxicity of CuO Nanoparticles by a Freshwater Invertebrate after Waterborne and Dietborne Exposures. Environmental Science & Technology 48, 10929–10937. <https://doi.org/10.1021/es5018703>

D'Agata, A., Fasulo, S., Dallas, L.J., Fisher, A.S., Maisano, M., Readman, J.W., Jha, A.N., 2014. Enhanced toxicity of ‘bulk’ titanium dioxide compared to ‘fresh’ and ‘aged’ nano-TiO₂ in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Nanotoxicology 8, 549–558. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.807446>

Dahle, J.T., Arai, Y., 2015. Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. Int J Environ Res Public Health 12, 1253–1278. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201253>

Dale, J.G., Cox, S.S., Vance, M.E., Marr, L.C., Hochella, M.F., 2017. Transformation of Cerium Oxide Nanoparticles from a Diesel Fuel Additive during Combustion in a Diesel Engine. Environmental Science & Technology 51, 1973–1980. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03173>

de l'Anses, A., 2014. Enjeux et mise à jour des connaissances.

Di, Y., Aminot, Y., Schroeder, D.C., Readman, J.W., Jha, A.N., 2017. Integrated biological responses and tissue-specific expression of p53 and ras genes in marine mussels following exposure to benzo(α)pyrene and C 60 fullerenes, either alone or in combination. *Mutagenesis* 32, 77–90. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew049>

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.

Doyen, P., Morhain, E., Rodius, F., 1 Université du Littoral Côte d’Opale, Institut Charles Viollette, Equipe Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Boulevard du Bassin Napoléon, 62327 Boulogne-sur-Mer, France;, 2015. Modulation of metallothionein, pi-GST and Se-GPx mRNA expression in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* transplanted into polluted areas. *AIMS Environmental Science* 2, 333–344. <https://doi.org/10.3934/environsci.2015.2.333>

Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F., 2005. cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.02.013>

Duffee, N.E., n.d. Theme 1 Education Session 1.1 Refinement and reduction alternatives in education: Teaching humane science.

Eissa, N., Wang, H.-P., 2016. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* 8, 61–88. <https://doi.org/10.1111/raq.12081>

Fabbri, E., Valbonesi, P., Franzellitti, S., 2008. HSP expression in bivalves. *Invertebrate survival journal* 5, 135–161.

Fahmy, S.R., Sayed, D.A., 2017. Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. *Toxicology and Industrial Health* 33, 564–575. <https://doi.org/10.1177/0748233716687927>

Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Sokolova, I., Stoliar, O., 2015. The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants. *Aquatic Toxicology* 162, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.006>

Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Ivanina, A.V., Sokolova, I.M., Stoliar, O.B., 2018. Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. *Chemosphere* 193, 1127–1142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.079>

Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research* 76, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.003>

- Fan, X., Wang, C., Wang, P., Hu, B., Wang, X., 2018. TiO₂ nanoparticles in sediments: Effect on the bioavailability of heavy metals in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Hazardous Materials* 342, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.041>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.002>
- Feng, H.L., Sandlow, J.I., Sparks, A.E., 2001. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertility and sterility* 76, 1136–1139.
- Flora, S.J., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2, 191–206.
- Freitas, R., Coppola, F., De Marchi, L., Codella, V., Pretti, C., Chiellini, F., Morelli, A., Polese, G., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2018. The influence of Arsenic on the toxicity of carbon nanoparticles in bivalves. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.056>
- Freitas, R., De Marchi, L., Bastos, M., Moreira, A., Velez, C., Chiesa, S., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., 2017. Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators* 79, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.003>
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvé, S., Blaise, C., 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* 86, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.013>
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., 2013. Sublethal Effects of Silver Nanoparticles and Dissolved Silver in Freshwater Mussels. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 76, 479–490. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.779561>
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>
- 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*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>
- Garner, K.L., Keller, A.A., 2014. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research* 16. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2503-2>

- Girardello, F., Custódio Leite, C., Vianna Villela, I., da Silva Machado, M., Luiz Mendes Juchem, A., Roesch-Ely, M., Neves Fernandes, A., Salvador, M., Antonio Pêgas Henriques, J., 2016. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquatic Toxicology* 170, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.030>
- Golbamaki, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese Robinson, R.L., Benfenati, E., Leszczynski, J., Cronin, M.T.D., 2015. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale* 7, 2154–2198. <https://doi.org/10.1039/C4NR06670G>
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013a. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 84, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2014. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology* 155, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.015>
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2013b. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquatic Toxicology* 136–137, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.021>
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 118–119, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>
- Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology* 45, 9356–9362. <https://doi.org/10.1021/es200955s>
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholm, J., Christensen, F., Nowack, B., 2015. Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 5581–5602. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505581>
- Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* 181, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003>
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 287–303.
- Hanna, S., Miller, R., Lenihan, H., 2014. Accumulation and Toxicity of Copper Oxide Engineered Nanoparticles in a Marine Mussel. *Nanomaterials* 4, 535–547. <https://doi.org/10.3390/nano4030535>

Holden, P.A., Gardea-Torresdey, J.L., Klaessig, F., Turco, R.F., Mortimer, M., Hund-Rinke, K., Cohen Hubal, E.A., Avery, D., Barceló, D., Behra, R., Cohen, Y., Deydier-Stephan, L., Ferguson, P.L., Fernandes, T.F., Herr Harthorn, B., Henderson, W.M., Hoke, R.A., Hristozov, D., Johnston, J.M., Kane, A.B., Kapustka, L., Keller, A.A., Lenihan, H.S., Lovell, W., Murphy, C.J., Nisbet, R.M., Petersen, E.J., Salinas, E.R., Scheringer, M., Sharma, M., Speed, D.E., Sultan, Y., Westerhoff, P., White, J.C., Wiesner, M.R., Wong, E.M., Xing, B., Steele Horan, M., Godwin, H.A., Nel, A.E., 2016. Considerations of Environmentally Relevant Test Conditions for Improved Evaluation of Ecological Hazards of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 50, 6124–6145. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00608>

Hua, J., Vijver, M.G., Ahmad, F., Richardson, M.K., Peijnenburg, W.J.G.M., 2014. Toxicity of different-sized copper nano- and submicron particles and their shed copper ions to zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem* 33, 1774–1782. <https://doi.org/10.1002/etc.2615>

Hughes, R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 805. <https://doi.org/10.1017/S0025315400037309>

Hull, M.S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.-Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J., 2011. Filter-Feeding Bivalves Store and Biodeposit Colloidally Stable Gold Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 45, 6592–6599. <https://doi.org/10.1021/es200809c>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jeong, C.-B., Kim, H.-S., Kang, H.-M., Lee, J.-S., 2017. ATP-binding cassette (ABC) proteins in aquatic invertebrates: Evolutionary significance and application in marine ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 185, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.013>

Jo, H.J., Choi, J.W., Lee, S.H., Hong, S.W., 2012. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of Hazardous Materials* 227–228, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.066>

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell. Sci.* 117, 2805–2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>

Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.-C., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro* 23, 1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>

Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2015. Mechanisms of Toxicity of Ag Nanoparticles in Comparison to Bulk and Ionic Ag on Mussel Hemocytes and Gill Cells. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129039>

Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2014. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the

mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 153, 39–52.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.003>

Katsumiti, A., Thorley, A.J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T.D., Cajaraville, M.P., 2018. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. Toxicology in Vitro 48, 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.013>

Kaweeteerawat, C., Chang, C.H., Roy, K.R., Liu, R., Li, R., Toso, D., Fischer, H., Ivask, A., Ji, Z., Zink, J.I., Zhou, Z.H., Chanfreau, G.F., Telesca, D., Cohen, Y., Holden, P.A., Nel, A.E., Godwin, H.A., 2015. Cu Nanoparticles Have Different Impacts in Escherichia coli and Lactobacillus brevis than Their Microsized and Ionic Analogues. ACS Nano 9, 7215–7225.
<https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02021>

Keller, A.A., Adeleye, A.S., Conway, J.R., Garner, K.L., Zhao, L., Cherr, G.N., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., Godwin, H.A., Hanna, S., Ji, Z., Kaweeteerawat, C., Lin, S., Lenihan, H.S., Miller, R.J., Nel, A.E., Peralta-Videa, J.R., Walker, S.L., Taylor, A.A., Torres-Duarte, C., Zink, J.I., Zuverza-Mena, N., 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. NanoImpact 7, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

Keller, A.A., Lazareva, A., 2014. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. Environmental Science & Technology Letters 1, 65–70.
<https://doi.org/10.1021/ez400106t>

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. Journal of Nanoparticle Research 15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>

Khan, I., Saeed, K., Khan, I., 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Carley, S., Handy, R.D., Kapustka, L., Nowack, B., Kammer, F. von der, 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 3–14.
<https://doi.org/10.1002/etc.733>

Klaper, R., Arndt, D., Bozich, J., Dominguez, G., 2014. Molecular interactions of nanomaterials and organisms: defining biomarkers for toxicity and high-throughput screening using traditional and next-generation sequencing approaches. The Analyst 139, 882–895.
<https://doi.org/10.1039/C3AN01644G>

Kramer-Wilt, E., n.d. *Corbicula fluminea* (OF Müller, 1774)—Asian Clam.

Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.-N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K., 2018. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. Environmental Toxicology and Chemistry 37, 2029–2063.
<https://doi.org/10.1002/etc.4147>

Lee, S., Kim, S.M., Lee, R.T., 2013. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal* 18, 1165–1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>

Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.001>

Liu, H.H., Cohen, Y., 2014. Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 48, 3281–3292. <https://doi.org/10.1021/es405132z>

Ma, P., Schwarten, M., Schneider, L., Boeske, A., Henke, N., Lisak, D., Weber, S., Mohrlüder, J., Stoldt, M., Strodel, B., Methner, A., Hoffmann, S., Weiergräber, O.H., Willbold, D., 2013. Interaction of Bcl-2 with the Autophagy-related GABAA Receptor-associated Protein (GABARAP). *J Biol Chem* 288, 37204–37215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528067>

Magdolenova, Z., Richard Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., 2013. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>

Marie, T., Mélanie, A., Lenka, B., Julien, I., Isabelle, K., Christine, P., Elise, M., Catherine, S., Bernard, A., Ester, A., Jérôme, R., Alain, T., Jean-Yves, B., 2014. Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environmental Science & Technology* 48, 9004–9013. <https://doi.org/10.1021/es501641b>

Marisa, I., Matozzo, V., Munari, M., Binelli, A., Parolini, M., Martucci, A., Franceschinis, E., Brianese, N., Marin, M.G., 2016. In vivo exposure of the marine clam *Ruditapes philippinarum* to zinc oxide nanoparticles: responses in gills, digestive gland and haemolymph. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 15275–15293. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6690-5>

Martínez-García, S., Fernández, E., Aranguren-Gassis, M., Teira, E., 2009. In vivo electron transport system activity: a method to estimate respiration in natural marine microbial planktonic communities. *Limnology and Oceanography: Methods* 7, 459–469.

Moëzzi, F., Hedayati, S.A., Ghadermazi, A., 2018. Ecotoxicological impacts of exposure to copper oxide nanoparticles on the gill of the Swan mussel, *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Research* 38, 187–197. <https://doi.org/10.1080/13235818.2018.1441591>

Mouneyrac, C., Durou, C., Péry, A., 2012. Consequences of energy metabolism impairments. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, CRC Press, Boca Raton, FL 307–326.

Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Métais, I., Durou, C., Minier, C., Pellerin, J., 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of

contamination. General and Comparative Endocrinology 157, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.04.010>

Mouthon, J., 2000. Répartition du genre *Corbicula* Megerle von Mühlfeld (Bivalvia: Corbiculidae) en France à l'aube du XXI^e siècle. Hydroécologie appliquée 12, 135–146.

Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sanders, M.B., Christian, P., Nigro, M., Lyons, B.P., 2014. Genotoxic effects of Ag₂S and CdS nanoparticles in blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes. Chemistry and Ecology 30, 719–725. <https://doi.org/10.1080/02757540.2014.894989>

Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas Del Castillo, E., 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 29.

Mustacich, D., Powis, G., 2000. Thioredoxin reductase. Biochem J 346, 1–8.

Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. Aquatic Toxicology 122–123, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.008>

Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). Environment International 31, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.05.007>

Nowack, B., Baalousha, M., Bornhöft, N., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Cotterill, J., Gondikas, A., Hassellöv, M., Lead, J., Mitrano, D.M., von der Kammer, F., Wontner-Smith, T., 2015. Progress towards the validation of modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials by analytical measurements. Environmental Science: Nano 2, 421–428. <https://doi.org/10.1039/C5EN00100E>

Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F., Jäättelä, M., 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7871–7876.

O'Brien, N.J., Cummins, E.J., 2011. A risk assessment framework for assessing metallic nanomaterials of environmental concern: Aquatic exposure and behavior. Risk Analysis 31, 706–726. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01540.x>

Pan, J.-F., Buffet, P.-E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Joubert, Y., Pilet, P., Guibbolini, M., Risso de Faverney, C., Roméo, M., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2012. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. Environmental Pollution 168, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.051>

Pang, C., Selck, H., Banta, G.T., Misra, S.K., Berhanu, D., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., Forbes, V.E., 2013. Bioaccumulation, toxicokinetics, and effects of copper from sediment spiked with aqueous Cu, nano-CuO, or micro-CuO in the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*. Environ Toxicol Chem 32, 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/etc.2216>

- Park, B., Martin, P., Harris, C., Guest, R., Whittingham, A., Jenkinson, P., Handley, J., 2007. Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of Envirox™ – a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. *Particle and Fibre Toxicology* 4, 12. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-12>
- Park, E.-J., Choi, J., Park, Y.-K., Park, K., 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 245, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.022>
- Payne, S.H., 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci* 40, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.010>
- Peng, C., Shen, C., Zheng, S., Yang, W., Hu, H., Liu, J., Shi, J., 2017a. Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials* 7, 326. <https://doi.org/10.3390/nano7100326>
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y., Chen, Y., 2017b. Behavior and Potential Impacts of Metal-Based Engineered Nanoparticles in Aquatic Environments. *Nanomaterials* 7, 21. <https://doi.org/10.3390/nano7010021>
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* 210, 2999–3014. <https://doi.org/10.1242/jeb.006007>
- Philipp, E.E.R., Wessels, W., Gruber, H., Strahl, J., Wagner, A.E., Ernst, I.M.A., Rimbach, G., Kraemer, L., Schreiber, S., Abele, D., Rosenstiel, P., 2012. Gene Expression and Physiological Changes of Different Populations of the Long-Lived Bivalve *Arctica islandica* under Low Oxygen Conditions. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044621>
- Piermarini, P.M., Evans, D.H., 2000. Effects of environmental salinity on Na (+)/K (+)-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology* 203, 2957–2966.
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>
- Ramskov, T., Thit, A., Croteau, M.-N., Selck, H., 2015. Biodynamics of copper oxide nanoparticles and copper ions in an oligochaete – Part I: Relative importance of water and sediment as exposure routes. *Aquatic Toxicology* 164, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.022>
- Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Mornet, S., Brisson, A., 2008. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bull* 41, 116–126. <https://doi.org/10.1007/BF03216589>

Revel, M., Châtel, A., Mouneyrac, C., 2017. Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? *Aquatic Toxicology* 193, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.005>

Rhee, J.-S., Won, E.-J., Kim, R.-O., Lee, J., Shin, K.-H., Lee, J.-S., 2011. Expression of superoxide dismutase (SOD) genes from the copper-exposed polychaete, *Neanthes succinea*. *Marine Pollution Bulletin* 63, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.023>

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. *Marine Environmental Research* 111, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>

Ruiz, P., Katsumiti, A., Nieto, J.A., Bori, J., Jimeno-Romero, A., Reip, P., Arostegui, I., Orbea, A., Cajaraville, M.P., 2015. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 111, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.018>

Runowski, M., 2014. Nanotechnology–nanomaterials, nanoparticles and multifunctional core/shell type nanostructures. *Chemik* 68, 766–775.

Santos, S., Luttikhuisen, P.C., Campos, J., Heip, C.H.R., van der Veer, H.W., 2011. Spatial distribution patterns of the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along the European coast: A review. *Journal of Sea Research* 66, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.07.001>

Selck, H., Handy, R.D., Fernandes, T.F., Klaine, S.J., Petersen, E.J., 2016. Nanomaterials in the aquatic environment: An EU-USA perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities and challenges ahead. *Environ Toxicol Chem* 35, 1055–1067. <https://doi.org/10.1002/etc.3385>

Sellami, B., Mezni, A., Khazri, A., Bouzidi, I., Saidani, W., Sheehan, D., Beyrem, H., 2017. Toxicity assessment of ZnO-decorated Au nanoparticles in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 188, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.005>

Shaw, B.J., Al-Bairuty, G., Handy, R.D., 2012. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology* 116–117, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.032>

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360, 1–16.

Simmons, D.B.D., Benskin, J.P., Cosgrove, J.R., Duncker, B.P., Ekman, D.R., Martyniuk, C.J., Sherry, J.P., 2015. Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects: Variability of omics data in aquatic ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1693–1704. <https://doi.org/10.1002/etc.3002>

Singh, C., Friedrichs, S., Ceccone, G., Gibson, N., Alstrup Jensen, K., Levin, M., Goenaga Infante, H., Carlander, D., Rasmussen, K., Institute for Health and Consumer Protection, 2014. Cerium Dioxide NM-211, NM-212, NM-213, characterisation and test item preparation JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials. Publications Office, Luxembourg.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>

Singh, S., 2016. Cerium oxide based nanozymes: Redox phenomenon at biointerfaces. *Biointerphases* 11, 04B202. <https://doi.org/10.1116/1.4966535>

Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>

Song, L., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., Galloway, T.S., Tyler, C.R., 2015. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere* 139, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.021>

Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 44, 85–94. <https://doi.org/10.1051/limn:2008017>

Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol* 9, 20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20>

Tavares, K.P., Caloto-Oliveira, A., Vicentini, D.S., Melegari, S.P., Matias, W.G., Barbosa, S., Kummrow, F., 2014. Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 9, 43–50. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.006>

Taze, C., Panetas, I., Kalogiannis, S., Feidantsis, K., Gallios, G.P., Kastrinaki, G., Konstandopoulos, A.G., Václavíková, M., Ivanicova, L., Kaloyianni, M., 2016. Toxicity assessment and comparison between two types of iron oxide nanoparticles in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 172, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.013>

Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., Sawamura, M., 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-[3-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical biochemistry* 251, 206–209.

Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28, 711–717.

Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015. Behavioral and mortality responses of the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule* to temperature, as indicator of climate change's potential impacts. *Ecological Indicators* 58, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.042>

Vidal, M.-L., Rouimi, P., Debrauwer, L., Narbonne, J.-F., 2002. Purification and characterisation of glutathione S-transferases from the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131, 477–489.

Volland, M., Blasco, J., Hampel, M., 2017. Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary *Ruditapes philippinarum* hemocytes. *Aquatic Toxicology* 185, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.003>

Volland, M., Hampel, M., Martos-Sitcha, J.A., Trombini, C., Martínez-Rodríguez, G., Blasco, J., 2015. Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: uptake, elimination and oxidative stress response. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 17414–17424. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4718-x>

Wakefield, G., Wu, X., Gardener, M., Park, B., Anderson, S., 2008. Envirox™ fuel-borne catalyst: Developing and launching a nano-fuel additive. *Technology Analysis & Strategic Management* 20, 127–136. <https://doi.org/10.1080/09537320701726825>

Wang, Y., Nowack, B., 2018a. Environmental risk assessment of engineered nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots: Environmental risk assessment of engineered nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 1387–1395. <https://doi.org/10.1002/etc.4080>

Wang, Y., Nowack, B., 2018b. Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots in seven European regions. *Environmental Pollution* 235, 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.004>

Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 68, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>

Way, C.M., Hornbach, D.J., Miller-Way, C.A., Payne, B.S., Miller, A.C., 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Canadian Journal of Zoology* 68, 115–120. <https://doi.org/10.1139/z90-016>

Xie, Y., 2017. Molecular characterization of the HSP70 and HSP90 genes in Asian clam (*Corbicula fluminea*) and their expression analysis during heavy metal exposure. *Gene Reports* 7, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.01.002>

Xie, Y., Chen, H., Zheng, S., Zhang, X., Mu, S., 2018. Molecular characterization of cu/Zn SOD gene in Asian clam *Corbicula fluminea* and mRNA expression and enzymatic activity

modulation induced by metals. Gene 663, 189–195.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.044>

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>

Zhang, J., Zou, Z., Wang, B., Xu, G., Wu, Q., Zhang, Y., Yuan, Z., Yang, X., Yu, C., 2018. Lysosomal deposition of copper oxide nanoparticles triggers HUVEC cells death. *Biomaterials* 161, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.048>

Zhang, Y., Zhou, Q., Ke, C.-H., Huang, H.-Q., 2014. Cloning and expression analysis of γ -aminobutyrate type A receptor-associated protein (GABARAP) in Asiatic hard clam, *Meretrix meretrix*. *Aquaculture* 432, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.025>

Résumé

Les nanotechnologies sont en plein essor et mènent à l'incorporation de nanomatériaux manufacturés (NMM) dans les produits d'usage courant. La synthèse de NMM et l'utilisation des produits en contenant conduit au rejet dans l'environnement de NMM pour lesquels le risque n'est pas encore connu. Les propriétés physico-chimiques particulières des NMM rendent difficile l'évaluation de leur toxicité qui reste encore actuellement non complètement élucidée. Cette thèse est intégrée au projet ANR NanoSalt (2013 - 2017) et vise à évaluer le devenir et les effets de NMM de dioxyde de cérium et d'oxyde de cuivre sur deux espèces de bivalves représentatives des eaux douces (*Corbicula fluminea*) et des eaux marines (*Scrobicularia plana*). Les organismes ont été exposés à des concentrations réalistes de ces NMM à différentes étapes de leur cycle de vie et ce, à travers la mise en place d'expositions de plus en plus proches des conditions environnementales (micro- et mésocosmes). Actuellement, très peu d'études de nanotoxicologie ont adopté une approche de biologie moléculaire pour évaluer et comprendre les effets des NMM chez les invertébrés, particulièrement chez les espèces non séquencées. Un des objectifs de la thèse était d'utiliser l'approche de qPCR pour évaluer la perturbation de l'expression de gènes par les NMM. Ce travail a permis de déterminer le devenir et le comportement des NMM dans les différentes conditions d'exposition. L'évaluation des effets des NMM a été réalisée à différents niveaux biologiques (moléculaire, cellulaire, individuel). L'utilisation d'outils de statistiques multivariées s'est révélée particulièrement utile pour analyser les variations d'expression des nombreux gènes ciblés. L'approche multi-marqueurs sur plusieurs niveaux biologiques a permis l'intégration d'un grand nombre de données qui a généralement permis de départager les effets des différentes formes de NMM.

Mots-clés

nanomatériaux (NM), *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, micro-mésocosmes, dioxyde de cérium (CeO_2), oxyde de cuivre (CuO), biologie moléculaire.

Abstract

Nanotechnology is constantly evolving and leads to the incorporation of engineered nanomaterials (ENM) into daily commercial products. The synthesis of ENM and the use of products containing those ENM leads to their release in the environment but the risk of ENM is not yet known. The particular physico-chemical properties of ENM makes the evaluation of their toxicity particularly difficult and still not completely solved now. This thesis is integrated to the ANR NanoSALT (2013-2017) and aims to evaluate the fate and the effects of cerium dioxide and copper oxide ENM in two bivalve species representative of freshwaters (*Corbicula fluminea*) and of seawaters (*Scrobicularia plana*). The organisms were exposed to realistic concentrations of these ENM at different stage of their life-cycle, and through the setting up of exposure increasingly closed to environmental conditions (micro- and mesocosms). Nowadays, few nanotoxicology studies have adopted an approach of molecular biology for the evaluation and the comprehension of ENM effects in invertebrates, and more particularly in non-sequenced species. One of the objective of the thesis was to use the qPCR approach for the evaluation of the gene expression perturbation by ENM. This work allowed to determine the fate and the behavior of ENM in the different exposure conditions. The evaluation of ENM effects has been done at different biological scales (molecular, cellular, individual). The use of multivariate statistical tools has been particularly useful for the analysis of the expression variations of the targeted genes. The multi-marker approach at different biological scales allowed the integration of a lot of data, which generally allowed us to differentiate the effects of the different forms of ENM.

Key-words

nanomaterials (NM), *Corbicula fluminea*, *Scrobicularia plana*, micro-mesocosms, cerium dioxide (CeO_2), copper oxyde (CuO), molecular biology.