

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

**ECOTOXICITE DE NANOTUBES DE CARBONE MONO-PAROI CHEZ
DES INVERTÉBRÉS AQUATIQUES : influence de facteurs abiotiques**

Par
Messika Revel

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
En biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et	Cathy Vaillancourt
Examinateur interne	INRS- Institut Armand Frappier
Examinateur externe	Amélie Châtel Université Catholique de l'Ouest
Examinateur externe	Gaëlle Triffault-Bouchet Centre d'Expertise et Analyse Environnementale du Québec
Directeur de recherche	Pierre Yves Robidoux INRS-Institut Armand Frappier
Codirecteur de recherche	Michel Fournier INRS-Institut Armand Frappier

« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, mais parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles ». - Sénèque

RÉSUMÉ

Ces dernières années, la production et l'utilisation des nanomatériaux se sont accrues. En effet, de nombreux secteurs peuvent tirer des bénéfices de l'incorporation de nanomatériaux dans leurs produits tels que l'électronique, le pharmaceutique ou encore la cosmétique. Parmi les nanomatériaux, les nanotubes de carbone tiennent une place importante. Ils sont déjà présents dans du matériel électronique et sportif et l'on envisage de les utiliser pour l'élimination des contaminants présents dans l'eau ou encore pour la vectorisation de molécules thérapeutiques. La présence des nanomatériaux dans l'environnement va donc augmenter et il est primordial d'évaluer leurs effets toxiques potentiels sur les organismes susceptibles de se retrouver en contact avec eux.

Ce projet de recherche avait pour but d'étudier l'écotoxicité des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) et l'influence de divers paramètres extérieurs, à l'aide de trois organismes aquatiques : l'amphipode *Hyalella azteca*, la daphnie *Daphnia magna* et la moule *Elliptio complanata*. Pour la réalisation des travaux, 3 sous-objectifs ont été définis : 1) déterminer l'influence de facteurs abiotiques sur la toxicité des nanotubes de carbone ; 2) étudier les effets *indirects* des nanotubes de carbone par une étude préliminaire des effets de l'adsorption d'un métal毒ique sur les organismes présents dans le milieu, à l'aide de tests de toxicité ; et 3) mesurer les effets sous-létaux des nanotubes de carbone seuls et co-exposé à un métal毒ique à l'aide de biomarqueurs cellulaires et moléculaires.

Les résultats obtenus ont révélé une diminution de la survie et de la croissance des hyalelles exposées aux nanotubes de carbone mono-paroi en fonction de la durée d'exposition. De plus, nous avons constaté que la présence de sédiment artificiel, non contaminé, diminuait la toxicité des nanotubes de carbone bruts dispersés dans le milieu d'exposition. La deuxième partie du projet nous a permis de calculer un faible taux d'adsorption du cadmium par les SWCNT (24,4 mg Cd /kg SWCNT). De plus, la présence de nanotubes de carbone bruts à une concentration non toxicique (500 ou 1 000 µg/L) a augmenté la toxicité du cadmium pour la daphnie *D. magna* d'un facteur 2. Nous avons donc poursuivi l'étude des effets indirects des SWCNT, et, la dernière partie du projet a permis d'observer que les nanotubes de carbone bruts et purifiés avaient la capacité d'induire des dommages à l'ADN et qu'il existait un effet potentialisateur des nanotubes de carbone vis-à-vis du cadmium à de faibles concentrations (500 µg/L pour les SWCNT et 20 µg/L pour le Cd). Par contre, aucun effet n'a été observé au niveau du stress oxydant et des paramètres immunitaires.

L'ensemble de ces résultats nous indique la complexité de l'étude des effets écotoxicologiques des nanomatériaux et l'importance de considérer les facteurs environnementaux, en particulier la présence des sédiments et celle de contaminants. De plus, ce travail met en avant l'intérêt d'utiliser des approches complémentaires. Nos résultats indiquent qu'il est essentiel de caractériser les nanomatériaux étudiés et notamment l'état d'agglomération. Enfin, généralement, tout comme dans la première partie de ce travail, les effets toxiques directs sont mesurés à des concentrations élevées. Ces concentrations sont éloignées de celles qui sont estimées dans l'environnement. Par contre, les effets indirects via les interactions avec d'autres contaminants peuvent intervenir à des concentrations beaucoup plus faibles. Dans le futur, il serait pertinent de poursuivre l'étude des effets d'interactions entre les nanotubes de carbone et les contaminants présents dans le milieu aquatique tels que les métaux ou les composants organiques.

Messika Revel

Etudiant

Pierre Yves Robidoux

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Ces 3 ans et demi de thèse auront été très formateurs et tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes notamment les membres de l'ancienne équipe d'écotoxicologie appliquée du CNRC et d'immunotoxicologie de l'environnement de l'INRS Institut Armand Frappier.

Je tiens d'abord à remercier le docteur Pierre Yves Robidoux, pour toute la confiance qu'il m'a accordé et surtout la liberté qui m'a été donnée. La réalisation de ce projet m'a permis d'acquérir une grande autonomie. Un grand merci au professeur Michel Fournier pour son aide et son soutien tout au long du projet.

Merci aux membres du jury : Professeur Cathy Vaillancourt, Docteur Amélie Châtel et Docteur Gaëlle Triffault-Bouchet d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie du fond du cœur tous les chercheurs et techniciens de l'équipe d'écotox du CNRC qui à un moment ou à un autre sont passés par le labo ou mon bureau : Geoffrey Sunahara, thank you for making me see the big picture, Mahsa Hamzeh, Heather McShane, Sylvie Rocheleau et spécialement Sabine Dodard et Manon Sarrazin pour leur aide quasi quotidienne au laboratoire et leur soutien moral. Un grand merci à trois d'entre eux qui ont dû quitter le navire : Julie Dumas, Nicolas Besnier et Kathleen Savard et qui m'ont beaucoup aidé pour les expériences et l'entretien des organismes. Kathleen, merci pour toutes nos discussions non scientifiques !! Merci aussi à Etienne Bernier (pour les soirées !) et Chantale Lavigne pour ses conseils. Merci aux étudiants stagiaires et particulièrement à l'étudiant de Master Florent Tarroux. Merci à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien dans les périodes difficiles : un grand merci à Fanny Monteil-Rivera, Punita Mehta, Fréderique Matteau Lebrun et Denis Rho. Merci aux jeunes Français exilés comme moi en terre québécoise : François Orcet et Camille Chiron. Merci à Zohra Omouri avec qui j'ai partagé mon bureau et mes directeurs de thèse (et les galères) : COURAGE, BIENTÔT LA FIN !

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire du professeur Michel Fournier de l'Institut Armand-Frappier : Pauline Brousseau-Fournier et Marlène Fortier pour son soutien et son aide précieuse sur les manips de moules et l'utilisation du cytomètre. Un grand merci à tous les étudiants du labo : Christine Kleinert pour son aide sur les articles, Emilie Lacaze pour ses conseils, Pierre-Luc Cloutier, Alexandre Beaudry, Julie Pedelucq et Lauris Evariste. Merci à tous pour votre bonne humeur et votre soutien !! Merci aussi aux étudiants de l'institut croisé en

route et particulièrement à Fabrice, Audrey-Anne, Hermance et Sophie pour leurs encouragements !

Merci aussi aux étudiants bénévoles rencontrés au congrès de la SETAC et particulièrement à Ewa, Claudia, Paula, Bettina and the EAWAG team ! Thank you for your encouragments !

Je dois aussi remercier tous mes précédents superviseurs et directeurs de stage qui m'ont tous beaucoup appris sur le métier de chercheur. Un grand merci à Patrick Doncaster et Martin Skov pour m'avoir initié au terrain. Un énorme merci au professeur Alain Dejean qui m'a porté à mes tout débuts et dont j'ai énormément appris. Merci à Olivier Roux qui m'a aussi beaucoup éclairé sur les côtés « pratiques » du métier. Merci à Mathieu Molet et Françoise Vincent-Hubert qui m'a initiée à l'écotoxicologie aquatique !

Je tiens aussi à remercier les amis en France : Estelle, Erwan, Malory, Charles et Amélie qui ont su se montrer disponible lors de mes (trop courts) retours en France ! Je remercie ma famille pour son soutien et particulièrement ma mère qui n'a jamais remis en cause mes choix et qui m'a toujours laissé suivre la voie de la recherche sans me faire douter. Merci pour tout maman !

Enfin, je souhaite remercier celui qui m'a aidé à garder les pieds sur terre et me pousse toujours à être le meilleur de moi-même. Merci Raphaël de m'avoir suivi dans cette aventure. Merci d'être resté malgré les épreuves et merci de m'aider à ne pas perdre de vue mon objectif. Cette thèse, c'est aussi la tienne...

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE	3
1 LES NANOMATÉRIAUX	4
1.1 GÉNÉRALITÉS	4
1.1.1 <i>Définition.....</i>	4
1.1.2 <i>Source des nanomatériaux.....</i>	5
1.1.3 <i>Présence sur le marché</i>	5
1.2 LES NANOTUBES DE CARBONE	7
1.2.1 <i>Définition.....</i>	7
1.2.2 <i>Méthodes de synthèse.....</i>	7
1.2.3 <i>Modifications chimiques : la purification</i>	9
1.2.4 <i>Mise en suspension des nanotubes de carbone.....</i>	10
1.2.5 <i>Propriétés et applications.....</i>	11
1.3 ECOTOXICITÉ DES NANOTUBES DE CARBONE	13
1.3.1 <i>Introduction dans l'environnement.....</i>	13
1.3.2 <i>Toxicité directe des nanotubes de carbone</i>	16
1.3.3 <i>Caractéristique influençant la toxicité des nanotubes de carbone : l'agglomération</i>	21
1.3.4 <i>Interaction avec des contaminants.....</i>	23
2 LES MÉTHODES D'ÉVALUATION EN ÉCOTOXICOLOGIE	27
2.1 LES BIOESSAIS OU TESTS DE TOXICITÉ	27
2.1.1 <i>Les tests de toxicité aiguë</i>	28
2.1.2 <i>Les tests de toxicité chronique.....</i>	28
2.2 LES BIOMARQUEURS.....	30
2.2.1 <i>Le système immunitaire des mollusques.....</i>	32
2.2.2 <i>Le stress oxydant.....</i>	33
2.2.3 <i>Détection des lésions à l'ADN avec le test comète.....</i>	36
3 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	39
4 PLAN EXPERIMENTAL	40
4.1 MODÈLES BIOLOGIQUES	40
4.1.1 <i>L'amphipode d'eau douce <i>Hyalella azteca</i>.....</i>	41
4.1.2 <i>La daphnie <i>Daphnia magna</i></i>	42
4.1.3 <i>La moule d'eau douce <i>Elliptio complanata</i>.....</i>	44

4.2	CHOIX, PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES NTC	46
4.2.1	<i>Choix des SWCNT.....</i>	46
4.2.2	<i>Préparation des solutions</i>	47
4.2.3	<i>Caractérisation</i>	47
4.3	LES TESTS DE TOXICITÉ UTILISÉS	47
4.4	EFFET INDIRECT, ÉTUDE DES INTÉRACTIONS	49
4.5	CHOIX DES BIOMARQUEURS	49
CHAPITRE 2 : ARTICLES		51
ARTICLE 1 : SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES TOXICITY TO THE FRESHWATER AMPHIPOD <i>HYALELLA AZTECA</i> : INFLUENCE OF SEDIMENT AND EXPOSURE DURATION.....		52
RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	52	
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	53	
ARTICLE 2 : CADMIUM TOXICITY IN THE PRESENCE OF SINGLE WALLED CARBON NANOTUBE TO THE CRUSTACEAN <i>DAPHNIA MAGNA</i>		68
RESUME FRANÇAIS.....	68	
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	69	
ARTICLE 3 : PRELIMINARY STUDY OF SWCNT GENOTOXICITY AND IMMUNOTOXICITY IN THE PRESENCE OF CADMIUM AFTER IN VIVO EXPOSURE TO THE FRESHWATER MUSSEL <i>ELLIPTIO COMPLANATA</i>.....		91
RESUME FRANÇAIS.....	91	
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	92	
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES		114
1.	LA TOXICITÉ DIRECTE DES SWCNT BRUTS	115
2.	L'UTILISATION DES BIOMARQUEURS	118
3.	INFLUENCE DES PARAMÈTRES ABIOTIQUES.....	118
4.	IMPLICATION DES RÉSULTATS POUR L'ÉVALUATION DE RISQUE	120
5.	RECOMMANDATIONS POUR LES FUTURES ÉTUDES	122
RÉFÉRENCES.....		123
ANNEXE 1 : EXPOSITION <i>IN VIVO</i> PENDANT 72 H DE LA MOULE <i>E. COMPLANATA</i> AUX SWCNT OU AU CD.....		140
ANNEXE 2 : CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES.....		144

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES

Tableau 1. Résumé des effets toxiques des SWCNT chez des invertébrés aquatiques à l'échelle de l'individu.....	18
Tableau 2. Paramètres cellulaires mesurés chez des mollusques bivalves exposés à des nanomatériaux carbonés.....	28
Tableau 3. Différents bioessais utilisés pour évaluer la toxicité des contaminants dans le milieu aquatique.....	30
Tableau 4. Présentation des conditions de réalisation des tests de toxicité aiguë et chronique chez <i>Daphnia magna</i> et <i>Hyalella azteca</i>	48

CHAPITRE 3 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tableau 1. Résumé des concentrations toxiques des SWCNTS bruts et purifiés chez <i>H. azteca</i> , <i>D. magna</i> et <i>E. complanata</i>	117
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES

Figure 1. Echelle de taille des nanomatériaux	4
Figure 2. Estimation de la taille du marché des produits avec des nanomatériaux d'ici 2020.	6
Figure 3. Nanotubes de carbone mono-paroi.....	8
Figure 4. Voies d'introduction des nanomatériaux dans le milieu aquatique.	14
Figure 5. Représentation des dommages provoqués par les nanotubes de carbone et liés au stress oxydant (Hajipour <i>et al.</i> , 2012).	20
Figure 6. Formation d'agglomérats et d'agrégats de nano-objets (Buffet 2012).	22
Figure 7. Représentation des interactions possible entre les nano-objets, les polluants et les organismes.....	24
Figure 8. Représentation des réction catalysées par la glutathion S transferase et la lactate déshydrogénase	35
Figure 9. Photographies de noyaux endommagés ou non après un test comète.....	37
Figure 10. Interaction des nanomatériaux avec les organismes du milieu aquatique (Traduit de Baun <i>et al.</i> , 2008)	40
Figure 11. Photographie d' un amphipode d'eau douce mâle <i>Hyalella azteca</i>	41
Figure 12. Schéma du microcrustacé <i>Daphnia magna</i> (Tiré de Pennak, 1978).	43
Figure 13. Schéma et cycle d'absorption de la moule.	45

CHAPITRE 2 : ARTICLES

ARTICLE 1

Figure 1. SWCNT solubilised in M4 medium observed with field emission gun scanning electron microscopy (A and B) and transmission electron microscopy (C and D)..	62
Figure 2. Accumulation of SWCNT in <i>H. azteca</i>	63
Figure 3. . Mean survival and growth of <i>H. azteca</i> exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 14 days	64
Figure 4. Mean survival and growth of <i>H. azteca</i> exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 42 days.	65
Figure 5. Mean survival of <i>H. azteca</i> exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 96 h in water-only.....	67

ARTICLE 2

Figure 1. SWCNT observed with (A) field emission gun scanning electron microscopy and (B) transmission electron microscopy.....	77
Figure 2. Adsorption isotherm for Cd ions at a concentration of 1.0 mg/L SWCNT.....	79
Figure 3. Mean survival of <i>D.magna</i> exposed to Cd or SWCNT after 48 h of exposure	80
Figure 4. Binocular images of <i>D. magna</i> exposed to SWCNT after 48 h exposure to a suspension of (A) 500 µg L ⁻¹ and (B) 1000 µg L ⁻¹	81
Figure 5. Mean survival of <i>D. magna</i> exposed to Cd with or without SWCNT after 48 h of exposure.....	83

ARTICLE 3

Figure 1. Transmission electron microscopy images of As-p SWCNT (A) and P-SWCNT (B) in milliQwater at 10 and 50 mg/L respectively	101
Figure 2. Viability (A) and phagocytic efficiency (B) of the mussel <i>E. complanata</i> hemocytes exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT for 8 days.....	103
Figure 3. DNA damage in hemocytes of mussels <i>E. complanata</i> exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT for 24-h expressed as Tail DNA and Olive Tail moment.....	104
Figure 4. Lactate dehydrogenase (A), glutathione-S-Transferase (B) activity measured in digestive glands and Cyclo-oxygenase activity measured in gonads (C) and hemocytes (D) of mussel <i>E. complanata</i> exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT.....	105

CHAPITRE 3 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure 1. L'analyse de risque des nanomatériaux (modifié de Kandlikar et al. 2007).....	121
-----------------------------------------------------------------------------------------	-----

ANNEXE 1

Figure 1. Observation de nanotubes de carbone (CNT-Report) dans une moule <i>E. complanata</i> exposée aux SWCNT.....	149
Figure 2. Viabilité des hémocytes après 24 h et 72 h jours d'exposition in vivo au Cd ou aux SWCNT.....	150
Figure 3. Cassures de l'ADN évaluées avec le test des comètes sur les hémocytes de moule après 24 h et 72 h d'exposition in vivo au Cd ou aux SWCNT.....	151

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ag : argent

CAT : catalase

Cd : cadmium

CeO₂ : oxydes de cerium

COX : cyclo-oxygenase

Cu : cuivre

CuO : oxydes de cuivre

GPx : glutathion peroxydase

GST : glutathion-S-transferase

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

LDH : lactate deshydrogenase

MWCNT : multi-walled carbon nanotubes (nanotubes de carbone multi-paroi)

NM : nanomatériaux

NP : nanoparticules

NTC : nanotubes de carbone

Pb : plomb

QDs : Quantum dot

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SOD : supeoxyde dismutase

TiO₂ : dioxydes de titane

SWCNT : single-walled carbon nanotubes (nanotubes de carbone mono-paroi)

Zn : zinc

ZnO : oxydes de zinc

INTRODUCTION

Le développement et l'utilisation des nanomatériaux (NM) dans divers produits de consommation ont particulièrement augmenté ces dernières années. En effet, les applications des NM sont nombreuses et concernent aussi bien la médecine, la biologie, l'électronique, la mécanique, l'ingénierie, la cosmétique, que l'environnement et la chimie (Aguilar, 2013; Mauter *et al.*, 2008). À travers le monde, les gouvernements investissent des sommes d'argent très importantes pour produire et développer de nouvelles applications. Aux États-Unis, la National Nanotechnology Initiative possède un budget de 1,5 milliard de dollars pour l'année 2015 et la somme globale de 21 milliards de dollars a été dépensée depuis le début de l'initiative en 2001 (NNI, 2013). En Europe, le 7^{ème} Programme cadre de recherche et développement technologique avait alloué un budget de 3,2 milliards d'euros pour les projets de recherche en nanotechnologie entre les années 2007 et 2013 (R&I, 2013). Parmi les NM, les nanotubes de carbone (NTC) occupent une place de choix de par la diversité des applications (présentes et futures) qu'ils offrent en raison de leurs nombreuses propriétés (mécaniques, électriques, etc.). Le marché des nanotubes de carbone pourrait valoir jusqu'à 2 398 millions de dollars d'ici 2018 (CNT-Report, 2013; Innovative-Report, 2011). Ainsi, la présence des NM et notamment des NTC dans l'environnement est vouée à augmenter et l'évaluation de leur potentiel toxique vis-à-vis de la santé humaine ou de celle des écosystèmes est de plus en plus étudiée.

L'étude des dangers potentiels des NM carbonés pour la santé humaine et environnementale fait l'objet de plusieurs suivis. En Amérique du Nord, Santé Canada et l'United States Environmental protection Agency (USEPA), évaluent la toxicité des NM pour l'environnement. En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), évalue de manière continue les risques liés aux NM et fournit diverses recommandations pour limiter leur dissémination dans l'environnement (Anses, 2014). En Europe, le projet Nanosafety, lancé en 2015, établit une stratégie de recherche à l'égard de la sécurité des NM pour la commission européenne (Savolainen *et al.*, 2013). Malgré tout, l'étude de l'écotoxicité des NTC se révèle être très complexe notamment en raison de leurs diverses caractéristiques physiques et chimiques qui influencent grandement leur toxicité (Baun *et al.*, 2008a; Sharifi *et al.*, 2012).

Parmi les effets observés, les NTC sont capables d'obstruer le tube digestif des organismes exposés (Edgington *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2008) mais également d'induire un stress oxydant (Cheng *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2009) et/ou des dommages à l'ADN (Ema *et al.*, 2012; Naya *et al.*, 2011). Enfin, les NTC possèdent une capacité d'adsorption parfois très forte

qui pourrait influencer le devenir de molécules présentes dans le milieu y compris des contaminants tels que des métaux ou des hydrocarbures.

L'évaluation des effets écotoxicologiques de NTC doit donc envisager ces différents aspects de façon à appréhender le mieux possible les conséquences de leur présence dans l'environnement. Par ailleurs, compte tenu des variations de sensibilité entre les espèces, il est intéressant d'utiliser plusieurs types d'organismes pour étudier la toxicité de ces contaminants. L'étude des effets à différents niveaux d'intégration biologique (physiologique, cellulaire, moléculaire, etc.) et chez des espèces appartenant à différents niveaux trophiques permettra d'établir une meilleure évaluation de la toxicité des NTC en laboratoire.

L'objectif de notre étude était d'étudier l'influence de divers paramètres sur la toxicité des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) à l'aide de trois organismes aquatiques tels que l'amphipode benthique *Hyalella azteca*, la daphnie *Daphnia magna* qui vit dans la colonne d'eau et la moule d'eau douce *Elliptio complanata*. Ces trois organismes offrent une complémentarité de par leur milieu de vie, leur sensibilité aux contaminants et enfin la diversité des effets qui peuvent être mesurés. Le premier chapitre de la thèse introduit la problématique et les différents thèmes abordés à l'aide d'une revue de littérature. Le deuxième chapitre présente les manuscrits rédigés pour l'obtention du doctorat. Le premier article décrit l'influence de deux paramètres sur la toxicité des SWCNT : la présence du sédiment et la durée d'exposition. Le second article présente l'impact de la présence des SWCNT sur la toxicité du cadmium (Cd) sur la survie. Enfin, le troisième article traite de l'impact d'une co-exposition entre les SWCNT et le Cd, à des concentrations non létales, sur des paramètres immunitaires, de stress oxydant et de génotoxicité. Le dernier chapitre présente les conclusions générales de l'étude ainsi que les perspectives.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

1 LES NANOMATÉRIAUX

1.1 Généralités

1.1.1 Définition

Les NM sont définis comme étant constitués de nano-objets dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nanomètres soit 100×10^{-9} mètres (Figure 1) ou qui possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique (ISO, 2011; Lövestam *et al.*, 2010). Ces nano-objets peuvent être des NP, des nanotubes ou bien des nano-fibres, sous forme de métaux, carbones, céramiques ou polymères.

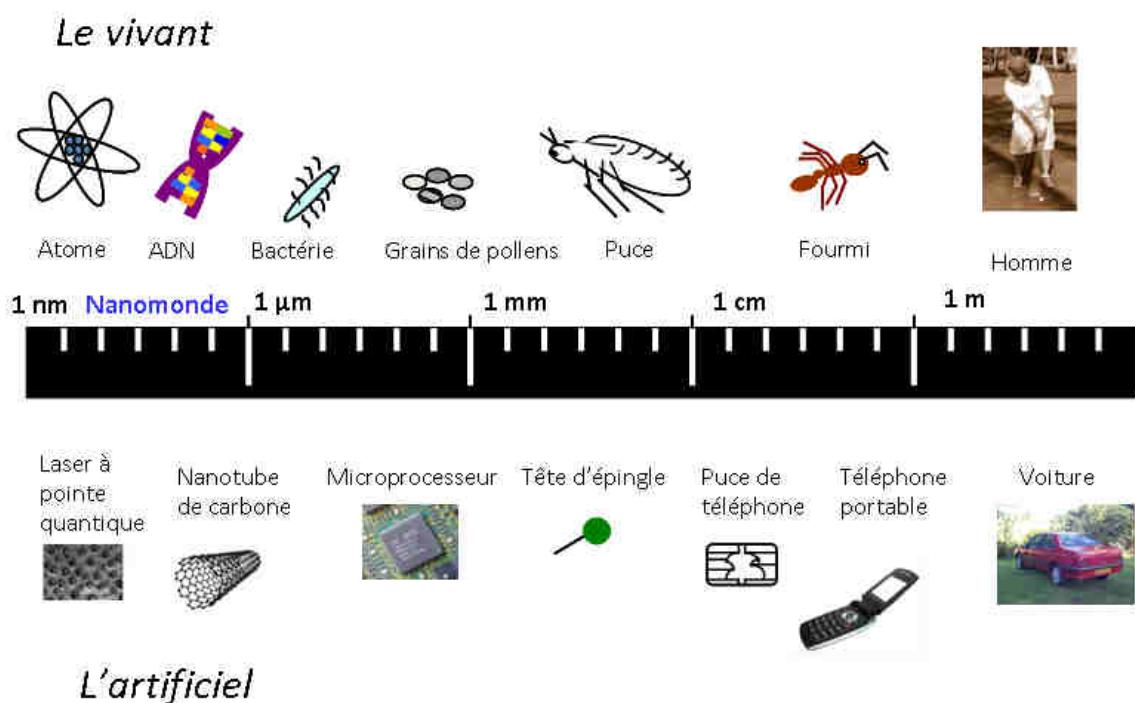


Figure 1. Echelle de taille des nanomatériaux

Echelle de taille d'éléments vivants et inertes allant du nanomètre au mètre.

L'élaboration des nano-objets peut se faire par une approche ascendante (appelée bottom-up) avec un assemblage atome par atome ou molécule par molécule, ou bien par une approche descendante (appelée top-down) où l'on va réduire la taille d'un matériau jusqu'à atteindre l'échelle nanométrique. Ainsi, les NM vont bénéficier de nouvelles propriétés par rapport à la particule non nanométrique.

1.1.2 Source des nanomatériaux

Il existe trois types de NM (qui prennent le plus souvent la forme de NP) :

- ceux naturels d'origine minérale ou environnementale telles que les poussières atmosphériques, les particules fines du désert ou encore les fumées provenant des feux de forêts ou de l'activité volcanique ;
- ceux d'origine humaine mais non intentionnelle issues des procédés industriels comme le soudage ou l'utilisation des produits à combustion tels que les moteurs d'automobiles et les barbecues (Teague-EC, 2004) ;
- et enfin les NM d'origine humaine appelées NM manufacturés et produits en quantité industrielle.

1.1.3 Présence sur le marché

Ces dernières années, le secteur des nanotechnologies s'est fortement développé à travers le monde. De nombreux types de NM sont élaborés et ajoutés à différents types de produits pour leur conférer diverses propriétés. Ainsi, on en trouve dans des produits à usage courant notamment le textile, l'automobile, le matériel électronique, les cosmétiques, l'équipement sportif ou encore les produits médicaux (Ban *et al.*, 2015; Pardeike *et al.*, 2009; Radetić, 2013; Tiwari *et al.*, 2015). Actuellement, on estime à 1 824 le nombre de produits contenant des NM, à l'échelle mondiale, avec 723 d'entre eux au Canada et aux États-Unis (Nanotechproject, 2015). Mais il est difficile d'avoir un chiffre précis car la réglementation en matière d'utilisation des NM et de renseignement auprès du grand public varie beaucoup d'un pays à l'autre. Alors qu'en Europe la mention [nano] doit être inscrite sur les produits cosmétiques et les biocides, en

Amérique du Nord il n'existe pour le moment aucune réglementation liée à l'indication de la présence de NM dans les produits commercialisés (Règlement-(CE), 2013). Par ailleurs, le nombre d'applications envisagées ne cesse d'augmenter partout dans le monde. Une estimation réalisée en 2010 (Figure 2) a chiffré le marché mondial des produits contenant des nanotechnologies d'ici 2020 à 3 000 milliards de dollars américains (Roco *et al.*, 2011). Les NM les plus utilisés sont l'Ag suivi du carbone (Nanotechproject, 2011).

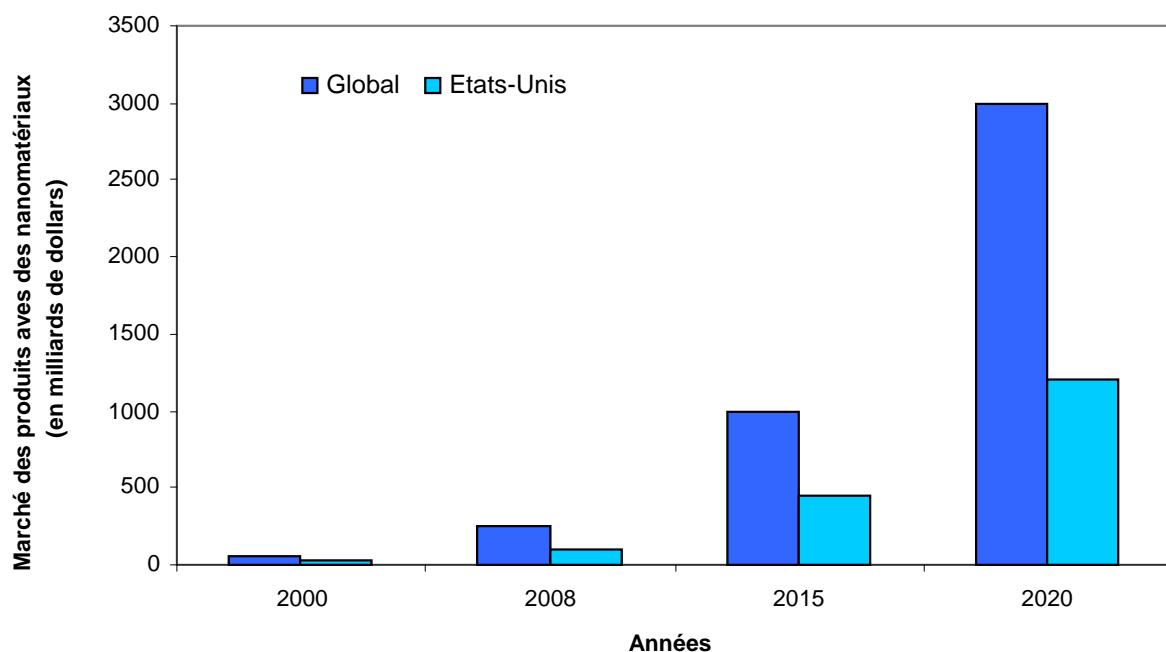


Figure 2. Estimation de la taille du marché des produits avec des nanomatériaux d'ici 2020.

Estimation de la taille du marché des produits contenant des nanomatériaux d'ici 2020. Entre 2000 et 2010 la recherche s'intéresse aux découvertes fondamentales puis au développement d'applications ainsi qu'à la recherche en système nano entre 2010 et 2020. Adapté de Roco *et al.*, (2011).

1.2 Les nanotubes de carbone

1.2.1 Définition

Parmi les NM, les NTC occupent une place particulière. Découverts, en 1991, par le chercheur japonais Sumio Iijima (Iijima, 1991), les NTC sont constitués de carbone à la structure cristalline, nommé graphène, assemblés en feuillets et à la forme cylindrique (Figure 3). Il existe principalement deux types de NTC : les mono-parois (SWCNT pour « single-walled carbon nanotubes ») formés d'un feuillet de graphène enroulé sur lui-même, et les multi-parois (MWCNT pour « multi-walled carbon nanotubes ») formés de feuillets enroulés et emboîtés les uns dans les autres (Figure 3). Les SWCNT possèdent un diamètre qui varie entre 1 et 2 nm et une longueur allant de 100 nm et à plusieurs millimètres (Stone *et al.*, 2010). Ils sont le plus souvent organisés en faisceaux et leur structure chimique les rend très hydrophobes.

1.2.2 Méthodes de synthèse

Il existe principalement trois méthodes de synthèse des NTC : la méthode de l'arc électrique, celle de l'ablation laser et enfin la méthode de dépôt en phase vapeur (CVD) (Liu *et al.*, 2014).

La méthode de l'arc électrique est la plus ancienne utilisée. Comme son nom l'indique, elle consiste à former un arc électrique entre deux électrodes de graphite (Murr *et al.*, 2005). Ce processus est peu coûteux, mais les nanotubes peuvent être contaminés par des NP métalliques, du carbone amorphe et des particules de graphite.

La technique de l'ablation laser consiste à faire subir un rayonnement laser à une cible de graphite. Les échantillons pourront également être contaminés par des métaux (le plus souvent du nickel, du fer ou du cobalt). Plus coûteuse que la méthode précédente, elle offre cependant un meilleur rendement (Guo *et al.*, 1995).

Enfin, la méthode CVD consiste à utiliser des catalyseurs métalliques pour dissocier le carbone de molécules d'hydrocarbures et former des nanotubes (Cassell *et al.*, 1999). Contrairement aux méthodes citées plus haut, la CVD permet d'obtenir des NTC à moindre coût, et avec un bon rendement, faisant d'elle la méthode préférée des industriels.

D'autres méthodes de production pour les SWCNT sont en cours de développement pour optimiser leur taux de production (actuellement inférieur à celui des MWCNT) et obtenir une quantité réduite de résidus métalliques. Récemment, l'étude de Kim et al. (2014) présente la production de SWCNT par plasma thermique inductif avec un taux de pureté 1/3 supérieur aux méthodes classiques (Kim et al., 2014).

Néanmoins, quelle que soit la méthode employée, les NTC sont le plus souvent contaminés par des métaux, du graphite ou du carbone amorphe. Ces NTC sont ainsi qualifiés de NTC bruts. Afin d'éliminer ces différents contaminants, diverses techniques de purification ont été développées.

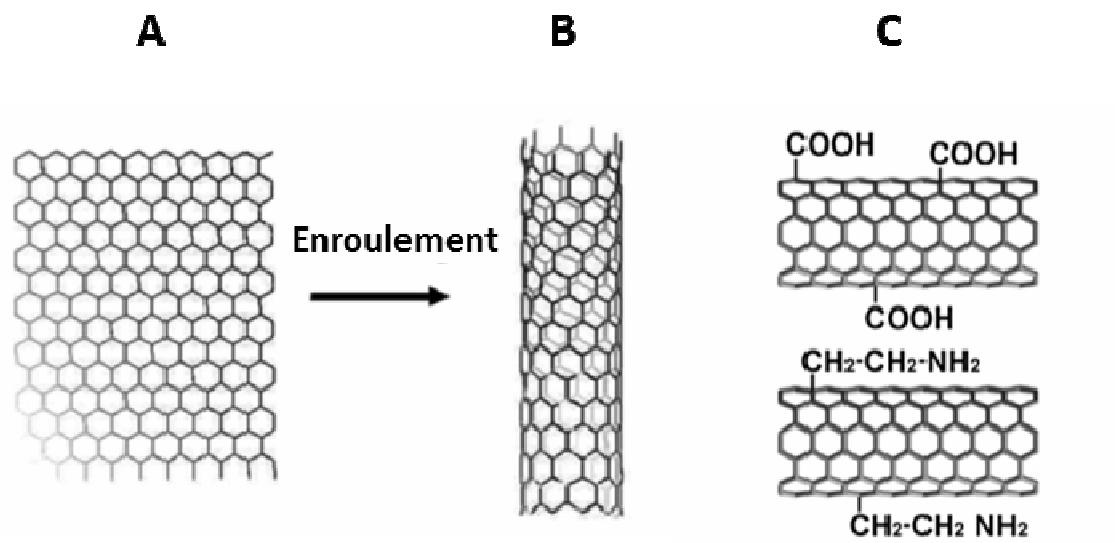


Figure 3. Nanotubes de carbone mono-paroi.

Un feuillet de graphène (A) est enroulé sur lui-même pour former un nanotube de carbone mono-paroi (B). Ce dernier pourra éventuellement subir une fonctionnalisation (C) grâce à l'ajout de groupements à sa surface (Jackson et al., 2013a).

1.2.3 Modifications chimiques : la purification

Il existe plusieurs méthodes de purification des NTC permettant d'éliminer ou plutôt de diminuer la quantité de contaminants dans les échantillons. Différentes techniques de purification ont été mises au point et peuvent être classées en deux catégories : la voie sèche et la voie humide.

1.2.3.1 La voie sèche

La méthode de purification par voie sèche consiste à chauffer les échantillons de NTC. Ainsi, une oxydation en phase gazeuse va avoir lieu et permettre d'éliminer spécifiquement les particules de carbone amorphe, plus réactives que les NTC. Une des techniques les plus simples à utiliser est celle de l'oxydation à l'air à une température donnée où l'oxydation du carbone provenant de l'oxygène de l'air, va former du dioxyde/monoxyde de carbone (Colomer *et al.*, 1998). Ce type de traitement à précédemment permis d'obtenir des NTC purifiés à 96 % (Moon *et al.*, 2001). Certains auteurs ont également déjà utilisé la vapeur d'eau pour purifier des échantillons de SWCNT (Tobias *et al.*, 2006).

Bien que cette méthode permette d'éliminer les carbones amorphes, elle est néanmoins insuffisante pour éliminer les catalyseurs métalliques et doit être le plus souvent couplée à un traitement à l'acide.

1.2.3.2 La voie humide

D'une manière générale, les méthodes par voie humide consistent à mettre les échantillons de NTC à agiter dans des solutions d'acide telles que l'acide nitrique (HNO_3) ou sulfurique (H_2SO_4) ou encore dans du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant plusieurs heures afin d'oxyder les nanotubes. C'est l'acide nitrique qui est le plus souvent utilisé, car il offre l'avantage d'être peu dispendieux et permet de diminuer la quantité de résidus métalliques en plus du carbone amorphe. Ce traitement est utilisé aussi bien pour les MWCNT (Tsang *et al.*, 1994) que pour les SWCNT (Liu *et al.*, 1998). La purification des échantillons permet également d'augmenter l'affinité des NTC pour l'eau, ce qui a été observé par Dujardin *et al.* (1998) après avoir traité des échantillons de SWCNT à l'acide nitrique 70 % pendant 4 h (Dujardin *et al.*, 1998). En effet,

l'oxydation des parois grâce à la purification va permettre de diminuer le caractère hydrophobe des NTC bruts, facilitant ainsi leur incorporation dans les produits industriels.

La fonctionnalisation des NTC peut également avoir lieu notamment pour les rendre plus solubles dans l'eau ou dans des solvants organiques. Cela consiste en l'ajout de groupements fonctionnels ou en une association à des polymères ou surfactants (pour les NTC) qui pourront modifier leurs propriétés d'interactions.

1.2.4 Mise en suspension des nanotubes de carbone

Les NTC bruts étant de nature hydrophobe, ils ont tendance à s'agglomérer puis à sédimenter dans le milieu aqueux (Lin *et al.*, 2004). Plusieurs techniques ont donc été développées pour faciliter leur dispersion et l'évaluation de leurs effets toxiques sur les organismes aquatiques. Les méthodes suivantes sont le plus souvent utilisées :

- le mélange ou l'agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant un temps donné (de quelques heures à plusieurs jours) (Petersen *et al.*, 2012) ;
- la sonication (de quelques minutes à plusieurs heures) (Handy *et al.*, 2012);
- l'utilisation de surfactants naturels (la matière organique) ou artificiels (le sulfate de sodium dodecyl, le polyéthylèneimine, etc.) (Smith *et al.*, 2007).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients et leur utilisation fait toujours débat (Crane *et al.*, 2008). Ainsi la dispersion par mélange/agitation permet de rester proche des conditions environnementales mais permet une dispersion peu efficace des NTC. L'utilisation de surfactants permet de disperser durablement les NTC (Handy *et al.*, 2012) mais ces composés peuvent influencer la toxicité des nanotubes notamment chez les daphnies (Edgington *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2011). La sonication, très souvent utilisée, permet de mettre en suspension les NTC mais peut augmenter la dispersion des métaux catalyseurs dans le milieu d'exposition (Toh *et al.*, 2012).

1.2.5 Propriétés et applications

Contrairement aux contaminants traditionnellement étudiés, les NM présentent des particularités physiques et chimiques qui doivent être pris en compte dans l'évaluation de leurs effets toxiques. En effet, leur taille à l'échelle du nanomètre va les rendre capables de pénétrer plus facilement dans les organismes ou d'interagir avec des composants cellulaires. De plus, les NM et notamment les NTC possèdent une large surface spécifique (pouvant atteindre en théorie $1310 \text{ m}^2/\text{g}$) due à l'augmentation de la proportion d'atome par rapport au matériau millimétrique, induisant une forte réactivité de surface. Cela va conduire à d'importantes interactions entre les NM et l'environnement.

Ainsi, l'organisation internationale de la normalisation (ISO) considère notamment la détermination des paramètres suivants comme essentielle pour les études toxicologiques : l'état d'agrégation/agglomération, la composition, la dimension des particules telles que le diamètre et/ou la longueur, la distribution granulométrique, la forme, la solubilité, la surface spécifique, la densité de charge et la chimie de surface notamment la présence de groupements fonctionnels (ISO, 2012). Pour faciliter la comparaison des données de toxicité, la caractérisation des NM est primordiale.

Depuis 2012, un nombre important d'études sur la toxicité environnementale des NM a été réalisé et contrairement aux précédentes fournissent plusieurs données de caractérisation (Hu *et al.*, 2012; Parks *et al.*, 2013; Pradhan *et al.*, 2015; Wallis *et al.*, 2014).

Les NTC présentent plusieurs propriétés permettant de les utiliser pour un grand nombre d'applications industrielles (Yang *et al.*, 2006). Parmi celles-ci, on peut noter des propriétés :

- mécaniques : avec une forte résistance, comparable à celle de l'acier tout en laissant le matériel très léger(Dresselhaus *et al.*, 2004);
- électriques : avec une conductivité électrique supérieure à celle des métaux (Christian *et al.*, 2008);
- thermiques : avec une résistance et une stabilité thermique très élevées (Fasano *et al.*, 2015) ;

- et chimique/physique : avec une capacité d'adsorption importante due à leur surface spécifique très élevée et structure creuse permettant d'introduire d'autres composés chimiques (Ghiazza *et al.*, 2014).

Depuis leur découverte, les NTC ont été étudiés de près en vue de les ajouter dans divers produits. Parmi les applications, on peut trouver :

- la fabrication de matériaux composites notamment pour de l'équipement sportif (raquettes de tennis, bâttes de base-ball, rayons de vélo) (Spitalsky *et al.*, 2010) ;
- du matériel électronique et semi-conducteurs (Liang, 2014) ;
- la production de batteries et de condensateurs(Liu *et al.*, 2012) ;
- la conversion et le stockage d'énergie (Ghiazza *et al.*, 2014);
- et du matériel scientifique (microscope à émission de champs) (Cole *et al.*, 2015).

De plus, de nouvelles applications sont envisagées notamment dans l'aérospatiale (Gohardani *et al.*, 2014) et en biotechnologies médicales avec la vectorisation de molécules thérapeutiques, l'élaboration de capteurs biomédicaux ou la régénération tissulaire (Aguilar, 2013; Kruss *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2013). Des applications environnementales pour notamment la détection ou l'élimination de gaz polluants, de métaux, de pesticides ou de micro-organismes sont également étudiées de près (Daer *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2012). Ainsi, ces NM risquent de se retrouver dans l'environnement suite à la fin de vie des déchets (usure, décomposition dans le lieu de rejet) mais aussi de par leur utilisation directe dans le milieu.

1.3 Ecotoxicité des nanotubes de carbone

1.3.1 Introduction dans l'environnement

L'augmentation croissante de la production des NTC, de leur utilisation par les consommateurs et du développement de nouvelles applications, aura pour conséquence d'augmenter les rejets de NTC dans l'environnement. En effet, la valeur de la production en SWCNT a été évaluée à 315 millions de dollars et 9 300 tonnes de NM carbonés pourraient être produites d'ici à la fin de l'année 2015 (Innovative-Report, 2011). Plusieurs voies d'introduction des NTC dans l'environnement peuvent être envisagées (Figure 4).

Les NTC étant des NM très légers et donc facilement dispersés dans l'atmosphère, un des premiers compartiments où ils seront introduits est l'air. Ils seront donc susceptibles d'entrer en contact avec les individus présents sur le lieu de production et pourront également se retrouver dans l'atmosphère via le système d'aération. En effet, le mouvement des nanoparticules se fait essentiellement par diffusion, c'est à dire par la migration d'une zone chargée en particules vers une zone moins chargée. Concrètement, cela se traduit par une persistance dans l'air relativement longue et une entrée ou sortie des bâtiments facilitée (Witschger et Fabries, 2005). Néanmoins, il existe plusieurs voies de transferts des NM dans le milieu aquatique telles que les effluents d'usine, les déversements accidentels, les déchets de produits en fin de vie, ou encore la lixiviation des sols et le transport par l'air. Comparé aux autres contaminants tels que les métaux ou les composés pharmaceutiques, il n'existe pas encore de méthode standard pour mesurer la concentration en NM dans l'environnement. Malgré tout, plusieurs groupes de recherches ont utilisé la modélisation afin d'estimer la concentration en NM et notamment en NTC (Gottschalk *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2008). Mueller *et al.* (2008) font partie des premiers à avoir modélisé la quantité de NM rejetée dans l'environnement en considérant tout leur cycle de vie. D'après cette étude, la concentration en NTC au niveau de l'eau de surface pourra varier entre 0.5 to 0.8 ng/L. D'autres auteurs ont élaboré des modèles permettant de prédire la présence des NM dans d'autres compartiments environnementaux (notamment les sédiments et les eaux souterraines) et en utilisant des paramètres supplémentaires tels que l'utilisation des NM, les modalités de recyclage et d'élimination des NM. Ainsi, Gottschalk *et al.* (2009) ont utilisés une approche probabiliste traitant tous les paramètres (volumes de production des NM, fabrication et quantité de produits contenant ces matériaux) comme des distributions de probabilité. Ainsi, une estimation de leur libération dans

l'environnement a pu être établie. Celle-ci pourrait être de l'ordre du ng/L dans les cours d'eau et du µg/g dans les sédiments.

Une fois que les NTC ont pénétré dans le milieu aquatique, il s'agit de déterminer leur devenir, leur comportement et leur toxicité envers les différentes espèces de l'écosystème.

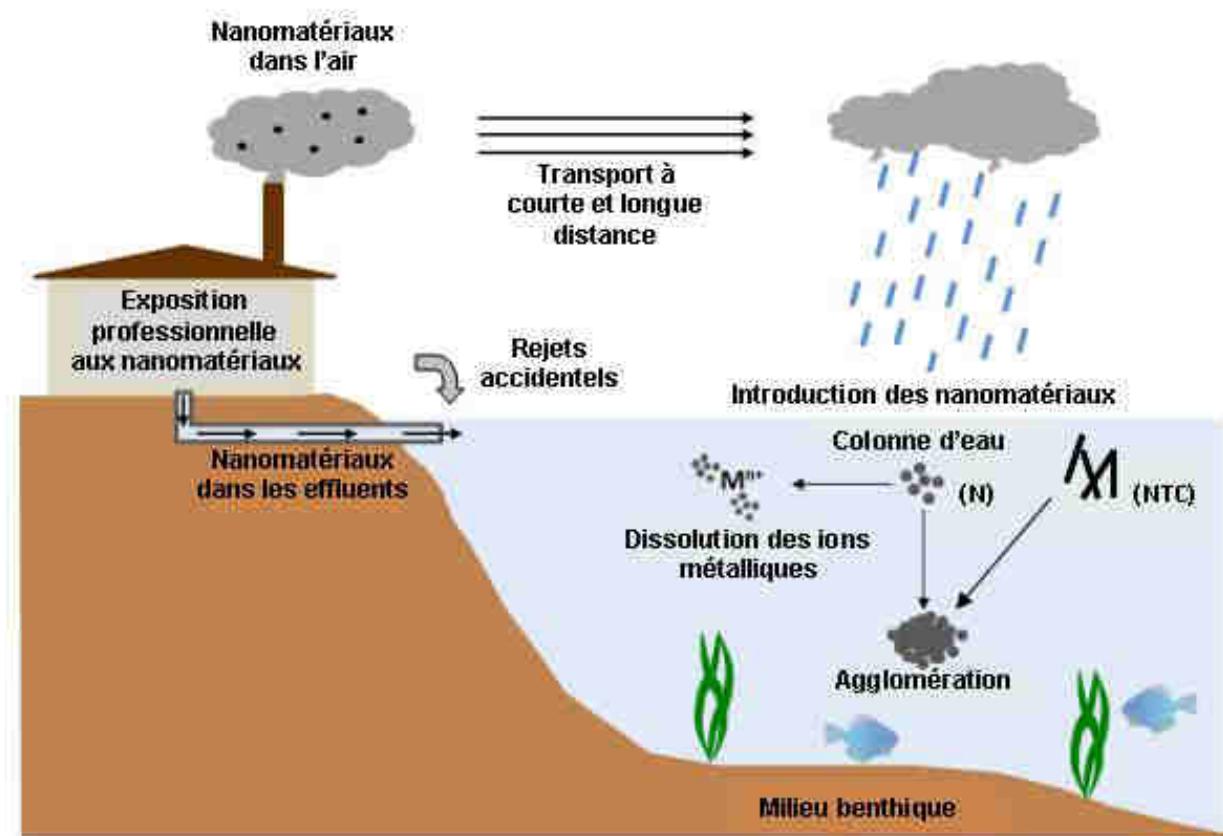


Figure 4. Voies d'introduction des nanomatériaux dans le milieu aquatique.

Les nanomatériaux peuvent se retrouver dans le milieu aquatique via des rejets accidentels ou de fonctionnement. Ils peuvent également être transportés puis subir une agglomération ou dissolution dans le milieu. NTC : nanotubes de carbones, N : nanoparticules. Modifié à partir de Vicki H. Grassian, <http://chem.uiowa.edu/grassian-research-group>.

Comportement des nanotubes de carbone dans le milieu aquatique

La présence des NTC dans l'environnement risque d'augmenter proportionnellement à leur production et utilisation par l'Homme. Tout cela aura pour conséquence d'augmenter la concentration en NTC dans l'air, le sol et l'eau et les interactions potentiels avec les organismes présents dans ces milieux.

Alors que pour les NP métalliques, la dissolution des ions est généralement observée, les NTC vont eux s'agglomérer via les phénomènes de mouvement Brownien, de gravité et de forces de faible énergie (Nowack et Bucheli 2007; Sellers *et al.* 2009). De plus, les conditions physiques et chimiques telles que le pH et la salinité vont influencer le devenir des NTC dans l'eau. Ainsi, leur agrégation augmentera en fonction de la force ionique. Les NTC possèdent une structure hydrophobe qui conduit le plus souvent à leur sédimentation en milieu aqueux. Ces derniers semblent donc poser relativement plus de risques pour les espèces benthiques que pour les espèces pélagiques, et semble potentiellement peu toxiques étant donné qu'il est communément admis que les substances solubles dans l'eau sont susceptibles d'avoir plus d'effets que les substances hydrophobes. Malgré tout, en raison de leurs propriétés d'adsorption, les NTC sont susceptibles d'interagir avec des substances naturelles, notamment la matière organique, ce qui peut augmenter leur solubilité. En effet, en milieu naturel la matière organique peut agir comme dispersant et rendre les NTC plus solubles en recouvrant les surfaces hydrophobes (Jackson *et al.*, 2013b). Alloy *et al.* (2011) ont montré qu'une suspension de MWCNT pouvait être stabilisée par la matière organique naturelle. D'autres études ont montré un maintien de la dispersion des NTC par de la matière organique de l'eau de rivière (Hyung *et al.*, 2007). Ce type de traitement est très étudié pour des applications pharmaceutiques (vectorisation) ou encore pour l'élimination de contaminants dans l'eau (Mauter *et al.*, 2008). L'augmentation de la solubilisation des NTC dans les milieux aqueux va en contrepartie augmenter le risque d'interaction avec les organismes présents dans le milieu (Kennedy *et al.*, 2009; Klaper *et al.*, 2010).

Ainsi, en fonction des conditions du milieu, les NTC seront capables d'interagir avec des organismes de la colonne d'eau et/ou bien benthiques. Leurs effets écotoxiques sont donc à étudier dans l'eau, dans les sédiments mais également à l'interface eau-sédiment, ce qui d'après la littérature n'a jusqu'à présent pas été réalisé.

1.3.2 Toxicité directe des nanotubes de carbone

Il existe plusieurs voies d'exposition possibles des NTC aux organismes aquatiques. Les nanotubes sont susceptibles d'être ingérés ou bien filtrés et donc de s'accumuler ou d'être éliminé par l'appareil digestif. Les organismes peuvent également être exposés par contact physique sur leur corps ou bien les branchies.

Alors que plusieurs études *in vivo* chez le rat et la souris ou *in vitro* sur des cellules humaines ont mis en évidence des effets toxiques des NTC similaires à celui de l'amiante, les résultats des recherches environnementales diffèrent beaucoup d'une étude à l'autre. D'une manière générale, le comportement des NTC va dépendre de la nature du milieu d'exposition et des propriétés de surface des NM. Les NM carbonés sont capables d'interagir avec les organismes exposés ce qui peut avoir plusieurs conséquences. Tout d'abord, ils sont susceptibles de s'accumuler à l'intérieur du tube digestif des organismes, ce qui peut limiter ou bloquer la prise alimentaire (Edgington *et al.*, 2014). Ils peuvent également se coller sur la carapace des organismes comme les daphnies et les empêcher de se déplacer (Petersen *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2008). Ensuite, les NTC peuvent provoquer une augmentation du stress oxydant voir des dommages génotoxiques (Ali *et al.*, 2014). Enfin, l'effet « cheval de Troyes » pourrait s'avérer un effet encore plus important que celui des NTC seuls. En effet, les NTC ont des propriétés d'adsorption très fortes et sont ainsi capables de se lier à différents composés allants de la matière organique naturelle à divers contaminants métalliques ou organiques (Bastos *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013).

Diverses études ont mesuré les effets des NTC à l'échelle de l'individu, de la cellule et de la molécule d'ADN.

1.3.2.1 Effets biologiques à l'échelle de l'individu

D'après la littérature, les invertébrés aquatiques sont plus sensibles aux NTC que les vertébrés (voir le Tableau 1 comparant les effets observés) (Jackson *et al.*, 2013b). Plusieurs études ont observé un effet physique des NTC suite à l'exposition d'invertébrés. Chez les crustacés comme les daphnies ou bien les amphipodes, les nanotubes peuvent être ingérés et également se coller à la surface des organismes. La présence de carbone C₆₀ et de NTC, sur ou à

l'intérieur des organismes, a pu être observée en microscopie optique et électronique en transmission (Baun *et al.*, 2008b; Mwangi *et al.*, 2012). Une diminution de la survie et de la reproduction chez le copépode *Amphiascus tenuiremis* a également été observée après une exposition aux SWCNT purifiés (Templeton *et al.*, 2006). Une autre étude a déterminé une immobilisation de 50 % des daphnies (CI50) *Daphnia magna* exposées à des SWCNT purifiés à 1,3 mg/L (Zhu *et al.*, 2008). Blaise *et al.* (2008) ont mis en évidence une augmentation de la mortalité des daphnies *D. magna* après 48 h et 96 h d'exposition à des SWNT fonctionnalisés avec de la lysophosphatidylcholine dans leur nourriture. La plupart des études qui se sont intéressées aux invertébrés benthiques ont utilisé des expositions dans l'eau (en absence de sédiments) ou dans les sédiments et la plupart ont utilisé de courtes expositions. Smith *et al.* (2007) ont observé des pathologie au niveau des branchies (oedèmes) et du tube digestif chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, exposée 10 jours aux SWCNT dispersés dans l'eau à l'aide du dodecylsulphate de sodium. L'étude de Mouchet *et al.* (2008) a mis en évidence un blocage des branchies et/ou du tube digestif du xénophage *Xenopus laevis* exposé aux nanotubes de carbone à double paroi (DWCNT) pendant 12 jours (Mouchet *et al.*, 2008) avec un milieu d'exposition composé d'eau reconstituée. Récemment, Mwangi *et al.* (2012) ont démontré que des SWCNT bruts ou purifiés pouvaient diminuer la survie et la croissance de *H. azteca* dans le cas d'une exposition de 14 jours dans l'eau seulement à 1 g/L. Le milieu d'exposition présentait une dureté à 100 mg/L (CaCO_3), une alkalinité à 80 mg/L (CaCO_3) et un pH à 8.0.

Bien que le mécanisme d'action des SWCNT ne soit pas tout à fait clair, il est probable que l'accumulation de NM à l'intérieur des organismes puisse d'une part entraîner un blocage du leur système digestif, et d'autre part, induire une diminution de l'absorption de nourriture. Ce dernier effet n'a jusqu'à présent été observé que chez les plantes où la présence de MWCNT a diminué la croissance du maïs *Zea Maiz* par rétention des nutriments (Tiwari *et al.*, 2014). Ainsi, ces deux actions auront pour conséquence de modifier la survie, la croissance ou encore la reproduction des organismes.

D'autres effets ont très souvent été mesurés au niveau de la cellule, notamment l'induction de stress oxydant.

Organisme	Espèce	Contamination	Durée d'exposition	Concentration	Effet observé	Références
Algue	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Eau	96-h	>0,5 mg/L	Diminution croissance	Youn et al., 2012
		Eau	96-h	1-10 mg/L	Diminution croissance	Blaise et al., 2008
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Eau	96-h	<50 mg/L	Diminution croissance	Velzeboer et al., 2008
Crustacé	<i>Daphnia magna</i>	Eau	48-h	-	Mortalité	Kim et al., 2010
		Nourriture	48-h	20 mg/L	Mortalité	Roberts et al., 2007
		Eau	96-h	2,4 mg/L	Mortalité	Zhu et al., 2008
		Eau	96-h	-	Mortalité	Roberts et al., 2007
	<i>Hydra attenuata</i>	Sédiments puis eau	96-h	1-10 mg/L	Changements morphologiques	Blaise et al., 2008
Insecte	<i>Hyalella azteca</i>	Eau	14-J	1g/L	Mortalité	Mwangi et al., 2012
	<i>Chironomus dilutus</i>	Eau	14-J	1g/L	Mortalité	Mwangi et al., 2012
Copepode	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	Sédiments	28/35-J	10 à 0,5 mg/L	Mortalité/ Diminution reproduction	Templeton et al., 2006
Poisson	<i>Danio rerio</i>	Eau	-	120 mg/L	Retard d'éclosion	Cheng et al., 2007
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Eau	10-J	0,1 à 0,5 mg/L	Pathologies respiratoires	Smith et al., 2007

Tableau 1. Résumé des effets écotoxiques des SWCNT chez des invertébrés aquatiques à l'échelle de l'individu.

1.3.2.2 Effets biologiques à l'échelle de cellulaire et moléculaire

Diverses études réalisées *in vitro* sur des cellules de mammifères ainsi qu'*in vivo* sur divers invertébrés ont mis en évidence le potentiel toxique des NM en tant qu'inducteur de stress oxydant et de dommages à l'ADN (Murray *et al.*, 2009; Naya *et al.*, 2011; Pichardo *et al.*, 2012; Rodríguez-Yáñez *et al.*, 2015).

De nombreux contaminants sont capables d'induire un stress oxydant chez les bivalves en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde ($O_2\cdot^-$), l'oxygène singulet (O_2^{\cdot}) et les radicaux hydroxyle ($OH\cdot$). Les ROS étant capables d'oxyder les lipides et les acides nucléiques, pouvant provoquer des dommages cellulaires allant parfois jusqu'à la mort des cellules (Gillis *et al.*, 2014; Kaloyianni *et al.*, 2009), l'organisme a dû mettre au point un système de défense efficace pour les éliminer. Des composants enzymatiques tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) ; et non enzymatiques comme le glutathion permettent de réguler la production des ROS. Un résumé des interactions possibles entre les NTC et les composants de la cellule est présenté à la Figure 5. Une précédente étude a permis d'observer une augmentation de la production des ROS et de l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la SOD et la CAT, chez des larves de xénope *Xenopus laevis* après 4h d'exposition aux MWCNT à 1 et 10 mg/L (Saria *et al.*, 2014). Le milieu d'exposition utilisé était de l'eau douce reconstituée (eau courante filtrée sur charbon puis ajout de sels nutritifs d'après le protocole ISO, 2006). Canesi *et al.* (2010) ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la CAT chez la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée 24h *in vivo* aux fullerènes (C60) à 1 mg/L dans de l'eau de mer artificielle. Une autre étude a mis en évidence une diminution du système glutathion dans l'hépatopancréas de l'escargot d'eau douce *Lymnaea luteola* exposé aux SWCNT pendant 24h à 21 mg/L et 96h à 10 mg/L (Ali *et al.*, 2014). Le milieu d'exposition utilisé était de l'eau avec un ph compris entre 7 et 8, un taux d'oxygène dissous compris entre 6.0 à 8.2 mg/L, une dureté variant de 160 à 180 mg/L et un taux d'alkalinité entre 259 et 292 mg/L de $CaCO_3$ (paramètres mesurés en fin de tests). Ainsi, les NTC pourraient atteindre le système de régulation du stress oxydant par une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes et une augmentation de la production d'ROS, ce qui pourra conduire à une oxydation des composants cellulaires et provoquer des dommages à l'ADN.

L'effet génotoxique des NM a rapidement été soupçonné en raison de la faible taille des particules qui leur permettrait de pénétrer les cellules puis d'entrer en contact avec le noyau.

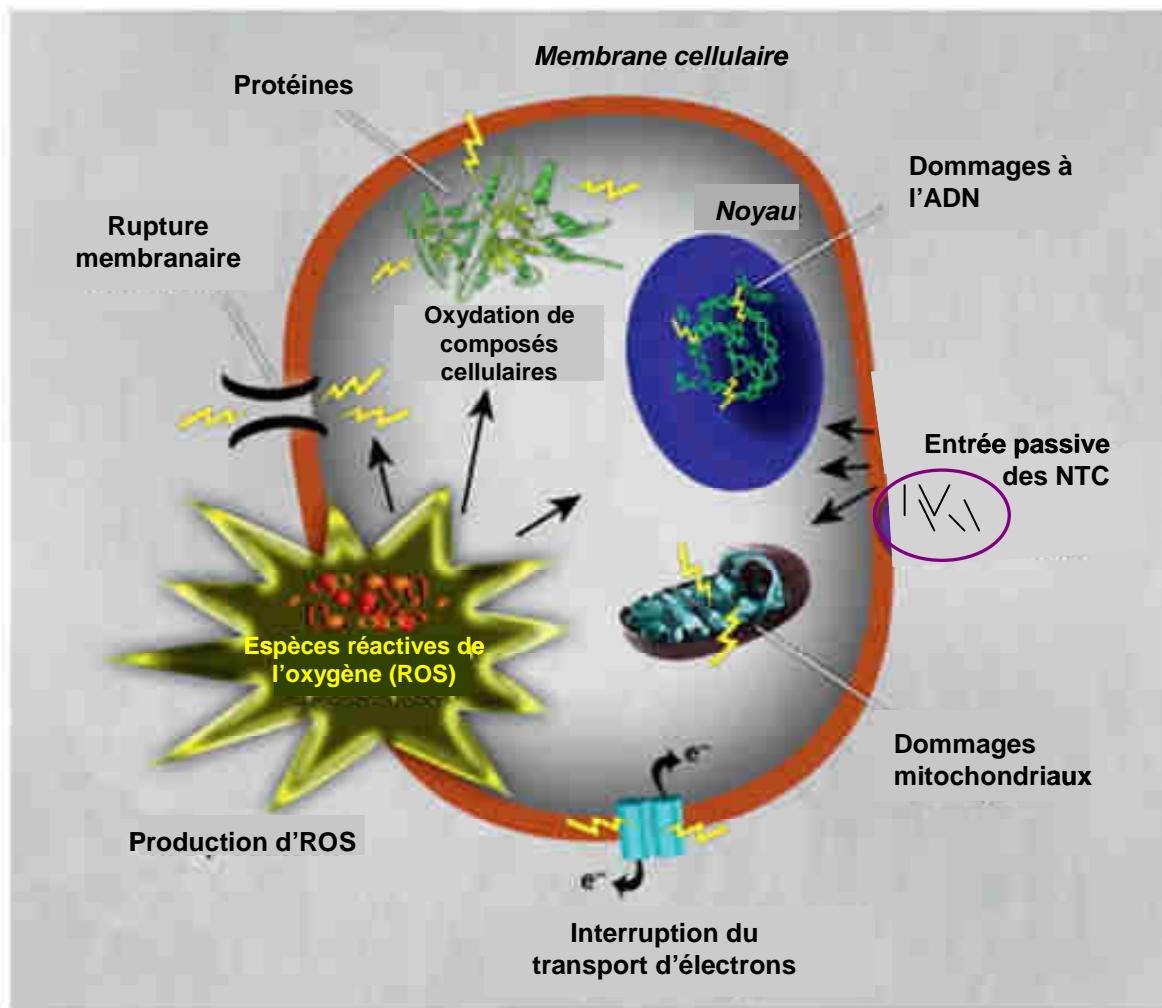


Figure 5. Représentation des dommages provoqués par les nanotubes de carbone et liés au stress oxydant (Hajipour *et al.*, 2012).

Ainsi, les NM pourront interagir directement avec la molécule d'ADN ou bien la modifier via la production d'ROS. Des travaux ont montré l'action génotoxique de NP CuO et NP Ag chez la moule *M. galloprovincialis* (Gomes *et al.*, 2013) mais aussi de NP TiO₂ sur des cellules du poisson *Carassius auratus* et chez la moule *M. galloprovincialis* (Reeves *et al.*, 2008; Torre *et al.*, 2015). Une augmentation du taux de cassures de l'ADN a également été mesurée au niveau des glandes digestives de l'escargot d'eau douce *L. luteola* après 24h d'exposition aux SWCNT à 10 mg/L, ainsi que chez la moule *M. galloprovincialis* exposés aux SWCNT à 0.1 et

0.5 mg/L dans de l'eau de mer filtrée à 33% de salinité, 24 h après avoir ajouté la solution de NTC (Al-Shaeri *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014).

L'impact des NM sur le système immunitaire a également été observé notamment chez les moules marines ou d'eau douce. Canesi *et al.* (2010) ont mis en évidence une modification de la membrane des lysosomes chez les hémocytes de *M. galloprovincialis* exposées pendant 24 h *in vivo* aux NP TiO₂ ou aux C60 à 1 mg/L dans de l'eau de mer artificielle. Anisimova *et al.* (2014) n'ont pas observé de modification au niveau de la composition cellulaire de l'hémolyphe de la moule *M. modiolus* exposée aux MWCNT à 100 mg/L pendant 48 h mais une altération de l'épithélium intestinal a été mise en évidence. Chez l'huître creuse, *Crassostrea virginica*, une perturbation des lysosomes a été observée par Ringwood *et al.* (2009) après une exposition *in vivo* aux C60 dès 0.1 mg/L.

1.3.3 Caractéristique influençant la toxicité des nanotubes de carbone : l'agglomération

Parmi les caractéristiques physiques et chimiques capables d'influencer la toxicité des NM en milieu aqueux, il y a la taille, la forme et la charge de surface. Concernant les NTC, un paramètre essentiel à déterminer est leur état d'agglomération qui peut être directement lié à leur degré de toxicité.

L'agglomération des NM peut être le résultat du mouvement relatif des particules par diffusion, appelé mouvements Browniens, être provoquée par une force extérieure telle que l'agitation ou être induite par des interactions attractives (forces de Van der Waals) ou répulsives (les forces électrostatiques) (Buffet, 2012; Nowack *et al.*, 2007; Wiesner *et al.*, 2007). Deux types d'agglomération peuvent être définis. Alors que les agglomérats de nano-objets correspondent à un ensemble de particules faiblement liées, les agrégats eux mettent en jeu des forces intenses telles que les liaisons covalentes (Figure 6). D'une manière générale, l'agglomération des NM sera d'autant plus importante que la solution sera chargée en ions. Le comportement et le devenir des NM dans le milieu aqueux sont également influencés par divers facteurs abiotiques tels que le pH, la température, la présence de matière organique, la lumière ou encore la salinité (Christian *et al.*, 2008; Mohd Omar *et al.*, 2014). Par conséquent, en milieu

naturel le devenir des NM pourra être modifié en fonction des conditions du milieu et des particules présentes (Lead *et al.*, 2007).

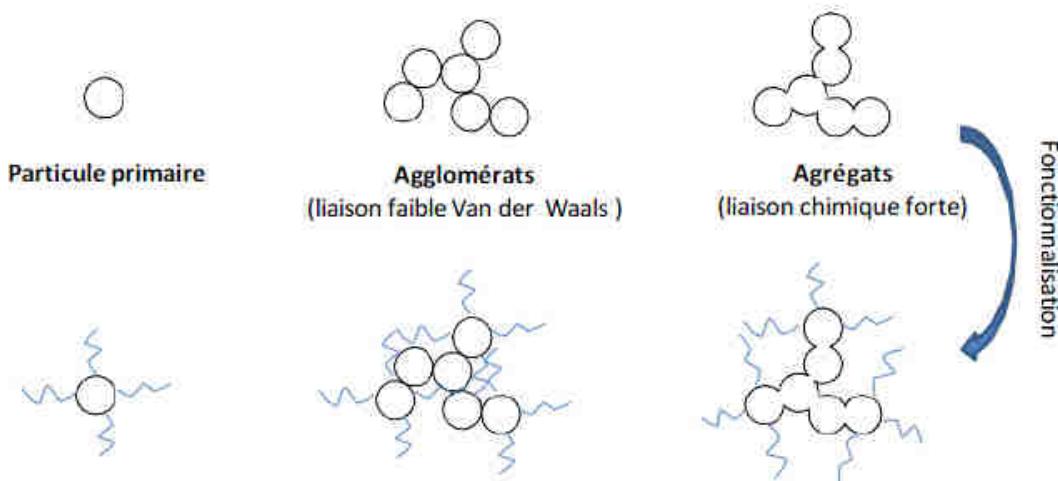


Figure 6. Formation d'agglomérats et d'agrégats de nano-objets (Buffet 2012).

Sous l'effet de force de faibles énergies, les particules primaires peuvent s'agglomérer. Ces particules peuvent également se lier par de fortes liaisons chimiques, également connu sous le terme de coalescence. Cela correspond à la formation irréversible d'agglomérats. Ces liaisons peuvent également être influencées par la fonctionnalisation des particules.

Alors que les NTC bruts auront plutôt tendance à sédimenter, les NTC purifiés ou fonctionnalisés seront plus susceptibles d'être maintenus dispersés en solution et donc à être en contact avec les organismes de la colonne d'eau.

Très peu d'études *in vitro* ont été réalisées pour comparer les effets entre des solutions stabilisées ou non de NM. Qu *et al.* (2009) ont observé que des MWCNT dispersés ou agglomérés pouvaient être pris en charge par les cellules phagocytaires mais que les NTC agglomérés étaient retenus plus longtemps dans les organes des souris exposées (Qu *et al.*, 2009).

Dans le milieu aquatique, l'utilisation de dispersant pour stabiliser les solutions de NTC impliquerait l'exposition des organismes pélagiques plutôt que benthiques. Néanmoins, des travaux réalisés *in vivo* ont permis de mettre en évidence une modification des MWCNT fonctionnalisés par les organismes exposés. En effet, Roberts *et al.* (2007) ont ainsi démontré que la Daphnie *D. magna* pouvait au cours de la digestion éliminer les lipides ajoutés la surface

des MWCNT pour les solubiliser et excréter les nanotubes, ce qui les rendait moins solubles (Roberts *et al.*, 2007). Ainsi la présence des organismes pourrait modifier l'agglomération des NTC fonctionnalisés et ainsi exposer d'autres types d'organismes à ces NTC.

Ces études démontrent que l'effet de l'agglomération est encore peu compris et qu'il est très important de le prendre en compte dans chaque étude de toxicité.

1.3.4 Interaction avec des contaminants

Actuellement, l'influence de facteurs abiotiques et notamment la présence de contaminants sur la toxicité des NTC sont de plus en plus abordées. En effet, les NM présentent une grande surface spécifique, leur offrant une forte capacité d'adsorption pour plusieurs types de molécules hydrophobes telles que de la matière organique mais également des polluants. L'adsorption fait appel à un phénomène physique, la physisorption, où les contaminants vont se fixer à la surface d'un substrat solide. Ce phénomène est dû aux attractions électrostatiques et met en jeu des liaisons de faibles énergies (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, etc.) (Ruthven, 1984). Lorsqu'on étudie ce phénomène, la capacité maximale d'adsorption entre un soluté et une matrice solide est souvent évaluée. Cette capacité est représentée par une relation d'équilibre entre la concentration dans la phase liquide et la quantité adsorbée, expérimentalement nommée « l'isotherme d'équilibre » (Foo *et al.*, 2010). Des isothermes d'équilibre ont été déterminés entre les SWCNT et divers contaminants organiques ou métalliques. Une forte capacité d'adsorption entre les SWCNT bruts, purifiés et fonctionnalisés (SWNT-COOH) a été mise en évidence avec les ions métalliques suivants : le chrome (Di *et al.*, 2006), le plomb (Pb^{2+}), le cadmium (Cd^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) (Moradi *et al.*, 2011). En effet, l'ajout de groupements fonctionnels permet d'augmenter la surface spécifique et les capacités d'échanges cationiques. Une forte capacité d'adsorption a également été observée entre des SWCNT purifiés et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en solution tels que le naphtalène, le phénanthrène et le pyrène (Yang *et al.*, 2006). Grâce à cette capacité, les SWCNT pourraient donc diminuer la biodisponibilité des contaminants, leur potentiel toxique, voir leur bioaccumulation chez les organismes exposés, ce qui a peu été testé. Une étude a permis de montrer une réduction de la bioaccumulation de contaminants organiques hydrophobes (HAP, biphenyles polychlorés) chez le polychète *Streblospio benedicti* exposé via des sédiments associés à des SWCNT (Ferguson *et al.*, 2008).

D'un autre côté, la présence de contaminants à la surface de NM permet d'envisager qu'une plus grande quantité de contaminants pourrait s'accumuler dans les organismes, en raison de la facilité d'entrée des NM (Figure 7). Cela a déjà été observé chez la daphnie *Ceriodaphnia dubia* où une exposition à une concentration non toxique de NP TiO₂ ou CeO₂ associée à des concentrations croissantes de Pb a été testée. Une augmentation de la toxicité, du Pb co-exposé à l'une ou l'autre des NP a été mesurée par rapport à celle du Pb seul. L'adsorption de Pb à la surface des NP et leur accumulation dans le tube digestif ayant été vérifiées, ces NP semblent donc agir comme transporteur et augmentent la biodisponibilité et l'effet toxique du Pb (Hu *et al.*, 2012). Cela a également été observé entre des NP de TiO₂ et Al₂O₃ et de l'arsenic (Wang *et al.*, 2011).

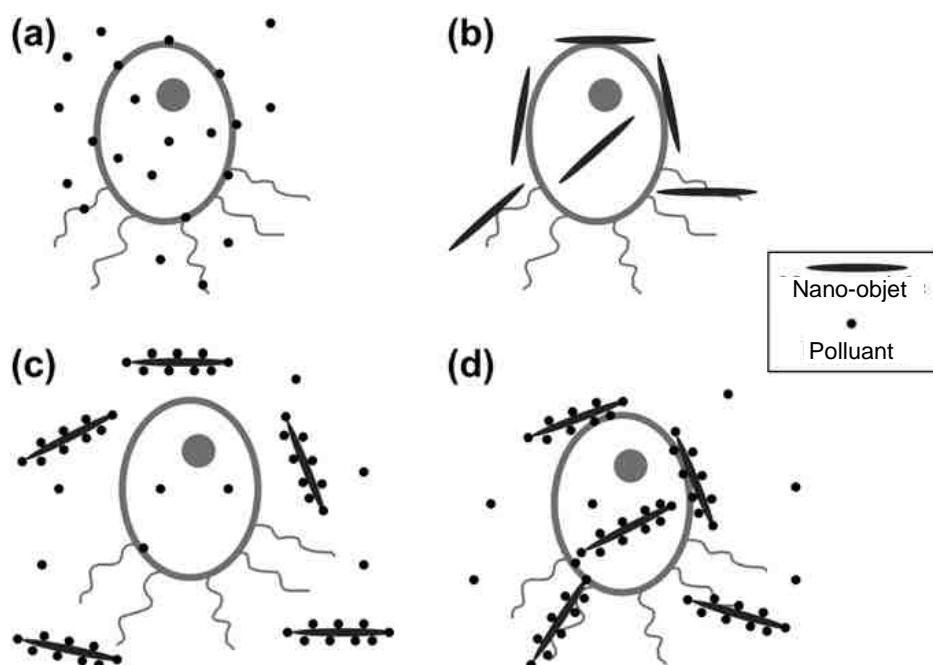


Figure 7. Représentation des interactions possibles entre les nano-objets, les polluants et les organismes.

(a) Adsorption et accumulation de polluants, (b) adsorption et accumulation de nano-objets, (c) adsorption (ou absorption) de polluants sur les nano-objets et accumulation réduite de polluants par les organismes puis (d) adsorption des nano-objets liés aux polluants adsorbés et accumulation possible de l'association polluants/nano-objets (Nowack *et al.*, 2007).

Les effets d'interaction au niveau cellulaire et moléculaire ont été étudiés entre des NP ZnO et des polluants organiques où une augmentation des dommages à l'ADN chez la moule d'eau

douce *Unio tumidus* a été mesurée (Falfushynska et al., 2015). Al-Shaeri et al (2013) ont également mis en évidence des lésions à l'ADN induit par des SWCNT (stabilisés dans de l'eau de rivière) co-exposé avec du Cd ou du Zn mais sans étudier l'adsorption des nanotubes pour les métaux (Al-Shaeri et al., 2013).

Le cadmium

Le Cd fait partie des métaux lourds les plus toxiques pour l'homme et l'environnement. Trouvé à l'état naturel au niveau de la croûte terrestre, ce métal est utilisé pour la production de batterie, de pigments pour la peinture ainsi que pour la production de plastiques (USGS, 2013). L'exposition des hommes au Cd se fait principalement par l'air via l'affinage de métaux non ferreux et la combustion de combustibles pour l'électricité et le chauffage. Dans le milieu aquatique, la présence de Cd provient principalement du traitement des eaux usées, de la production et du traitement de métaux non ferreux et des pâtes et papiers (Hare, 1992).

Le Cd est un métal non-essentiel à la vie, dont les effets toxiques sont étudiés chez l'homme depuis plus d'un siècle avec l'observation d'effets cancérogène, nephrotoxique, mais aussi une fragilisation des os avec la maladie Itai-Itai découverte au Japon dans les années 1950 après une forte intoxication via les cours d'eau pollués par les industries minières (Åkesson et al., 2005; EPA, 2014; Hagino, 1957; Nordberg, 2009). Dans le milieu aquatique, le Cd peut diminuer la bioluminescence bactérienne ou la survie et la reproduction des invertébrés (Ishaque et al., 2006; Spehar et al., 1978), notamment des daphnies (Attar et al., 1982; Bodar et al., 1988). Au niveau cellulaire, le Cd peut modifier la phase 1 de la réponse aux xénobiotiques tels que diminuer l'activité du cytochrome P450 (Anjum et al., 1992); ainsi que la phase 2 avec la Glutathion S-transferase (GST) (Bouraoui et al., 2008). De plus, le Cd est capable de modifier le système immunitaire des poissons en réduisant la stabilité des lysosomes et la production de métallothionéines (qui permettent de stocker les métaux dans l'organisme) (Roméo et al., 2000). Chez les bivalves, le Cd peut être bioaccumulé et une diminution de la production des ROS chez l'huître *Crassostrea gigas* et de l'activité des enzymes antioxydantes chez la moule marine *M. galloprovincialis* a été mesurée (Auffret et al., 2002; Gómez-Mendikute et al., 2003; Koutsogiannaki et al., 2015). En effet, des études ont montré qu'il pouvait affecter les enzymes antioxydantes, impliquées dans le stress oxydant, ce qui peut par ailleurs mener à des effets génotoxiques tels que des dommages à l'ADN. Ainsi, une induction du taux de cassure de

l'ADN a été mis en évidence chez l'escargot *Potamopyrgus antipodarum* et la moule *Dreissena polymorpha* exposés à de faibles concentrations (10-100 µg/L) (Vincent-Hubert *et al.*, 2011; Vincent-Hubert *et al.*, 2012). De plus, le Cd pourrait également interagir avec les systèmes de réparation de l'ADN (Waisberg *et al.*, 2003). Une étude a mis en évidence l'inhibition de la réparation des lésions ADN par le Cd suite à une exposition d'embryons de la crevette *Paleomonetes pugio* au Benzo(a)pyrène et aux ultra-violet (Hook *et al.*, 2004).

L'amélioration de la dépollution des sols et des eaux contaminés aux métaux lourds et notamment au cadmium est étudiée de près. Différents types de NM ont été envisagés avec parmi eux les NTC qui sont de très bons adsorbants (Mauter *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2007). Cela pose la question des effets potentiels de co-exposition entre les NTC et le Cd pour les organismes aquatiques. Ainsi, l'un des objectifs de ce projet est d'évaluer les effets d'interactions entre le Cd et les SWCNT.

2 LES MÉTHODES D'ÉVALUATION EN ÉCOTOXICOLOGIE

L'augmentation des activités humaines au début du 20e siècle a conduit à une introduction de plus en plus importante de produits chimiques dans l'environnement. C'est en 1969 que le terme écotoxicologie voit le jour (Truhaut, 1977). À cette époque, le domaine est considéré comme une extension de la toxicologie humaine. Actuellement, l'écotoxicologie se définit comme étant un domaine d'étude intégrant les effets écologiques et toxiques des contaminants chimiques sur la population, les communautés et les écosystèmes mais aussi sur leur devenir, en considérant leur transfert, leur transformation et dégradation, dans l'environnement (Forbes & Forbes, 1997).

Ainsi, l'écotoxicologie consiste à étudier l'impact des polluants, comme les NM, sur l'air, le sol et le milieu aquatique. Cette discipline fait principalement appel à la toxicologie et à l'écologie et très souvent à la chimie. Elle utilise de nombreux outils tels que le suivi de bioindicateurs y compris d'espèces sentinelles, la réalisation de tests de toxicité en laboratoire dans des conditions contrôlées et la mesure de biomarqueurs.

2.1 Les bioessais ou tests de toxicité

Il existe plusieurs façons d'évaluer les effets écotoxiques des substances chimiques sur les organismes. Les bioessais appelés couramment tests de toxicité sont des tests expérimentaux réalisés pour évaluer la toxicité d'une substance ou d'un mélange chez un groupe d'organismes (Chapman, 1995). Effectués le plus souvent en conditions contrôlées, il existe plusieurs tests de toxicité standardisés, mis au point par des organismes nationaux voir internationaux, permettant de mesurer la toxicité aiguë ou chronique sur une espèce représentative d'un groupe d'organisme et d'un niveau trophique (Environment-Canada, 1990; OECD, 2008). L'utilisation de ces tests facilite la comparaison des données entre les divers instituts. Ils vont permettre de relier l'effet observé à la concentration testée en réalisant une courbe dose-réponse.

2.1.1 Les tests de toxicité aiguë

Les tests de toxicité aiguë sont généralement utilisés pour étudier de nouvelles substances ou mélanges afin de dépister les effets ainsi que pour évaluer les effets d'une éventuelle pollution accidentelle et ponctuelle. Pour ces tests, les organismes sont exposés sur une courte durée par rapport à leur cycle de vie, de quelques heures à plusieurs jours, et à une large gamme de concentration (voir Tableau 2). Ces tests permettent de calculer des paramètres de mesures toxicologiques comme la concentration létale pour 50 % des organismes (CL50) ou la concentration avec effet chez 50 % des organismes (CE50). Les concentrations utilisées sont souvent élevées et peu représentatives de ce qui peut être mesuré dans l'environnement.

2.1.2 Les tests de toxicité chronique

À l'inverse, pour les tests de toxicité chronique, ce sont de faibles concentrations qui vont être utilisées. Plus proches des conditions environnementales, ces tests vont permettre d'identifier des effets toxiques à long terme, directement lié à la durée de vie de l'organisme étudié. Dans les études de toxicité en milieu aquatique, plusieurs espèces et types de tests sont fréquemment utilisés (voir Tableau 2).

L'utilisation des tests de toxicité est une étape préliminaire à l'évaluation du risque que peuvent poser la/les substances étudiées pour les organismes. Étant donné que les organismes présentent des sensibilités différentes vis-à-vis des contaminants, il est recommandé d'utiliser une batterie de tests, sur au moins 3 organismes (idéalement représentatifs de plusieurs niveaux trophiques) ou bien de mesurer trois types d'effets tels que la survie, la croissance la reproduction, etc. (Charissou *et al.*, 2006). Néanmoins, une approche complémentaire qui consiste à évaluer les effets en conditions plus proches de celle de l'environnement est souvent recommandée. Des microcosmes ou mésocosmes sont ainsi utilisés pour simuler un écosystème aquatique et comprennent plusieurs espèces représentatives de niveaux trophiques. Par ailleurs, le devenir et la transformation des contaminants dans l'environnement sont des éléments importants à prendre en compte pour effectuer un diagnostic de la contamination. Leur solubilité, temps de résidence et capacité d'interaction avec les organismes permettent de déterminer leur potentiel d'interaction et de persistance dans l'environnement.

	Test de toxicité	Organisme	Milieu	Durée d'exposition	Protocole
AIGUË	Inhibition de la bioluminescence (Microtox)	<i>Vibrio fischeri</i>	Eau	5, 15 ou 30 minutes	ISO 11348-3:2007
	Létalité/immobilisation des daphnies	<i>Daphnia magna</i>	Eau	48-h	SPE 1/RM/14
	Survie d'un amphipode	<i>Hyalella azteca</i>	Eau	96-h	EPA 600/R-94/024
	Survie/croissance d'un amphipode	<i>Hyalella azteca</i>	Sediment	14-J	EPS 1/RM/32
	Létalité de la truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Sediment	96-h	SPE 1/RM/13
CHRONIQUE	Inhibition de la croissance alguaule	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Eau	96-h	CEAEQ MA. 500 – P.sub 1.0
	Reproduction des daphnies	<i>Daphnia magna</i>	Eau	21-J	OCDE Test No. 211
	Inhibition de la croissance de la population de daphnies	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Eau	7-J	EPS 1/RM/21
	Croissance/reproduction d'un amphipode	<i>Hyalella azteca</i>	Sédiment	42-J	EPA 600/R-99/064

Tableau 2. Différents bioessais utilisés pour évaluer la toxicité de contaminants dans le milieu aquatique.

2.2 Les biomarqueurs

Le terme de biomarqueur désigne toute modification détectable au niveau moléculaire biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, aussi bien dans les tissus que les fluides ou encore l'organisme complet permettant de caractériser l'exposition ou le/les effets d'un ou plusieurs polluants (Depledge, 1994). Utilisés après des expositions en laboratoire ou lors d'études de surveillance sur le terrain, ils permettent de mesurer de manière précoce les réponses des organismes aux conditions du milieu (contamination). Les biomarqueurs permettent de mesurer des effets reprotoxiques, neurotoxiques, immunotoxiques, génotoxiques, cytotoxiques, etc. La distinction entre les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet est souvent établie et ce en dépit du fait que certains d'entre eux puissent appartenir aux deux catégories (Amiard *et al.*, 2008). Ainsi, les biomarqueurs d'exposition indiquent que le contaminant est entré dans l'organisme et met en jeu des mécanismes de régulation intrinsèque tels que des paramètres de défense (inhibition de l'acétylcholine estérase, induction de protéines de transport membranaire du système MXR/MDR pour transporter les métabolites et les xénobiotiques, etc.). Les biomarqueurs d'effets, eux vont mettre en évidence un dépassement durable ou temporaire des capacités de régulation de l'organisme, avec par exemple une modification de la viabilité cellulaire voir de celle des individus.

Plusieurs biomarqueurs sont utilisés pour suivre ou évaluer l'impact de contaminants chez les mollusques bivalves en laboratoire (Zhang *et al.*, 2010) et notamment les NM, car ils ont été qualifiés de cible privilégiée des effets toxiques des nano-objets (Tableau 3) (Canesi *et al.*, 2012). Présents dans différents écosystèmes et de manière sédentaire, ce sont des organismes filtreurs capables d'accumuler des contaminants dans leurs tissus. Les effets toxiques à long terme peuvent être étudiés à l'aide de biomarqueurs pour mettre en évidence des perturbations du système immunitaire, de stress oxydant ou encore de lésions à l'ADN (Gillis *et al.*, 2014; Lacaze *et al.*, 2015).

Espèces	Type de NP	Effets toxiques	Caractérisation des particules	Etat d'agglomération	Références
<i>M. edulis</i>	NTC	Hemocytes : stabilité membranaire des lysosomes	-	-	Moore et al. 2009
<i>M. galloprovincialis</i>	C60 fullerene	Hemocytes : paramètres du système immunitaire, production d'ERO, paramètre de la mitochondrie, signalisation	+	+	Canesi et al. 2010a
<i>M. galloprovincialis</i>	C60 fullerene	Glandes digestives : paramètre du stress oxydant, Branchies : activité des enzymes antioxydantes	+	+	Canesi et al. 2010b
<i>C. virginica</i>	C60 fullerene	Cellules du système digestif, accumulation des aggrégats, développement larvaire	+	+	Ringwood et al. 2009
<i>M. edulis</i>	SWCNT	Hémocytes : dommages à l'ADN, stress oxydant	+	+	Al shaeri et al. 2013
<i>M. modiolus</i>	MWCNT	Modifications histologiques au niveau des branchies, de l'intestin et des glandes digestives	+	+	Anisimova et al. 2014

Tableau 3. Paramètres cellulaires et moléculaires mesurés chez des mollusques bivalves exposés à des nanomatériaux carbonés. Le “+” signifie que le paramètre a été mesuré et les “-“ qu'il n'a pas été mesuré.

2.2.1 Le système immunitaire des mollusques

L'étude des modifications du système immunitaire par les perturbations environnementales a été très développée chez les mollusques. En effet, ce sont des organismes présents dans une importante zone de répartition et ils sont en contact avec divers contaminants capables d'agir sur différents paramètres physiologiques, notamment leur système immunitaire (Gagnaire *et al.*, 2004; Ivanina *et al.*, 2014b; Kádár *et al.*, 2001).

Aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés, le système immunitaire permet le maintien de l'intégrité de l'organisme contre les agents infectieux ou tout constituant étranger (Revillard, 2001). Chez les bivalves, leurs défenses immunitaires sont fondées sur un système inné, non lymphoïde et impliquent à la fois des composés cellulaires et humoraux (Smith, 2001).

Avant toute chose, les bivalves disposent de molécules d'adhérence appelées lectines, qui leur permettent d'identifier le non-soi et vont se lier de manière réversible aux molécules glycosylées des cellules étrangères (Söderhäll, 2010). Ensuite, la réponse cellulaire va faire intervenir les hémocytes, des cellules transportées par l'hémolymphé dans un système circulatoire ouvert (Auffret, 1988; Renwrantz, 1990). Ces cellules vont réaliser la phagocytose, ce qui constitue le principal mécanisme de défense cellulaire des bivalves (Donaghy *et al.*, 2015). Les hémocytes sont composés de trois types de cellules. Les granulocytes composés de basilophiles (cellules à petits granules) et d'éosinophiles (cellules à gros granules), les cellules intermédiaires et les hyalinocytes (Auffret, 1988; Wootton *et al.*, 2003). Ces dernières sont les plus petites et moins complexes des hémocytes. L'hémolymphé contient également différents composés capables d'aider la réponse immunitaire humorale.

La réponse humorale fait intervenir des composés tels que des peptides antimicrobiens, des lysozymes et la production d'ROS au niveau de l'hémolymphé (Canesi *et al.*, 2002a; Leroy *et al.*). Les peptides antimicrobiens sont produits par les hémocytes puis stockés dans les granulocytes (Cooper, 2003). Ces peptides peuvent également intervenir pendant la phagocytose. Les lysozymes sont des enzymes ayant la capacité de digérer la paroi des bactéries et seraient impliqués aussi bien au niveau du système immunitaire que de la digestion (Chu *et al.*, 1989; McHenery *et al.*, 1979).

Il existe également divers médiateurs chimiques capables de participer à la phagocytose mais aussi à la multiplication et différenciation des hémocytes. Ces composés regroupent des monoamines telles que la dopamine, des glucocorticoïdes, de l'oxyde nitrique ainsi que des

cytokines telles que l'interleukine 1 et 6 (Tiscar *et al.*, 2004). Une réponse inflammatoire peut également avoir lieu avec l'intervention de la cyclo-oxygenase (COX) qui est responsable de la production de prostaglandines dans les tissus (Gagné *et al.*, 2004; Appelton *et al.* 1996). Au niveau des hémocytes, la COX participerait à la destruction des bactéries (Canesi *et al.*, 2002b).

De nombreuses études ont été réalisées sur l'action des polluants sur les hémocytes de bivalves tels que les huîtres, les myes ou les moules (Beckmann *et al.*, 1992; Ivanina *et al.*, 2014b; Sauvé *et al.*, 2002). De plus, l'action de différents paramètres environnementaux sur l'activité phagocytaire a souvent été abordée. Ainsi, des perturbations de la phagocytose dues à des modifications de températures, salinités, pH ou encore teneur en oxygène ont été précédemment observées (Chen *et al.*, 2007; Gagnaire *et al.*, 2006a; Parry *et al.*, 2004; R *et al.*, 2008). De plus, l'exposition des bivalves à des contaminants tels que des pesticides, des hydrocarbures polyaromatiques, des métaux (cadmium, plomb, mercure) et des NP s'est montrée néfaste pour l'activité phagocytaire des organismes (Barmo *et al.*, 2013; Gagnaire *et al.*, 2006b; Ivanina *et al.*, 2014a; Sauvé *et al.*, 2002). Aucune étude de ce type avec les NTC n'a été trouvé dans la littérature.

Ces modifications du système immunitaire des mollusques après exposition à des contaminants permettent de suivre leurs effets à long terme sur les bivalves. En effet, si le système immunitaire des organismes est perturbé, cela signifie qu'ils seront plus vulnérables face aux infections microbiennes et le maintien des populations s'en trouvera menacé. Les biomarqueurs du système immunitaire sont donc de bons moyens d'évaluer l'état de santé des organismes aquatiques. D'autres biomarqueurs tels que ceux du stress oxydant ou des effets génotoxiques peuvent également être utilisés pour dresser un portrait général de l'état cellulaire des organismes étudiés.

2.2.2 Le stress oxydant

L'induction de stress oxydant est un des effets les plus observés parmi les études sur les NTC. Il est possible de l'évaluer à l'aide de différents outils et à plusieurs niveaux. Ainsi, la mesure de l'activation des processus de protection cellulaire peut être effectuée ; la réponse inflammatoire

ou le coût énergétique (à travers le calcul de l'allocation énergétique cellulaire ou la LDH) du à l'action des ROS peuvent être déterminés ; et enfin, les conséquences du stress oxydant en mesurant l'impact génotoxique ou encore l'état d'apoptose peuvent être entrepris.

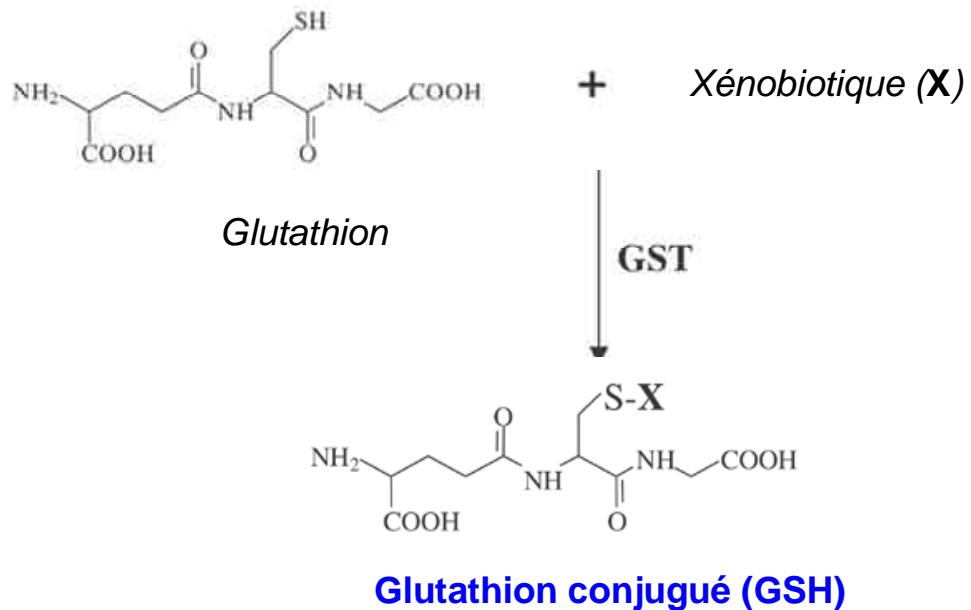
2.2.2.1 Glutathion S-transferase

Les GST forment un groupe d'isoenzymes qui interviennent dans la biotransformation des xénobiotiques (Figure 8.A) en conjuguant le glutathion réduit (GSH) permettant d'éliminer le composé (Parant, 1998). La mesure de l'activité GST permet de déterminer la présence de stress oxydant. Une augmentation de l'activité de la GST a précédemment été observée chez le coquillage *Scrobicularia plana* exposé à des NP Ag (Buffet *et al.*, 2013) et l'escargot *L. luteola* exposé à des SWCNT pendant 24 h à 21 mg/L et 96 h à 10 mg/L (composition du milieu non précisée dans l'article) (Ali *et al.*, 2014).

2.2.2.2 Lactate deshydrogenase

La régulation du stress oxydant ayant un coût énergétique pour la cellule, il peut être aussi intéressant de mesurer l'activité de la LDH qui permet à la glycolyse de s'effectuer en absence d'oxygène (Figure 8.B) et qui constitue un indicateur de dommages cellulaires (Long *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1997). Une diminution de l'activité de la LDH a été mesurée chez des algues marines exposées à des NP ZnO (Suman *et al.*, 2015) et sur des cellules de mammifères exposées *in vitro* à des MWCNT à 20 mg/L (Zhang *et al.*, 2011).

A



B

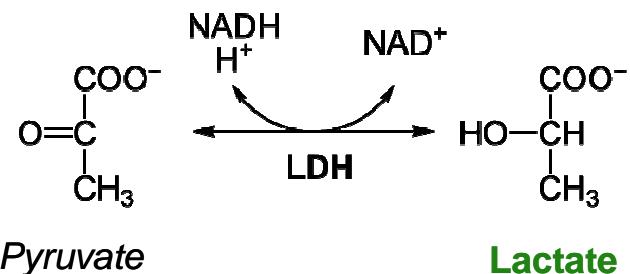


Figure 8. Représentation des réactions catalysées par la glutathion S transferase et la lactate déshydrogénase

A. Biotransformation des xénobiotiques par une conjugaison au glutathion réduit (GSH) grâce à l'action de la glutathion S transferase (GST). B. En absence d'oxygène, la lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la conversion du pyruvate en lactate en fin de glycolyse.

2.2.3 Détection des lésions à l'ADN avec le test comète

2.2.3.1 Généralité sur les dommages à l'ADN

L'ADN est le support universel de l'information génétique et permet sa transmission d'une génération à l'autre y compris des erreurs qu'elle peut contenir. Ces erreurs peuvent être dues à des activités endogènes (au sein de l'organisme) ou bien à des perturbations exogènes telles que des perturbations environnementales.

Les modifications d'origine endogène peuvent induire une erreur de base telle que des oxydations ou méthylations mais aussi des dépurinations et dépyrimidations, puis des changements de séquences. Les perturbations d'origine exogène peuvent conduire à des erreurs d'appariements ou bien à la perte de matériel génétique sous la forme de : cassures simple ou double brin, formation d'adduits par l'ajout de molécules exogènes, lésions oxydatives, etc. (Hoeijmakers, 2001). Des mutations chromosomiques peuvent également être induites par des effets aneugènes, provoquant des anomalies du nombre de chromosome ou des effets clastogènes, provoquant des cassures au niveau des chromosomes.

Malgré tout, différents systèmes de réparation peuvent être mis en place par la cellule pour conserver l'intégrité du génome tel que la réparation par réversion des lésions, celle par excision de bases/nucléotides, mais aussi la réparation par recombinaison et l'activation de mésappariements (Clancy, 2008).

Parmi les différents types de lésions à l'ADN les cassures double brin représentent la forme la plus sévère de dommages. Particulièrement difficiles à réparer, ces cassures peuvent induire des mutations voir la mort des cellules (Bradley *et al.*, 1987). Elles peuvent également entraîner la perte de fragments d'ADN ou conduire à l'appariement de chromosomes non homologues ce qui aura pour conséquence la perte ou à l'inverse une augmentation du nombre de chromosomes.

Les effets génotoxiques sont de plus en plus étudiés en écotoxicologie aquatique. En effet, différents contaminants (métaux, hydrocarbures, NM, etc.) sont capables d'interagir avec la molécule d'ADN, ce qui pourra perturber le cycle voir la croissance cellulaire des organismes. L'évaluation des lésions de l'ADN permet donc d'appréhender la relation entre la contamination d'un milieu et la réponse biologique des organismes. Ces tests apportent des renseignements sur l'intégrité du génome et le mécanisme d'action des contaminants. Le plus populaire d'entre

Il est actuellement le test comète qui s'est révélé être une méthode efficace pour étudier l'impact des contaminants présents dans l'environnement (Frenzilli *et al.*, 2009).

2.2.3.2 Le test comète

Le test comète ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) est un des tests les plus utilisés chez les organismes aquatiques, à la fois *in situ*, *in vitro* et *in vivo* (Al-Subiai *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). Son utilisation permet de détecter des cassures d'ADN simple et double brin, des sites alcali-labiles (sites dits abasiques), des liaisons ADN-ADN/ADN-protéine ainsi que des cassures associées à des sites de réparation par excisions incomplètes (Figure 9) (Tice *et al.*, 2000). Les nombreux avantages du test comète en font un des tests les plus employés. En effet, en plus d'être applicable à différents types cellulaires chez de nombreuses espèces différentes, il peut détecter les dommages au niveau d'une seule cellule et il ne requiert qu'un petit nombre de cellules (environ 1 000 par lame) (Collins *et al.*, 1997).

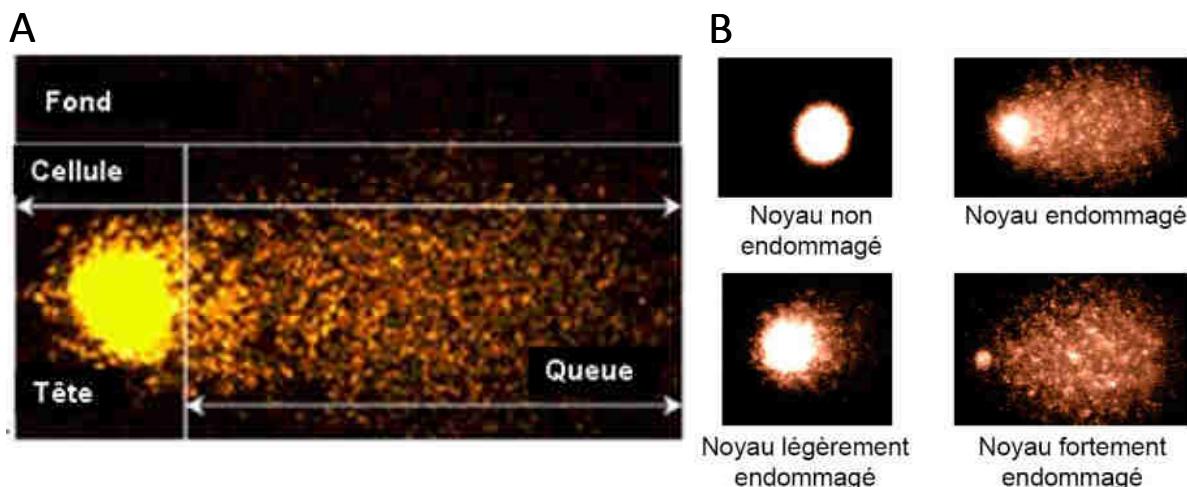


Figure 9. Photographies de noyaux endommagés ou non après un test comète.

A : analyse d'une comète avec la tête, la queue et les régions d'intérêt en fond. cometassayindia.org, © Dr. N.P. Singh. B : représentation des quatre types de cassures au niveau de cellules endommagées, mis en évidence par le test comète.

De plus, il est généralement plus simple, plus rapide à réaliser et surtout plus sensible que d'autres tests tels que l'essai d'échanges de chromatides sœurs et l'élution alcaline (Green *et al.*, 1996; Latt *et al.*, 1978; Leroy *et al.*, 1996). Ce test est utilisé pour le suivi de contaminations chez des poissons marins et d'eau douce (Nacci *et al.*, 1996; Sumathi *et al.*, 2001), ainsi que chez plusieurs bivalves comme les moules d'eau douce *Unio tumidus* et *Dreissena polymorpha* (Binelli *et al.*, 2007; Lemiere *et al.*, 2005). L'utilisation du test comète pour évaluer la génotoxicité des NM a lieu depuis plusieurs années notamment pour l'étude des NTC (Ali *et al.*, 2014; Zeni *et al.*, 2010). Alors que Zeni *et al.* (2010) ont testé l'utilisation du test comète après exposition *in vitro* de cellules de mammifères, Ali *et al.* (2014) ont mis en évidence une augmentation du taux de cassures de l'ADN chez l'escargot *L. luteola* exposé pendant 24h et 96h aux SWCNT de 10 à 32 mg/L.

3 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les données de toxicité des SWCNT varient beaucoup dans la littérature et leur potentiel écotoxicité est toujours à déterminer. La thèse présentée est définie en trois parties qui reposent chacune sur un modèle biologique particulier et une méthodologie spécifique afin de fournir des informations complémentaires.

La réalisation de cette étude s'est articulée autour des trois hypothèses suivantes auxquelles nous avons voulu répondre : 1) la toxicité des SWCNT bruts est modulée par des facteurs abiotiques ; 2) La présence des SWCNT modifie la biodisponibilité de contaminants présents dans le milieu et les SWCNT vont affecter la toxicité de ces contaminants ; 3) les SWCNT bruts et purifiés présentent des effets toxiques sous létaux impliquant le stress oxydant, une perturbation du système immunitaire et des effets génotoxiques.

Ainsi, l'objectif général de la thèse est de déterminer l'influence de divers paramètres abiotiques sur la toxicité des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) bruts et purifiés sur trois organismes d'eau douce. Premièrement, l'influence de la présence de sédiment et de la durée d'exposition a été étudiée (article 1, publié). Ensuite, l'impact de la présence d'un contaminant métallique, le cadmium, a été mesuré à l'échelle de l'individu (article 2). Enfin, l'évaluation de la toxicité des SWCNT, seuls ou en présence de cadmium, à l'échelle de la cellule a été réalisée (article 3 en préparation). Ainsi, cette étude a permis d'étudier les effets directs des SWCNT (seuls), puis indirects à travers son interaction avec le cadmium.

4 PLAN EXPERIMENTAL

4.1 Modèles biologiques

Dans cette étude trois organismes ont été sélectionnés afin d'évaluer au mieux les effets des NTC et de leurs interactions avec des éléments présents dans l'environnement. Ces organismes sont tous susceptibles de se retrouver en contact avec les NTC (Figure 10).

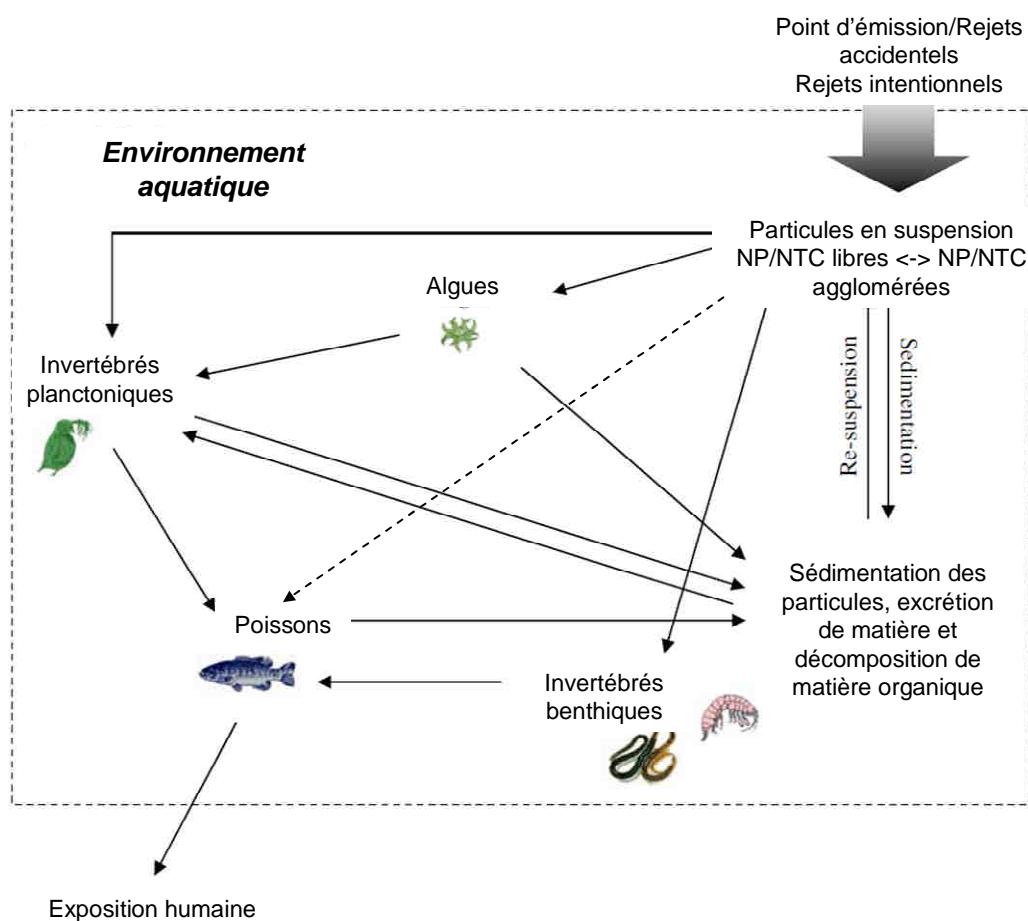


Figure 10. Interaction des nanomatériaux avec les organismes du milieu aquatique (Traduit de Baun et al., 2008)

Considérant la diversité de sensibilité entre les différentes espèces ainsi que les paramètres mesurés, l'utilisation de plusieurs types de tests et d'espèces est de plus en plus préconisée pour les études d'écotoxicologie. De plus, la mesure de paramètres biologiques situés à

différents niveaux d'intégration biologique telle que physiologique, cellulaire ou encore moléculaire et chez des espèces à différents niveaux trophiques, fournit un meilleur diagnostic de la qualité du milieu et permet de mieux appréhender les effets d'une substance en laboratoire.

4.1.1 L'amphipode d'eau douce *Hyalella azteca*

4.1.1.1 Présentation de l'organisme

Les amphipodes d'eau douce jouent un rôle important dans le milieu benthique. Ils sont abondants et situés entre les producteurs et les niveaux trophiques supérieurs. Parmi eux, l'amphipode *H. azteca* (Figure 11) est un membre de la famille Hyalellidae, très souvent utilisé pour évaluer la santé de l'environnement. Sa zone de répartition géographique s'étend du centre du Mexique jusqu'à la limite de la flore arborescente du Canada ainsi qu'en Alaska. *H. azteca* se retrouve habituellement dans les habitats lenticques, tels que les étangs, et les habitats lotiques, tels que les cours d'eau et particulièrement ceux qui présentent un fond de sédiments. C'est une espèce épibenthique qui vit dans les premiers centimètres des sédiments et se nourrit essentiellement de détritus organiques et du périphyton.

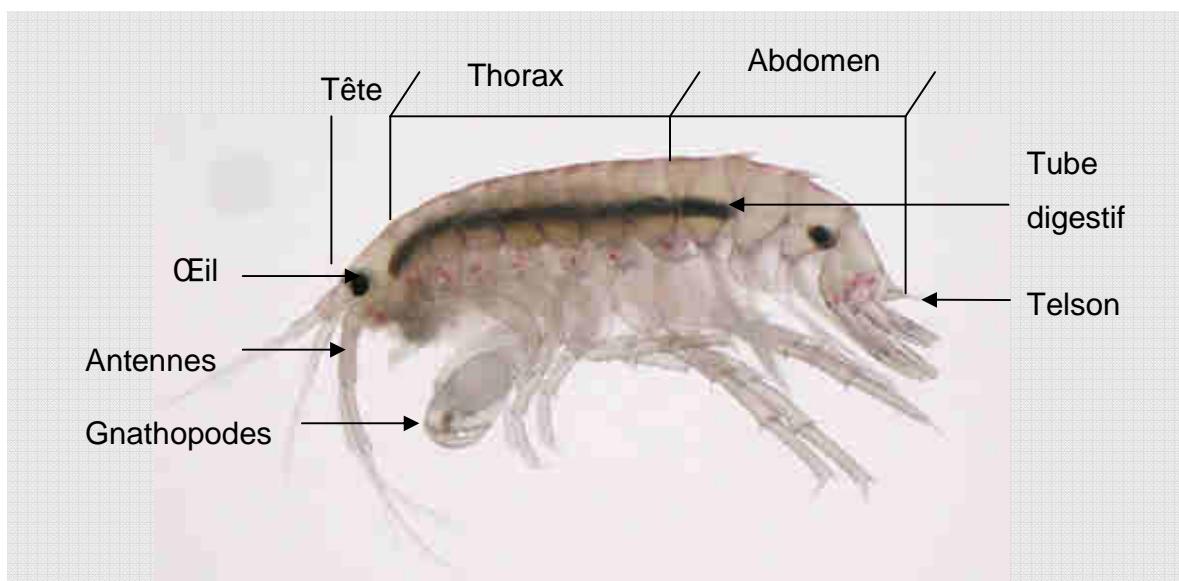


Figure 11. Photographie d' un amphipode d'eau douce mâle *Hyalella azteca*.

Photo tirée de http://www.sc-sts.co.jp/service/environmental_assay/bug04.html (visité le 20 avril 2015).

Les mâles adultes peuvent mesurer jusqu'à 8 mm et les femelles jusqu'à 6 mm de longueur. Pourvue d'une reproduction sexuée, celle-ci est initiée lorsque la température de l'eau dépasse les 10 °C (Canadian Museum of nature, 2007).

Pour l'accouplement, les mâles vont rechercher les femelles et utiliser leurs gnathopodes pour s'y accrocher. Ils peuvent ainsi rester attachés pendant des heures ou des jours (Othman *et al.*, 2001). *H. azteca* est une espèce importante des premiers niveaux trophiques.

4.1.1.2 Utilisation en écotoxicologie

H. azteca a très souvent été utilisé pour les tests de toxicité aiguë mais surtout chronique avec les sédiments contaminés. En effet, c'est une espèce facile à maintenir en élevage et qui s'avère sensible aux contaminants comme des métaux, des pesticides ou encore des composés pharmaceutiques (Borgmann *et al.*, 2007; Borgmann *et al.*, 1989; Liber *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2013). Les tests de toxicité peuvent être réalisés sur le terrain, mais ont plus souvent lieu en laboratoire. Plusieurs protocoles standardisés ont été développés pour évaluer les effets à court terme sur la survie des organismes et à long terme sur la survie, la croissance et la reproduction (Environment-Canada, 1990; USEPA, 1994). Cette espèce permet d'étudier l'effet de substances qui sédimentent, et ainsi, appréhender les effets à long terme.

Cet organisme est très intéressant pour notre étude, car il nous permet d'évaluer l'impact des NTC qui ont une forte tendance à sédimer dans le milieu et pourront se retrouver directement en contact avec les amphipodes.

4.1.2 La daphnie *Daphnia magna*

4.1.2.1 Présentation de l'organisme

Les daphnies sont des microcrustacés fréquemment utilisés pour tester la toxicité aiguë d'un composé. La daphnie *D. magna*, communément appelée puce d'eau, appartient à la famille des Daphniidae faisant partie de l'ordre des cladocères (Figure 12). Elle vit en milieu dulçaquicole, en eau stagnante et constitue l'essentiel du zooplancton d'eau douce des zones tempérées.

Elle se nourrit en filtrant le phytoplancton et peut se reproduire de manière sexuée ou asexuée en fonction des conditions environnementales. Ainsi, en conditions favorables, les daphnies se reproduiront par parthénogénèse, formant une population génétiquement stable. Par contre, dans des conditions défavorables, elles produiront des éphippies, œufs ayant été fécondés par un mâle.

La taille des organismes se situe entre un demi-millimètre et un centimètre, selon les espèces, mais à l'intérieur d'une même espèce, la taille peut grandement varier (les femelles daphnies peuvent mesurer entre 3 et 5 mm). Les mâles eux se distinguent des femelles par une plus petite taille, de plus grandes antennules, un post-abdomen modifié et la présence d'un crochet utilisé pour l'accrochage des femelles (Pennak, 1978).

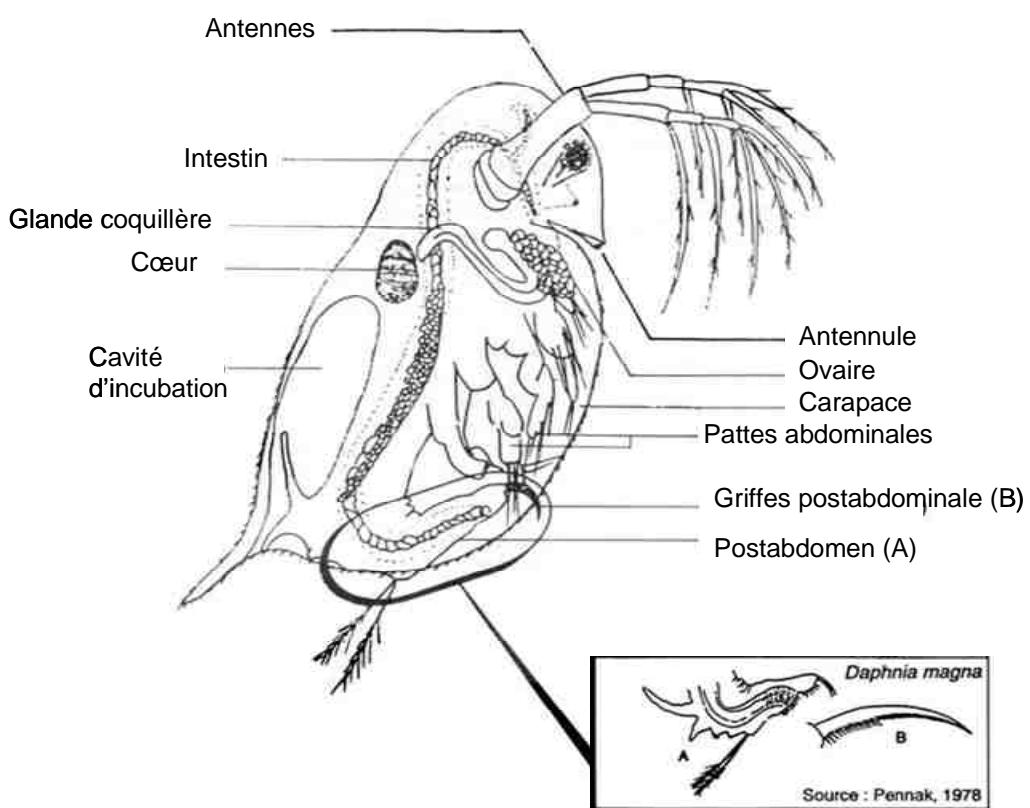


Figure 12. Schéma du microcrustacé *Daphnia magna* (Tiré de Pennak, 1978).

4.1.2.2 Utilisation en écotoxicologie

Cette espèce est très utilisée en écotoxicologie, notamment pour les tests de toxicité, du fait des nombreux avantages qu'elle présente (OECD, 2008). Relativement facile à élever, son cycle de vie est assez court, permettant de suivre l'effet des substances sur plusieurs générations. De plus en tant que consommateur primaire, elle occupe une position clé dans le réseau trophique.

L'utilisation des daphnies dans cette étude nous permet d'évaluer l'effet des SWCNT à court terme, à l'aide de tests de toxicité aiguë.

4.1.3 La moule d'eau douce *Elliptio complanata*

4.1.3.1 Présentation de l'organisme

La moule d'eau douce *E. complanata* fait partie de la famille des Unionidae (Figure 13). Elle se retrouve dans l'est de l'Amérique du Nord, du Saint-Laurent aux Grands Lacs et jusqu'au nord de la Floride. Elle occupe une grande diversité d'habitats, principalement dans les substrats de sable ou de vase. Enfoncée dans le sédiment, elle se nourrit par filtration des particules en suspension (détritus, invertébrés et algues planctoniques). Elle constitue également un important maillon de la chaîne alimentaire, car elle est consommée par divers mammifères aquatiques (loutres, rats laveurs). Ce mode d'alimentation peut entraîner une bioaccumulation des contaminants présents dans le milieu par diffusion directe au niveau des branchies et également par ingestion via le tractus digestif. Cela en fait donc une très bonne espèce sentinelle permettant d'évaluer les effets d'exposition à long terme à l'aide de biomarqueurs.

Sa coquille est faite de sillons permettant d'évaluer l'âge des individus. Dans le milieu naturel, ces derniers peuvent vivre jusqu'à 30 ans (Downing *et al.*, 1989). Les organismes ne présentant pas de dimorphisme sexuel, la différenciation mâle et femelle ne peut se faire qu'après la réalisation d'un frottis des gonades ou d'analyse histologique.

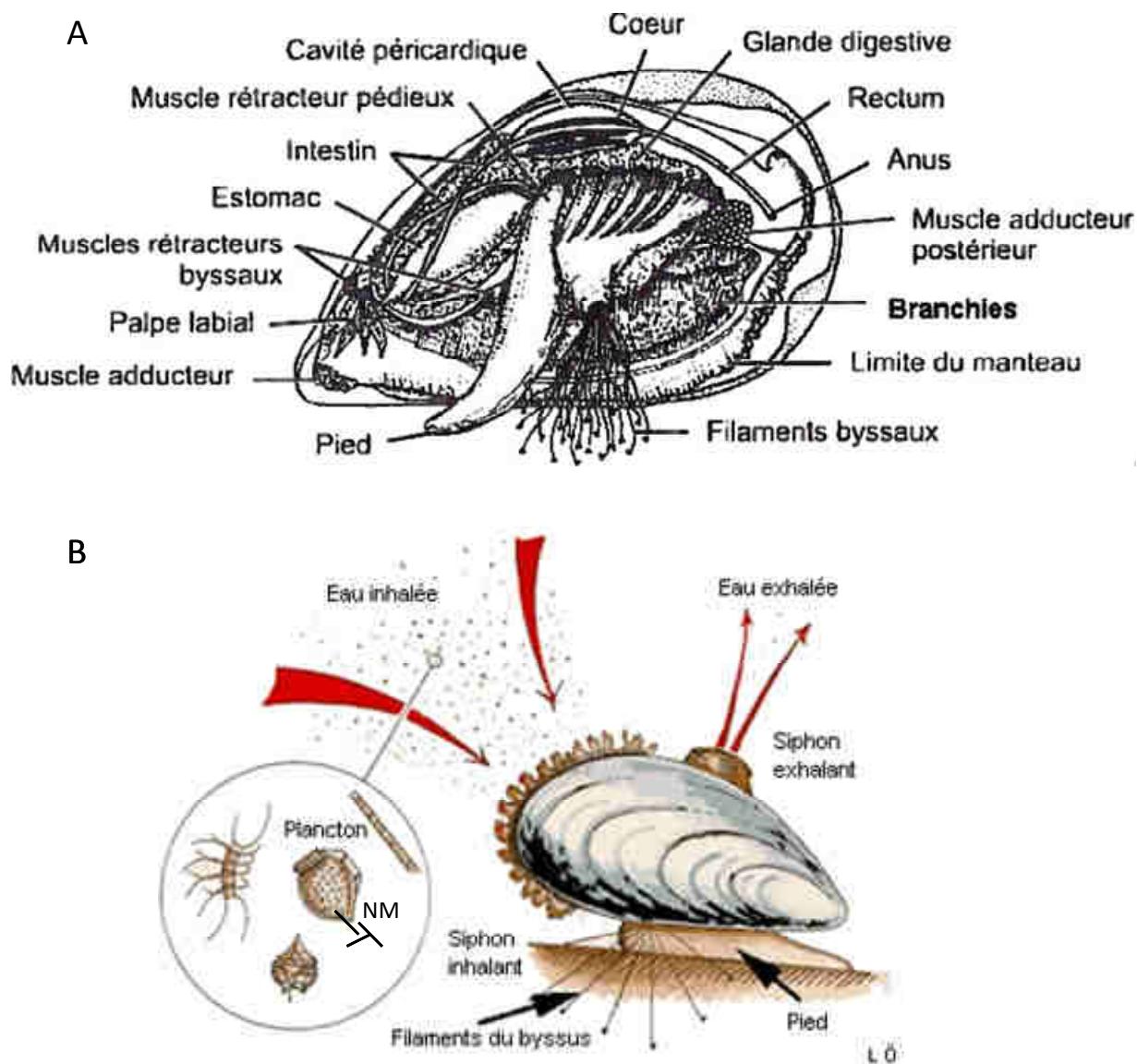


Figure 13. Schéma et cycle d'absorption de la moule.

A : schéma d'une coupe transversale de moule (<http://quilaztli.over-blog.com/2014/03/mytiloida-les-moules-mollusques-bivalves.html>). B : mode d'inhalation et passage des particules à travers la moule (<http://svtcolin.blogspot.fr/2012/07/dissection-moule-mytilus.html>). Les moules vont filtrer l'eau et se nourrir des particules ingurgitées telles que des algues, du plancton et des petits invertébrés. Les contaminants seront également accumulés. Les filaments du byssus, sécrétés par les moules, leur permettent de se fixer à un substrat ou de se déplacer.

4.1.3.2 Utilisation en écotoxicologie

E. complanata est une espèce sentinelle très utilisée dans les études écotoxicologiques du fait de sa répartition géographique, la facilité d'échantillonnage et sa capacité d'acclimatation pour les études en laboratoire. Elle a été souvent utilisée dans des programmes de biosurveillance au Canada (Drouillard *et al.*, 2013; Gewurtz *et al.*, 2002; Richman *et al.*, 2011). Les effets de contaminants à long terme ont ainsi été étudiés sur divers paramètres tels que : le système immunitaire, la capacité reproductrice ou encore l'oxydation des macromolécules cellulaires, à l'aide de biomarqueurs (Bouchard *et al.*, 2009). Diverses études ont mesuré l'effet des métaux tels que le Cd ou le mercure (Tessier *et al.*, 1994), des produits pharmaceutiques (Farcy *et al.*, 2011) ainsi que des NP Zn et Cd QDs (Gagné *et al.*, 2015; Peyrot *et al.*, 2009).

Ainsi, l'utilisation des biomarqueurs du système immunitaire va nous permettre d'évaluer l'effet des NTC sur le maintien de l'organisme. En effet, si le système immunitaire est affaibli les organismes seront potentiellement plus sensibles aux maladies. La mesure de l'activité de la Glutathion-S-Transferase (GST) nous permettra d'évaluer l'activité de détoxicification de l'organisme exposé et les biomarqueurs du stress oxydatif nous permettront d'étudier le niveau de stress des organismes, du point de vue biochimique.

4.2 Choix, préparation et caractérisation des NTC

4.2.1 Choix des SWCNT

Pour notre étude, nous avons choisi d'étudier les NTC et notamment les SWCNT. En effet, la plupart des études sur les NM s'intéressent aux nanoparticules métalliques et particulièrement aux NP Ag et NP TiO₂. Néanmoins, les NTC comptent également un nombre important d'applications industrielles, en mécanique ou en science des matériaux et ils sont étudiés de près pour la vectorisation de molécules actives (dans le domaine médical) ainsi que pour l'élimination de contaminants, augmentant les risques de les retrouver dans l'environnement, y compris le milieu aquatique (Panyam *et al.* 2003; Liu *et al.* 2013). De plus, il nous était possible de recevoir des lots de nanotubes produits au CNRC d'Ottawa. Cela nous a permis d'une part

de connaître le processus de fabrication mais aussi plusieurs caractéristiques, déterminé par l'équipe responsable de leur production.

4.2.2 Préparation des solutions

Il existe plusieurs méthodes de dispersion des NTC et chacune d'entre elles présente des avantages et des inconvénients (voir partie 1.2.4). Pour notre étude, nous avons sélectionné la méthode par sonication permettant de disperser les NTC et d'éviter tout biais lié au surfactant sur la toxicité observée. Afin de limiter la dissolution de métaux catalyseurs, un temps de dispersion très court (10 à 15 minutes), choisi d'après la littérature, a été utilisé et la toxicité de solutions filtrées (sans nanotubes) a été évaluée.

4.2.3 Caractérisation

Différents outils de mesure ont été utilisés afin de déterminer plusieurs caractéristiques des échantillons de NTC étudiés telles que la pureté, la taille/diamètre, le taux de carbone amorphe ainsi que leur état d'agglomération dans le milieu d'exposition. La détermination de l'état d'agglomération des NTC étudiés nous permettra d'évaluer le devenir des particules, leur accumulation dans le milieu et de déterminer quel type d'organisme sera plus susceptible d'être exposé.

4.3 Les tests de toxicité utilisés

Dans cette étude, nous avons sélectionné des tests de toxicité standardisés, aigus et chroniques, afin d'évaluer les effets écotoxiques des SWCNT à l'échelle l'individu chez la daphnie et les hyalèles. Pour la réalisation du premier objectif (article 1), le test de toxicité aiguë 96 h et celui de 14 jours ont été sélectionnés afin de comparer des effets après exposition aiguë avec ou sans sédiment à l'aide de tests standardisés. Nous avons également utilisé le test de toxicité aiguë de 14 jours et le test de toxicité chronique de 42 jours afin de comparer les taux de croissance à 14 jours et 28 jours. Pour la réalisation du second objectif (article 2), le test

de létalité de 48 h a été privilégié pour sa rapidité. Les conditions de réalisation de chaque test et les principaux paramètres mesurés sont présentés dans le tableau 1, ainsi que les méthodes standard utilisées (OCDE-202 2004; OCDE-218 2004; Environnement-Canada 1997, 1996; USEPA 2000).

Test de toxicité	Temps d'exposition	Milieu d'exposition	Nombre d'organismes et de réplicas	Principaux paramètres relevés	Méthodes Standard
Test de létalité ¹ <i>Daphnia magna</i>	48 h	Eau	5 organismes/ réplica ; 4 réplicas	Pourcentage de survie et d'immobilité des survivants	Env-Ca 1996 ; OCDE-202 2004
Test de létalité ¹ <i>Hyalella azteca</i>	96 h	Eau	10 organismes/ réplica ; 6 réplicas	Pourcentage de survie	Env-Ca 1997
Test de létalité et croissance ¹ <i>Hyalella azteca</i>	14 jours	Eau + sédiments	10 organismes/ réplica ; 6 réplicas	Pourcentage de survie, taux de croissance des survivants	OCDE-218 2004 ; Env-Ca 1997
Test de reproduction ² <i>Hyalella azteca</i>	42 jours	Eau + sédiments	10 organismes/ réplica ; 6 réplicas	Pourcentage de survie, taux de croissance des survivants, taux de reproduction,	USEPA 2000 ; OCDE- 218 2004

Tableau 4. Présentation des conditions de réalisation des tests de toxicité aiguë et chronique chez *Daphnia magna* et *Hyalella azteca*.¹ test de toxicité aiguë, ² test de toxicité chronique.

4.4 Effet indirect, étude des interactions

Concernant la réalisation du second objectif (article 2), nous avons étudié l'effet de la présence des SWCNT sur la toxicité du cadmium en effectuant d'une part des expériences d'adsorption en batch en mode statique, pour vérifier l'affinité du NM pour le contaminant, et d'autre part en réalisant des coexpositions de NTC et de Cd. La méthode d'adsorption en batch, qui est simple et rapide, consiste à mélanger les particules solides dans une solution contaminée au Cd en agitant à température constante pendant 24 h à 48 h. Ici, afin de mettre en relation ces résultats avec ceux des tests de létalité, les solutions ont été mélangées pendant 48 h. Une exposition à un contaminant seul a été réalisée pour pouvoir évaluer les effets toxiques observés. Les organismes ont été par la suite exposés à une concentration non toxique de SWCNT et à des concentrations croissantes de Cd, au niveau de la colonne d'eau chez *Daphnia magna*.

Pour la réalisation du dernier objectifs (article 3) nous avons étudié l'effet de la présence des SWCNT sur la toxicité du cadmium au niveau cellulaire et moléculaire à l'aide de biomarqueurs.

4.5 Choix des biomarqueurs

Pour la dernière partie de notre étude, nous avons choisi d'utiliser divers biomarqueurs afin d'étudier les mécanismes d'action toxique aux niveaux cellulaire et moléculaire des NTC chez une moule d'eau douce *E. complanata*. Comme nous l'avons précédemment précisé dans la partie 2.2, de nombreuses études ont mises en évidence l'induction de stress oxydant par les NTC. L'évaluation de ce paramètre peut être effectuée à plusieurs niveaux. Ainsi, il est possible de mesurer :

- l'activation des processus de protection cellulaire (enzymes antioxydantes) ;
- la réponse inflammatoire ou le coût énergétique pour la cellule du à l'action des ROS ;
- les conséquences du stress oxydant à travers les effets génotoxiques ou le taux d'apoptose.

Cette partie du projet étant une étude préliminaire, nous avons choisi de mesurer l'activité des GST (1er niveau), celle de la lactate deshydrogenase (LDH) (2e niveau) et enfin les effets génotoxiques (3e niveau) de façon à avoir une première idée du potentiel oxydant des SWCNT

étudiés et de ses conséquences. Par ailleurs, Toujours dans le but d'étudier les effets écotoxiques de SWCNT bruts et purifiés au niveau de la cellule, nous avons choisi de mesurer deux paramètres immunitaires : la phagocytose et la COX. En effet, chez les bivalves les mécanismes de défenses cellulaires ont un rôle majeur au niveau de la défense immunitaire. L'évaluation du status immunitaire des organismes pourra donc nous renseigner sur l'aptitude des organismes à lutter contre un agent pathogène.

CHAPITRE 2 : ARTICLES

ARTICLE 1 : SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES TOXICITY TO THE FRESHWATER AMPHIPOD *HYALELLA AZTECA* : INFLUENCE OF SEDIMENT AND EXPOSURE DURATION

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux

Publié dans *Journal of Xenobiotics*, 2015 ; 5:5086

Résumé français

Les nanomatériaux carbonés sont présents dans divers produits de consommation et de nombreuses applications industrielles devraient voire le jour d'ici plusieurs années. Cela implique une augmentation de leurs rejets dans l'environnement, y compris le milieu aquatique, exposant les organismes à ces contaminants. Le but de cette étude était d'étudier l'écotoxicité des nanotubes de carbone mono paroi (SWCNT) pour l'amphipode d'eau douce, *Hyalella azteca*. L'influence de la présence de sédiments et de la durée d'exposition sur la survie et/ou la croissance de cet organisme a été évaluée. De plus, l'effet des éventuelles impuretés libérées lors de la préparation de SWCNT sur les organismes a été évalué à l'aide d'une exposition à une solution filtrée de nanotubes de carbone. Nous avons mesuré une réduction de la survie à des concentrations allant de 10 à 40 mg/L, tandis qu'aucune mortalité n'a été observée avec les mêmes concentrations et en présence de sédiment artificiel. Cet effet peut être dû à une adsorption de SWCNT sur la matière organique du sédiment artificiel conduisant à une diminution de la biodisponibilité SWCNT. Les tests de survie ont révélé un effet毒ique plus fort à 28 jours par rapport aux 14 jours d'exposition, et la mortalité complète des organismes à 1000 mg/L pour les deux temps d'exposition. Une diminution de la croissance des organismes exposés aux SWCNT pendant 28 jours a également été mesurée. La présence des SWCNT dans le tube digestif des organismes a été observée, mais aucune expérience permettant de déterminer la pénétration des nanotubes de carbone dans les tissus n'a été menée. Cette étude démontre que la présence des sédiments doit être envisagée lorsque la toxicité des nanotubes de carbone dans l'eau est étudiée.

Mots clés : nanotubes de carbone, survie, amphipodes, sédiments, croissance

Contribution des auteurs

Messika Revel : mise en place et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Michel Fournier et Pierre Yves Robidoux : discussion des résultats et commentaires du manuscrit.

**Single-walled carbon nanotubes toxicity to the freshwater amphipod *Hyalella azteca*:
Influence of sediment and exposure duration**

Messika Revel,^{1,2} Michel Fournier,¹ Pierre Yves Robidoux,¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

² National Research Council Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Québec H4P 2R2, Canada.

Acknowledgements: we would like to thank Dr. Benoit Simard and Amy Hirdina from the National Research Council Canada - Ottawa for the production and characterization (TGA and Raman spectrometry) of dry SWCNT, Florence Perrin from the NRCC- Boucherville for scanning electron microscopy images, and Micheline Letarte from INRS-Institut Armand-Frappier for transmission electron microscopy. We sincerely thank Elijah Petersen (National Institute of Standards and Technology, United States), Geoffrey Sunahara and Heather McShane (McGill University, Canada) for their constructive comments on the manuscript.

Corresponding author: Messika Revel, Centre INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. Phone: 514 290 5008, fax: 450 686-5501, email: messika.revel@iaf.inrs.ca

Abstract

Carbon nanomaterials are present in various industrial applications and therefore their release into the environment including freshwater ecosystem is expected to increase. The aim of the present study was to investigate the influence of several parameters on the toxicity of single-walled carbon nanotubes (SWCNT) to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. The effect of period of exposure, sediment presence and possible impurities released during SWCNT preparation on survival and/or growth of such organism was evaluated. We measured a reduction of survival at concentrations ranging from 10 to 40 mg/L after 96-h exposure, while no mortality was observed with the same concentrations and in the presence of artificial sediment after 14 days of exposure. It is possible that SWCNT are adsorbed on the organic matter from the artificial sediment leading to a decrease of SWCNT bioavailability. The survival and growth toxicity tests revealed a stronger effect at 28 days compared to the 14 days of exposure, and full mortality of organisms at 1000 mg/L for both exposure times. The presence of SWCNT in the gut of survived organisms was observed. The present study demonstrates that the interaction with sediment should be considered when carbon nanotubes toxicity through water exposure is investigated.

Keywords: single-walled carbon nanotube, toxicity, sediment, survival, growth, freshwater

INTRODUCTION

Single-walled carbon nanotubes (SWCNT) are hollow graphene cylinders with size of 1,000 nm to $> 10^6$ nm in length and 1-2 nm in diameter. They have many applications because of their mechanical properties (toughness and strength), high electrical and thermal conductivity, and unique electronic and optical characteristics.¹ Nowadays, they are used in several types of products such as textiles, automobiles or sports equipment.² Carbon nanotubes are expected to be extensively used for water treatment and medical applications.^{3,4} Therefore, investments in research and development of carbon nanotubes by governments and industries are increasing all over the world. For instance, the National Nanotechnology Initiative from the U.S. Government research and development had a Federal Budget of more than \$1.7 billion for 2014.⁵ Consequently, the release of manufactured nanoparticles, including carbon nanomaterials, into the environment is likely to increase and concern over the potential impacts for the aquatic ecosystem is growing.

Toxicity of SWCNT has been studied with several model organisms such as algae, invertebrates, and fish.⁶⁻⁹ There have been few investigations conducted on benthic invertebrates and very limited toxicity data are available on amphipods.¹⁰ In recent studies, toxicity of carbon nanomaterials was examined in selective matrices with the organisms being exposed through water or sediment.^{11,12} Other routes of exposure for the crustacean *Daphnia magna*, such as dietary, have been studied elsewhere.^{13,14} Previous studies have shown that size, surface of functional groups and surface charge of carbon nanotubes could affect toxicity.¹⁵ Others have reported that as-produced SWCNT could be more toxic than functionalized carbon nanotubes,¹⁶ where toxicity is due to metal impurities rather than the nanotube itself.¹⁷⁻¹⁹ Therefore, it is recommended to measure impurities possibly released in the medium or to conduct a filtrate-only control experiment.²⁰ Nevertheless, the mechanism of SWCNT toxicity is not well understood. In addition, some studies did not detect any SWCNT toxicity on fish or benthic organisms.^{21,22}

The hydrophobic nature of SWCNT relates to their tendency to sink in water. But in the aquatic environment, natural coatings such as organic matter can increase the carbon nanotubes dissolution by covering their surface.¹⁴ Therefore, the use of organisms living at the interface of water and sediment is highly relevant to estimate their impacts on aquatic ecosystems. *Hyalella azteca* is a freshwater amphipod living on the surface of sediment and is frequently used for

toxicity studies because of its ubiquitous presence in the freshwater environment, contact with sediment, ecological importance and ease of culture in the laboratory.²³ A previous study demonstrated that purified or as-produced carbon nanomaterials could diminish the survival and growth of *H. azteca* when exposed through water only.¹⁷ It has been shown that carbon nanomaterials can be toxic for organisms when exposed through the water column whereas toxicity can be either reduced or is not detected when carbon nanomaterials are mixed with sediments.^{21, 24} Several studies have reported that carbon nanomaterials can reduce the bioavailability of organic contaminants to various terrestrial and aquatic organisms including benthic invertebrates.²⁴⁻²⁶ To the best of our knowledge, thus far no study describes the toxicity of SWCNT on *H. azteca* through water exposure and on artificial sediments.

The aim of this study was to investigate the influence of period of exposure, sediment presence and possible impurities released during SWCNT preparation on the toxicity of SWCNT to the freshwater amphipod *H. azteca*. The objectives were: 1) to compare the effects of acute and chronic exposure; 2) to investigate the toxic effect of impurities released by using a filtered solution of SWCNT and; 3) to evaluate the effect of the presence of sediment on toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Characterization and preparation of SWCNT

SWCNT were provided by Dr. Benoit Simard's (NRCC, Ottawa) research team. The chemical properties of dry SWCNT were measured using thermo-gravimetric analysis (TGA) and the ratio of the G-band (~1580 cm⁻¹) to the D-band (~1350 cm⁻¹) was established using Raman spectrometry (WiTec confocal microscope fiber coupled to an Acton 2500i spectrograph fitted with a Roper Scientific CCD array detector). The diameter of SWCNT was calculated from the RBM wave number (ω) using the following relation: $D \text{ nm} = 248/\omega$. Dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) was used to determine the particle size and electrophoretic mobility of SWCNT suspensions. The latter was calculated from the zeta potential values using the Henry equation with the Smolchenski approximation:

$$(1) \quad U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Where UE is the electrophoretic mobility, ϵ is the dielectric constant of the medium, z is the zeta potential, $f(ka)$ is Henry's function (1.5) and η is the viscosity.

Morphology and diameter were determined by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM, Hitachi 4700) operated at 2 kV and transmission electron microscopy (TEM, Hitachi H-7100).

Artificial freshwater medium (M4) was prepared with NaHCO_3 , 64.8 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 293.8 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 123.3 g/L and KCl , 5.8 g/L diluted in Milli-Q water (>18 mV). For each test, the appropriate quantity of SWCNT (10 - 1000 mg) was added to 1 L of the medium in a Pyrex glass beaker and dispersed by probe sonication for 15 minutes at 80 W (Ultrasonic processor, frequency 25 kHz, Misonix S4000).

Test organisms and artificial sediment

H. azteca were maintained in lab cultures with reconstituted M4 medium (pH, 7-8; hardness, 230-260 mg CaCO_3 mg/L).²⁷ Organisms were placed into an experimental chamber with programmed temperature and photoperiod ($23^\circ\text{C} \pm 3$, 16/8h Light/Dark). Organisms were fed twice a week with a mixture of yeast, tetramin and rabbit pellets (YCT) and algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (50 mL; 1.5×10^6 cells/ mL). All assays were conducted in a chamber under the same temperature and photoperiod regime using M4 as dilution medium. Constant aeration was applied.

Artificial sediment was prepared according to OECD protocol 218 by mixing 5% peat powder on a dry-mass basis, 75% quartz sand (50% of the particles in the range of 50–200 mm), 20% kaolinite clay, and 0.1% of CaCO_3 to adjust sediment pH.²⁸ Experiments were conducted in 300 mL polypropylene beakers containing 100 mL sediment and 160 mL of the test solution as overlying water.

Toxicity test and quality control

Before and during the study, CdCl_2 (Sigma-Aldrich) was used as a reference toxicant (positive control, concentration range 80-1280 $\mu\text{g}/\text{L}$) using the 96-h water-only assay to evaluate the quality of cultured organisms. Other test validation criteria were verified against guidelines criteria and laboratory in-house control data. At the beginning of each test, the following variables were measured in SWCNT solutions: temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity, water hardness, ammonia and nitrite concentration.

Effects of acute and chronic exposure

Here, we chose to use a very wide range of concentrations, which are not representative of what can be estimated in the environment, because we found an important variability in values of toxic concentrations in the literature.¹³⁻¹⁷ In addition, we wanted to identify mechanisms of toxicity at the species level and establish a dose-response relationship which could be used for hazard assessment.

To identify the influence of the period of exposure, we performed two standardised tests: the acute 14-d and the chronic 42-d toxicity tests, according to the guidelines of Environment Canada.²⁷ The tests were conducted using early life stage (7 to 14 days old) organisms exposed to overlying water-spiked SWCNT on artificial sediment. The nominal test concentrations assayed were 0, 10, 32, 100, 320, and 1000 mg/L (prepared as described above) and a minimum of 5 replicates were used. Because SWCNT solutions were added on the sediment and not mixed with it, no decrease in SWCNT concentration could occur. Seven days prior to the addition of organisms, aeration was applied to each test beaker to allow them to equilibrate before the beginning of the experiment. At the start of the test, SWCNT were agglomerated and a distinct layer (its thickness increased with SWCNT concentration) was visible on sediment. Organisms were randomly assigned to the test beakers until each beaker contained 10 organisms. Daily, 0.750 µL of food (YCT) was added to each test chamber.²⁷

The number of living organisms (identified by their ability to swim) was counted after 14 days (for the 14 days test) or 28, 35 and 42 days (for the 42 days test). According to test guidelines, survivors from 14 days and 28 days counts were kept and frozen (-20°C) until growth measurement was performed on each organism of each replicate. A sample of organisms taken at the beginning of each test was kept and frozen under the same conditions. As recommended by the guidelines, a test was considered invalid if the survival for the control treatment was <80%.²⁷

Effects of a filtered solution of SWCNT

Here, we indirectly tested the hypothesis that toxicity is caused by catalyst impurities added during the preparation of SWCNT.

Amphipods were exposed to a filtered solution of SWCNT initially at 0, 100, 320 and 1000 mg/L, according to the guidelines of Environment Canada.²⁷ The nominal test concentrations assayed were prepared by sonication of SWCNT (previously described) in artificial medium (M4) and

then filtered using a 0.22 µm filter (EMD, PES membrane) to remove carbon nanotubes. Reduction/ elimination of carbon nanotubes was verified by measuring the quantity of SWCNT in filtrate using their absorption at 800 nm with optical spectrophotometry measurements and TEM analysis. Three replicates containing 10 organisms from 2 to 9 days old were exposed to 100 mL (in polypropylene beakers of 150 mL) of the corresponding test solution with a piece of mesh fabric (cheesecloth) for substrate. On the third day animals were fed with 0.750 µL of YCT.

The number of living organisms was counted after 96-h of exposure and a test was considered invalid if the survival for the control treatment was < 90%.

Influence of sediment presence on toxicity

To test if the presence of sediment could influence SWCNT toxicity, two acute standardised tests were performed. A 96-h water only and a 14-d toxicity test were conducted using the following nominal test concentrations 0, 2, 5, 10, 20, and 40 mg/L. The assays were performed according to the guidelines of Environment Canada and were conducted as described above.²⁷

Observation of test organisms

To confirm the interaction between SWCNT and *H. azteca*, the presence of SWCNT in the entire gut of organisms from the two 14-d toxicity test was established during growth measurement. Amphipods with more than half of their gut filled with an intense black color (interpreted as SWCNT) were counted for each replicate. The percentage of organisms with carbon nanotubes inside them was calculated as a mean for each condition.

Data analysis

Growth rate was determined by measuring survivor's length which is a more sensitive parameter than weight measurement for *H. azteca*.²⁹ A binocular microscope (Zeiss Stemi 2000-C) associated with a camera (Powershot G6, Canon) was used to photograph organisms. The length of each amphipod was then measured using the ImageJ software. Growth data are expressed as percentage increase and average per replicate and concentration were established.

The lethal concentration (LC25, LC50) was calculated using probit analysis or Trimmed Spearman-Karber using the TOXCAL software (version 5).³⁰ Effective concentration (EC50) values were calculated using nonlinear regression techniques or linear interpolation when data were not amenable to nonlinear regression.

Statistical differences between treatments were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Remaining data were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons like Steel dwass. Calculations were performed with JMP 4 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of dry test product and prepared solutions

Characterization of dry SWCNT by TGA analysis confirmed that SWCNT were as-produced.³¹ Raman spectrometry analysis revealed the presence of aldehyde groups (CH) at the end of the nanotubes and inclusions other than pure carbon in the sample like amorphous carbon (data not shown). The SWCNT diameters were estimated at 1.53 nm.

The FEG-SEM images confirmed the presence of impurities on nanotubes (Figure 1.A, B) like amorphous carbon particles.³¹ The characterization of nanotube structural parameters by TEM analysis (Figure 1.C, D) revealed that SWCNT are long and without a defined inner channel.

For water-only tests, SWCNT formed large agglomerates with an average size ranging from 287 to 2063 nm, and an electrophoretic mobility with a minimum value of -1.4×10^{-9} m²/Vs and a maximum of -0.8×10^{-9} m²/Vs (mean = -1.1 ± 0.1 SD). Large agglomerates were also measured in water from sediment-toxicity tests with an average size ranging from 766 to 983 nm and an electrophoretic mobility ranging from -1.6 to -1.3×10^{-9} m²/Vs (mean = -1.5 ± 0.1 SD).

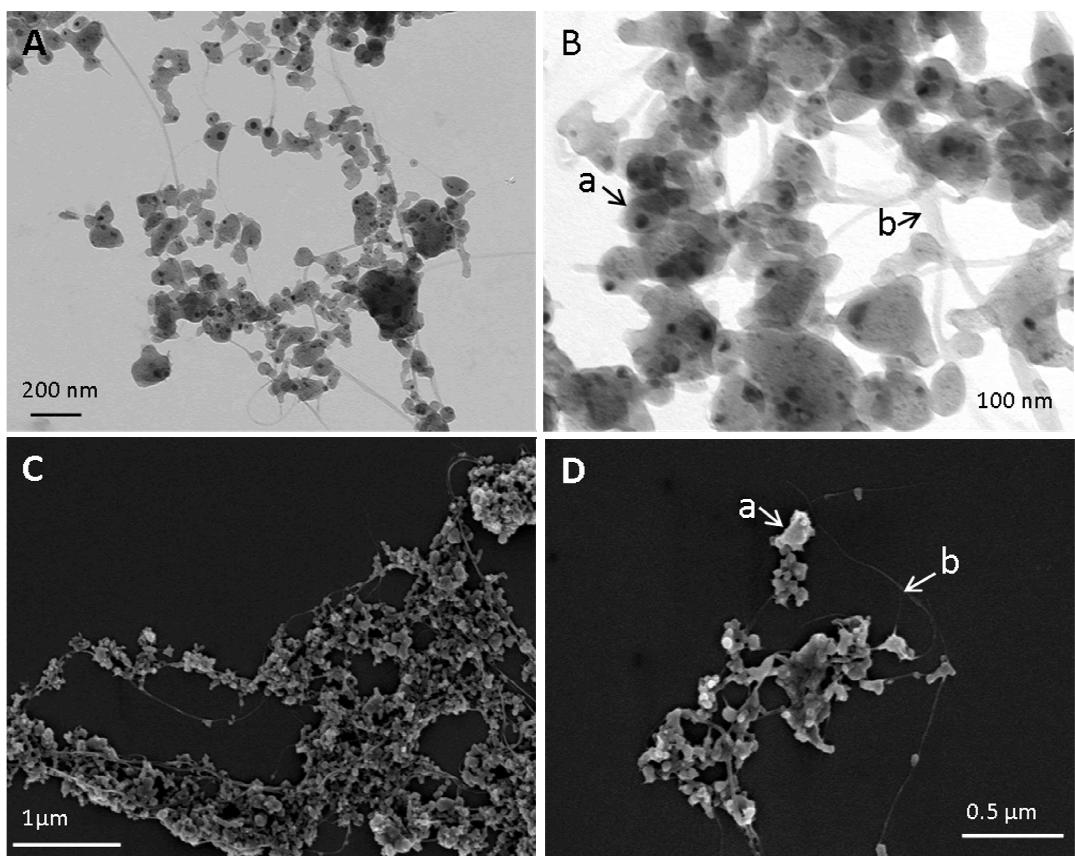


Figure 1. SWCNT solubilised in M4 medium observed with field emission gun scanning electron microscopy (A and B) and transmission electron microscopy (C and D). Both techniques allow visualisation of carbon nanotubes (a) and impurities (b) forming rounded aggregates.

Organisms are then expected to interact with agglomerated forms of carbon nanotubes. Indeed, agglomerates of SWCNT were visible in the amphipods gut (example shown in Figure 2). Whereas no SWCNT were visible in the organisms at 2 mg/L, agglomerates were observed for the following concentrations: 5, 10, 20, 32, 40, 100, 320 mg/L and the percentage of organisms having nanotubes in their gut increased along with the values of the concentrations tested (Figure 2.C). In a previous study, carbon nanotubes were observed in the gut of test organisms using transmission electron microscopy.¹⁷ It is likely that adverse effects of SWCNT observed on amphipods are caused by the blocking of the digestive track that could lead to a decrease in food intake (not tested in this study). Another investigation showed no dietary effect of carbon nanotubes in *Drosophila melanogaster*.³³ A study using *Ceriodaphnia dubia* demonstrated the difficulty of ridding large CNT agglomerates from the gut of organisms which eventually caused immobilization and increased mortality.¹⁶ The same study demonstrated that exposure of *H.*

azteca to high concentrations of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in the presence of sediment can cause lethality, with an LC₅₀ of 50 to 264 g/kg. Nevertheless, even if carbon nanotubes were visualized into organisms, nothing indicates that SWCNT actually penetrated the cells of amphipods. This possibility is unlikely considering that carbon nanotubes tended to form large agglomerates in our medium. Earlier studies reported that purified and as-produced SWCNT were not adsorbed into tissues of an oligochaete, a copepod, a polychaete, and daphnids.^{24, 34, 35} Similarly, TEM analysis of fullerene uptake by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* did not indicate absorption across the gut tract. Although we did not study SWCNT bioaccumulation in *H. azteca*, the ingestion of carbon nanomaterials suggests that it could eventually be transferred in the food chain through the ingestion of amphipods by other organisms, and potentially be toxic to organisms indirectly exposed. Bioaccumulation and biomagnification were previously confirmed with the fish *Danio rerio* exposed to MWCNT and the Ciliated Protozoan *Tetrahymena thermophila* exposed to cadmium Quantum Dot respectively.^{36, 37}

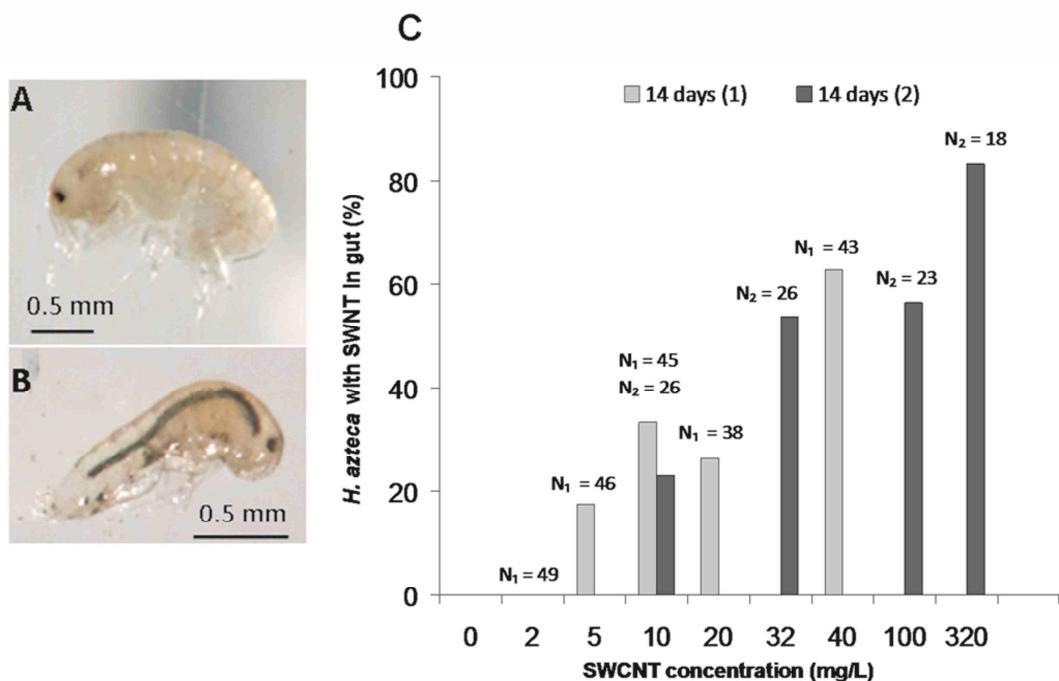


Figure 2. Accumulation of SWCNT in *H. azteca*. Organisms exposed to medium M4 (A) or SWCNT at 320 mg/L (B) and mean proportion (%) of amphipods with SWCNT in their gut after exposure to different concentrations of SWCNT in M4 for 14 days (C). "N" indicates the number of organisms used for the calculation: N₁ and N₂ correspond to the 14 days test (1) and (2) respectively (No statistical significance tested).

Toxicity of SWCNT: Influence of exposure time

The water quality parameters for the toxicity tests were all within the acceptable ranges: 21–24°C for temperature, 91-97% of dissolved oxygen, 7.3-7.8 for pH and 643-750 µS/cm for conductivity. Ammonia and nitrite concentrations remained very low and water hardness was estimated to be 240-290 mg/L.

The 14-d toxicity test showed high variability of effects between replicates, which is probably due to the high variability of the agglomerates size formed in the medium. No significant differences were measured between the control and other treatments for survival or growth within the concentration range and death of all organisms occurred at 1000 mg/L (Figure 3).

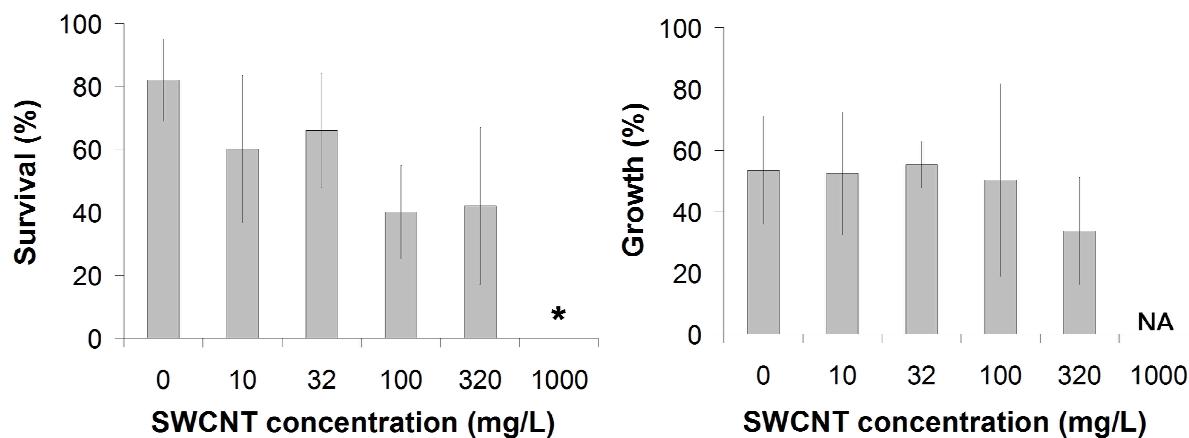


Figure 3. Mean survival and growth of *H. azteca* exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 14 days. Each column is the mean of 5 replicates \pm standard deviation and “*” indicates significant difference of group exposed compared to the negative control. NA= not applicable due to no survival.

The 42-d toxicity test showed a statistically significant decrease in survival at ≥ 320 mg/L after 28 days of exposure (Figure 4) and only a trend to decrease was observed after 35 and 42 days. This is probably due to the lower number of replicates (three) used for the two endpoints. For growth, a statistically significant decrease was measured at 320 mg/L after 28 days of exposure (Figure 4). The highest concentration induced death of all organisms. For survival and growth inhibition, LC50 and EC50 were both > 320 mg/L. We concluded that exposure

conditions affected the toxicity measurement endpoints and that a longer period of time can lead to a stronger effect on lethality and growth toxicity endpoints for *H. azteca*. The effects of carbon nanomaterials chronic exposure have already been reported by Alloy and Roberts (2011) who showed that MWCNT stabilized in natural organic matter decreased growth and reproduction of *D. magna*.³⁸ Similarly, a reduction of growth was observed for the midge *Chironomus riparius* larvae exposed to a fullerenes solution deposited on top of the sediment.³⁹

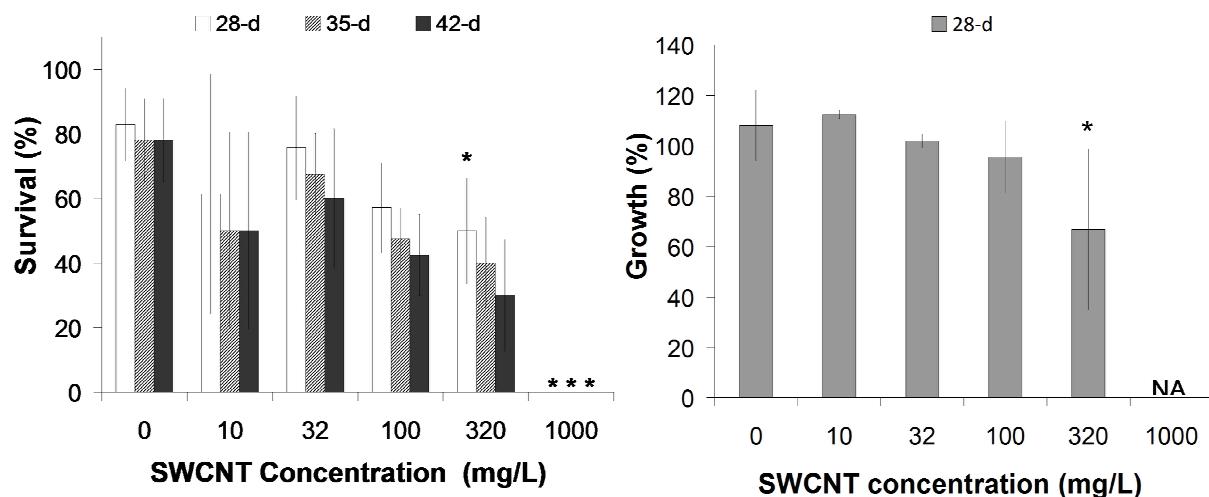


Figure 4. Mean survival and growth of *H. azteca* exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 42 days. Survival of organisms after 28, 35 and 42 days of exposure and growth rate measured after 28 days of exposure. Each column is the mean of 3 to 6 replicates \pm standard deviation and “**” indicates significant difference of group exposed compared to the control.

Toxicity of a filtered SWCNT solution

A 96-h water-only lethality test was carried out to study the effect of a filtered SWCNT solution through water only exposure. No significant differences between the control and other treatments were measured for survival with a mean of survival $> 80\%$ for all treatments (data not shown). Therefore, filtered SWCNT solutions were not toxic even though the sonication process was used for a sufficient period of time (15 minutes at 80W) to solubilise metal

impurities.⁴⁰ Unfortunately this could not be confirmed by direct measurements of metal concentrations in the test medium. Previously, metal impurities in carbon nanotubes were reported to have contributed to the hatching delay of zebrafish,¹⁸ and have stimulated oxidative stress.⁴¹ However, here, we attributed the toxicity to accumulation of SWCNT in the amphipod guts rather than to the dissolution of impurities. Carbon nanotubes could also induce nutrient depletion by adsorbing critical components of the exposure medium.²⁰

Toxicity of SWCNT: Influence of sediment

After conducting a series of 96-h water-only lethality test, significant differences between the control and treatments were measured at ≥ 5 mg/L (Figure 5). The LC25 was 18.87 ± 2.04 mg/L and LC50 > 40 mg/L, i.e. greater than the higher concentration tested.

However, using the 14-d toxicity test, in the presence of sediment, and the same concentrations, no significant differences between the control and all treatments were measured for survival or growth (Figure 5). Therefore, the toxic effect of SWCNT was altered based on presence of sediment. Earlier work has shown that a 10-d exposure of SWCNT in sediment at 30 mg/kg did not induce lethality to the lugworm *Arenicola marina*.²⁰ The lower toxicity of SWCNT could be explained by the presence of organic matter as previously demonstrated with multi-walled carbon nanotubes, stabilized in aqueous phase by natural organic matter.⁴² Even if the comparison is indirect because of different exposure durations used, differing exposure conditions (water against presence of sediment) demonstrated the potential effects of sediment presence on SWCNT bioavailability. It is important to emphasize that artificial sediment was used instead of natural sediment, in order to facilitate comparison of results among laboratories as well as with previous data. Artificial sediment has relatively high organic matter content (5% peat moss) and is consequently less representative of sediment in the natural environment. In addition, the impact of sediment on toxicity will also depend on the different concentration in fine particles in aquatic sediments. In the future, studies should be conducted using natural sediment from reference site (free of any contamination) with subsequent comparison of toxicity results for risk assessment purposes or to assess toxicity based criteria.

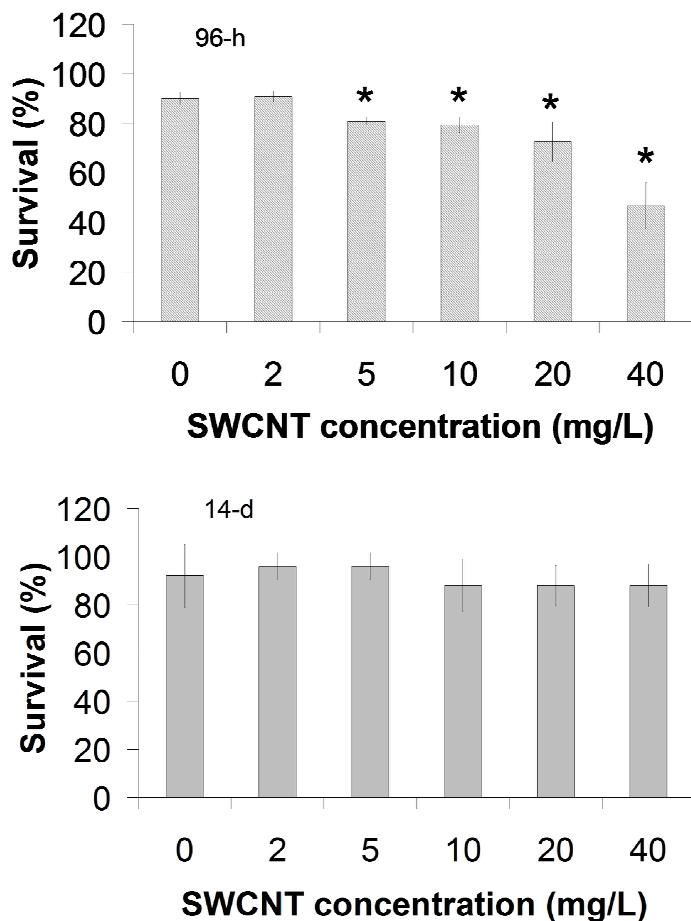


Figure 5. Mean survival of *H. azteca* exposed to different concentrations of SWCNT in M4 for 96h in water-only, where each column is the mean of 3 experiments (4 replicates per experiment) \pm standard error, and 14 days in the presence of sediment, where each block is the mean of 6 replicates \pm standard deviation. “*” indicates significant difference of group exposed compared to the negative control.

Although here the presence of sediment decreases the toxicity of SWCNT, it is important to consider the possibility of a long term accumulation in sediments which could serve as a source of SWCNT contamination but also resuspension of carbon nanomaterials in the water column. Re-introduction of SWCNT can occur through bioturbation or dredging, which has previously been reported for metals and organic contaminants.⁴³

CONCLUSION

Because estimating toxicity of SWCNT is a complex matter, the characterization of nanomaterials must be undertaken including details about the agglomeration state. This allows for a better forecast of the potential effects of manufactured nanomaterials. This study has shown that agglomerated forms of SWCNT can be directly toxic to the amphipod *H. azteca* by inducing lethality and growth inhibition. Our work further demonstrates that the presence of sediment mitigates SWCNT toxicity. Results also suggest that the toxicity of SWCNT may be due to digestive track blocking of organisms which may impede nutrient uptake. Overall, effects were measured at concentrations higher than those that can be presently estimated in the aquatic environment. Modelisation studies predicted carbon nanotube concentrations to be in the range of µg/g in sediments and ng/L in aquatic ecosystem, but because no reliable detection methods in complex environmental samples are yet validated no measured concentrations are available.^{44 45} Hence, under low exposure conditions, SWCNT do not appear to represent an important risk for the amphipod *H. azteca*. Nevertheless, the present data offer a useful background of information for hazard assessment, criteria development and lay the ground for future toxicity studies.

The toxic effects of SWCNT are usually observed at concentrations higher than estimated concentrations in water and sediment.^{13 15 21 34} But in order to determine the toxic potential of SWCNT, the possible interaction between carbon nanotubes and environmental compounds should be closely investigated. Indeed, because of SWCNT surface and adsorption properties, carbon nanotubes can interact with organic matter or contaminants which can influence their fate, behaviour and eventually their toxicity.¹⁴

References

1. Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Jorio A. Unusual properties and structure of carbon nanotubes. *Ann Rev Mater Res* 2004;34:247-78.
2. Wijnhoven SWP, Oomen IAG, Sips AJAM, Bourgeois FC, te Dorsthorst GJPM, Kooi MW, et al. Development of an inventory for consumer products containing nanomaterials: Final Report. ENV/D3/SER/2010/0060r 2011;European commission.
3. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003;55:329-47.
4. Liu X, Wang M, Zhang S, Pan B. Application potential of carbon nanotubes in water treatment: A review. *J Environ Sci* 2013;25:1263-80.
5. NNI. Nano.gov, National Nanotechnology Initiative website. 2013; United States of America, National Nanotechnology Initiative, [cited 15 of february 2015]. Available from: <http://www.nano.gov/about-nni/what/funding>.
6. Li M, Huang CP. The responses of *Ceriodaphnia dubia* toward multi-walled carbon nanotubes: Effect of physical-chemical treatment. *Carbon* 2011;49:1672-9.
7. Youn S, Wang R, Gao J, Hovsepian A, Ziegler KJ, Bonzongo JCJ, et al. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Nanotoxicology* 2012;6:161-72.
8. Boyle D, Fox JE, Akerman JM, Sloman KA, Henry TB, Handy RD. Minimal effects of waterborne exposure to single-walled carbon nanotubes on behaviour and physiology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 2014;146:154-64.
9. Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT, O'Carroll DM, Whelton AJ, Uddin N, et al. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* 2011;45:9837-56.
10. Templeton RC, Ferguson PL, Washburn KM, Scrivens WA, Chandler GT. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ Sci Technol* 2006;40:7387-93.
11. Blaise C, Gagné F, Férand JF, Eullaffroy P. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ Toxicol* 2008;23:591-8.

12. Velzeboer I, Kupryianchyk D, Peeters ETHM, Koelmans AA. Community effects of carbon nanotubes in aquatic sediments. *Environ Int* 2011;37:1126-30.
13. Petersen EJ, Akkanen J, Kukkonen JVK, Weber WJ. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 2009;43:2969-75.
14. Edgington AJ, Roberts AP, Taylor LM, Alloy MM, Reppert J, Rao AM, et al. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:2511-8.
15. Jackson P, Jacobsen NR, Baun A, Birkedal R, Kühnel D, Jensen KA, et al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem Cent J* 2013;7:154.
16. Kennedy AJ, Hull MS, Steevens JA, Dontsova KM, Chappell MA, Gunter JC, et al. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* 2008;27:1932-41.
17. Mwangi JN, Wang N, Ingersoll CG, Hardesty DK, Brunson EL, Li H, et al. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:1823-30.
18. Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:708-16.
19. Petersen EJ, Henry TB. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: Review. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:60-72.
20. Petersen EJ, Henry TB, Zhao J, MacCuspie RI, Kirschling TL, Dobrovolskaia MA, et al. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ Sci Technol* 2014;48:4226-46.
21. Parks AN, Portis LM, Schierz PA, Washburn KM, Perron MM, Burgess RM, et al. Bioaccumulation and toxicity of single-walled carbon nanotubes to benthic organisms at the base of the marine food chain. *Environ Toxicol Chem* 2013;32:1270-7.
22. Fraser TWK, Reinardy HC, Shaw BJ, Henry TB, Handy RD. Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C₆₀) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Nanotoxicology* 2011;5:98-108.
23. Borgmann U, Munawar M. A new standardized sediment bioassay protocol using the amphipod *Hyalella azteca* (Saussure). *Hydrobiol* 1989;188-189:425-31.

24. Ferguson PL, Chandler GT, Templeton RC, Demarco A, Scrivens WA, Englehart BA. Influence of sediment - amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. Environ Sci Technol 2008;42:3879-85.
25. Dewitt TH, Jones JKP, Ozretich RJ, Swartz RC, Lamberson JO, Schults DW, et al. The influence of organic matter quality on the toxicity and partitioning of sediment-associated fluoranthene. Environ Toxicol Chem 1992;11:197-208.
26. Parks AN, Chandler GT, Portis LM, Sullivan JC, Perron MM, Cantwell MG, et al. Effects of single-walled carbon nanotubes on the bioavailability of PCBs in field-contaminated sediments. Nanotoxicology 2014;8:111-7.
27. Environment-Canada. Biological test method: Test for survival and growth in sediment and water using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*, Report EPS 1/RM/33. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada 1997.
28. OCDE. Test No. 218: Sediment-water chironomid toxicity using spiked sediment. OECD Publishing, Paris, France; 2004.
29. Steevens JA, Benson WH. *Hyalella azteca* 10-day sediment toxicity test: Comparison of growth measurement endpoints. Environ Toxic Water 1998;13:243-8.
30. Wiegand H. Finney, D. J.: Probit analysis. 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge 1971. XV, 333 S., 41 Rechenbeispiele, 20 Diagr., 8 Tab., 231 Lit., L 5.80. Biometrische Zeitschrift 1972;14:72.
31. Kim KS, Cota-Sanchez G, Kingston CT, Imris M, Simard B, Soucy G. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by induction thermal plasma. J Phys D: Appl Phys 2007;40:2375-87.
32. Dillon AC, Parilla PA, Alleman JL, Gennett T, Jones KM, Heben MJ. Systematic inclusion of defects in pure carbon single-wall nanotubes and their effect on the Raman D-band. Chem Phys Lett 2005;401:522-8.
33. Leeuw TK, Reith RM, Simonette RA, Harden ME, Cherukuri P, Tsypbolski DA, et al. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: Near-IR imaging and biocompatibility studies in Drosophila. Nano Letters 2007;7:2650-4.
34. Petersen EJ, Huang Q, Weber Jr WJ. Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. Environ Health Pers 2008;116:496-500.

35. Edgington AJ, Petersen EJ, Herzing AA, Podila R, Rao A, Klaine SJ. Microscopic investigation of single-wall carbon nanotube uptake by *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 2014;8:2-10.
36. Maes HM, Stibany F, Giefers S, Daniels B, Deutschmann B, Baumgartner W, et al. Accumulation and distribution of multiwalled carbon nanotubes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 2014;48:12256-64.
37. Werlin R, Priester JH, Mielke RE, KramerS, JacksonS, Stoimenov PK, et al. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nat Nano* 2011;6:65-71.
38. Alloy MM, Roberts AP. Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011;74:1839-43.
39. Waissi-Leinonen GC, Petersen EJ, Pakarinen K, Akkanen J, Leppänen MT, Kukkonen JVK. Toxicity of fullerene (C₆₀) to sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius* larvae. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:2108-16.
40. Toh RJ, Ambrosi A, Pumera M. Bioavailability of metallic impurities in carbon nanotubes is greatly enhanced by ultrasonication. *Chem-Eur J* 2012;18:11593-6.
41. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 2010;4:347-63.
42. Petersen EJ, Pinto RA, Mai DJ, Landrum PF, Weber Jr WJ. Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 2011;45:1133-8.
43. Eggleton J, Thomas KV. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 2004;30:973-80.
44. Gottschalk F, Sun T, Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ Poll* 2013;181:287-300.
45. Mueller NC, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol* 2008;42:4447-53.

ARTICLE 2 : CADMIUM TOXICITY IN THE PRESENCE OF SINGLE WALLED CARBON NANOTUBE TO THE CRUSTACEAN DAPHNIA MAGNA

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux

Publié dans

Résumé français

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) sur la toxicité du cadmium en utilisant la daphnie *D. magna* comme organisme modèle. Les CL50 du Cd et des SWCNT seuls et combinés ont été calculés et comparés. La sorption du Cd sur les SWCNT a également été quantifiée par la réalisation d'expériences en batch. Les résultats ont montré que l'adsorption maximale de Cd sur les SWCNT, calculée par l'équation de Langmuir, était de 24,4 mg de Cd/kg. Les CL50 du Cd et des SWCNT calculées sont respectivement de 252,3 µg/L et 1400 µg/L. Une augmentation de la toxicité du Cd en présence des SWCNT a été observée avec une CL50 établie à 127,2 µg/L en présence de 500 µg/L et 120,1 µg/L avec 1000 µg/L de SWCNT. Ainsi, la toxicité du Cd est augmentée pour la daphnie *D. magna* d'un facteur 2, dans le cas d'une co-exposition aux SWCNT. Il semble que la faible capacité d'adsorption du Cd par les SWCNT permette l'absorption des espèces de Cd libres ainsi que le Cd adsorbé par les SWCNT dans les organismes. Notre étude montre la complexité de la toxicité des SWCNT et l'importance de considérer les effets d'interactions avec d'autres contaminants pour déterminer les conséquences de leur rejet dans l'environnement.

Mots clés : survie, SWCNT, cadmium, daphnie

Contribution des auteurs

Messika Revel : mise en place et réalisation des expériences, analyses chimiques réalisées avec Patrice Turcotte (Environnement Canada), analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Michel Fournier et Pierre Yves Robidoux : discussion des résultats et commentaires du manuscrit.

**Toxic effect of single walled carbon nanotubes combined with cadmium to the
crustacean *Daphnia magna***

Messika Revel^{1, 2, a*}, Michel Fournier^{2, b} Christian Gagnon^{3, c} and Pierre Yves Robidoux^{2, d}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 538 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

²National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada

³Environment Canada, 105 rue McGill, Montréal, Québec H2Y 2E7, Canada

^amessika.revel@iaf.inrs.ca, ^bmichel.fournier@iaf.inrs.ca, ^cchristian.gagnon@ec.gc.ca,
^dpierre.yves.robidoux@hotmail.com

*Corresponding author: Messika Revel, INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 538 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. Phone: 514 290 5008, fax: 450 686-5501, email: messika.revel@iaf.inrs.ca

Abstract

The aim of this study was to assess the impact of single-walled carbon nanotubes (SWCNT) on the toxicity of cadmium (Cd) using the crustacean *Daphnia magna*. LC50 of Cd and SWCNT alone and combined were calculated and compared. Sorption of Cd on SWCNT was also quantified in separate batch experiments. Results showed that the maximum adsorption of Cd onto SWCNT calculated by the Langmuir equation was 24.4 mg kg⁻¹. LC50s for Cd and SWCNT alone were 252.3 µg L⁻¹ and 1400 µg L⁻¹, respectively. In the presence of 500 and 1000 µg L⁻¹ of SWCNT, Cd LC50s were 127.2 and 120.1 µg L⁻¹ respectively. Therefore, Cd toxicity increased when organisms were exposed to both contaminants which indicated that SWCNT induces a synergistic toxic effect on the survival of *D. magna*. It appears that even if SWCNT had a low adsorption capacity for Cd, toxicity of the metal can be increased. Our study shows the complexity of SWCNT toxicity and how the understanding of their interactions with other contaminants is crucial to determine the consequences of their release into the environment.

Keywords: SWCNT, synergistic toxicity, cadmium, survival

1. Introduction

Carbon based nanomaterials are used in a number of products such as sports equipment, textiles or automobiles (Wijnhoven et al. 2011). Among these nanomaterials, single-walled carbon nanotubes (SWCNT) offer many benefits such as toughness, strength and high conductivity making them of interest for many applications in material science (Dresselhaus et al. 2004). Carbon nanotubes are also widely applied for environmental monitoring and wastewater treatment due to their large surface area (Tan et al. 2012). If the large surface area of SWCNT enhance their ability to adsorb hydrocarbons or metals present in water or soil and hence be of use for decontamination purpose (Baun et al. 2008, Qu et al. 2014), it can also modify the mobility/availability of these contaminants to organisms. The interactions of SWCNT with other contaminants needs to be closely addressed in order to fully understand the environmental impact of these nanomaterials upon release in the environment (Moore 2006).

The toxicity carbon nanotubes has been previously studied on algae (Youn et al. 2012), copepods (Templeton et al. 2006), fish (Cheng et al. 2007, Martinez et al. 2013) and the crustacean *Daphnia magna* (Petersen et al. 2009, Alloy and Roberts 2011, Li and Huang 2011). The effects measured have been mainly attributed to the action of the carbon nanotube itself, either by blocking the digestive tract and by “sticking” to the body’s surface of organisms (Kennedy et al. 2008, Mwangi et al. 2012), or by releasing impurities - most commonly iron, cobalt and nickel – embedded in the nanoparticles. A large number of studies reported the ability of carbon nanotubes to adsorb heavy metal ions but few investigated the effect of this property on the organisms potentially exposed (Li et al. 2004, Li et al. 2005, Lu et al. 2006). A previous study described a potentiating toxicological effect of SWCNT, suspended with organic matter in seawater, co-exposed with divalent metals at very low concentration ($\mu\text{g/L}$ range) on DNA integrity of the mussel *Mytilus edulis* (Al-Shaeri et al. 2013). In other studies, lead toxicity to a freshwater fish increased in the presence of purified MWCNT (Martinez et al. 2013) while, in contrast, SWCNT in sediments significantly reduced bioaccumulation of hydrophobic carbon to the deposit/suspension-feeding of a polychaete (Ferguson et al. 2008). Despite these data, very little is known regarding the impact of carbon nanotube on the toxicity of metals to aquatic organisms.

Cadmium (Cd) is a heavy metal very toxic to health and environment at both acute and chronic exposure (Attar and Maly 1982, Bodar et al. 1988, Giusto et al. 2012, Souid et al. 2013). It is one of the most common pollutants found in both industrial and urban effluents due to its presence in batteries, pigments paint, pulp and paper production and wastewater treatment plants (Hare 1992,

USGS 2013). Cd is relatively soluble in water and therefore is potentially bioavailable and tends to bioaccumulate in aquatic organisms (Wang and Rainbow 2006, Vellinger et al. 2012). Many studies have shown negative effects, such as decrease in survival (Qu et al. 2013) or growth (Giusto et al. 2012), and oxidative stress on several organisms including *D. magna* (Wen-Hong et al. 2009, Souid et al. 2013). The use of *D. magna* as a standard test organism is recommended by many international organizations to test the toxicity of chemicals, effluents, and contaminated water (OECD, Biesinger et al. 2002, Lazorchak et al. 2009).

It is well known that in natural waters, organisms are exposed to a variety of contaminants. In this study, our goal is to identify the potential impact of SWCNT on the toxicity of Cd to the crustacean *D. magna*. For this purpose, we chose to conduct 48-h lethality tests with Cd and SWCNT alone or in combination. A study of the adsorption capacity of SWCNT for Cd was also conducted to evaluate physical interactions between the two toxicants.

2. Materials and Methods

Preparation and characterization of SWCNT

SWCNT provided by Dr. Benoit Simard's research team (NRC Canada) were synthesized using a plasma system modified from a previous method (Kim et al. 2007). The chemical properties of dry SWCNT were measured using thermo-gravimetric analysis (TGA) and Raman spectrometry (WiTec confocal microscope fiber coupled to an Acton 2500i spectrograph fitted with a Roper Scientific CCD array detector). The diameter of SWCNT (D) was calculated from the characteristic radial breathing (RBM) wave number (ω) using the following relation: $D(\text{nm}) = 248/\omega$. Dynamic light scattering technique (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) was used to determine the particle size and electrophoretic mobility of SWCNT suspensions. The latter was calculated from the zeta potential values using the Henry equation (Eq. (1)) with the Smolchenski approximation:

$$(1) \quad U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Where U_E is the electrophoretic mobility ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$), ϵ is the dielectric constant of the medium, z is the zeta potential (mV), f

(ka) is Henry's function and correspond to the ratio of particle radius to double layer thickness (1.5) and η is the viscosity ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Morphology was determined by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM, Hitachi 4700) operated at 2 kV and transmission electron microscopy (TEM, Hitachi H-7100).

Artificial freshwater called ASTM medium, consisting of NaHCO_3 (192 mg L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (120 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (120 mg L^{-1}) and KCl (8 mg L^{-1}) was prepared with Milli-Q water ($>18 \text{ mV}$) according to ASTM E729-96 (ASTM 2014) and does not contain any Cd. SWCNT stock solution (0.1 g L^{-1}) was prepared by transferring 100 mg of SWCNT in 1 L of the ASTM medium in a Pyrex glass beaker and dispersing using probe sonication for 10 min at 80 W (Ultrasonic processor, frequency 25 kHz, Misonix S4000).

Culture of *D. magna*

D. magna were cultured according to Environment Canada procedures, in reconstituted M4 medium: NaHCO_3 (64.8 g L^{-1}); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (293.8 g L^{-1}); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (123.3 g L^{-1}) and KCl (5.8 g L^{-1}); pH 7-8; hardness 230-260 mg CaCO_3 L-1 (Environment-Canada 1990). Organisms were placed into an experimental chamber with programmed temperature and photoperiods ($20^\circ\text{C} \pm 2$, 16/8 h Light/Dark). Animals were fed daily with algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (30 mL ; $1.8 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) and once a week with beef extract. The medium was renewed every week.

Adsorption of Cd on SWCNT

The interaction of Cd with SWCNT was measured by performing traditional adsorption batch experiment and measuring remaining Cd concentration in the aqueous phase by ICP-MS. Various volumes of SWCNT stock solution (0.1 g L^{-1} , prepared in ASTM medium) were mixed with various volumes of Cd stock solution (CdCl_2 ; 25 to $450 \mu\text{g Cd L}^{-1}$) and water. Cd adsorption at a specific concentration of SWCNT (1 mg L^{-1}) was investigated at various metal concentrations (25, 50, 100, 200, and $450 \mu\text{g Cd L}^{-1}$). The pH of the suspensions was measured and found to be between 8 and 8.5. Cd-SWCNT suspensions were prepared in duplicate and shaken for 48 h to achieve the adsorption at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. In addition, a control with cadmium alone ($415 \mu\text{g L}^{-1}$) was used to examine the potential occurrence of Cd precipitation under the current conditions. Small sample aliquots were withdrawn at 24 h and 48 h for further analysis by ICP-MS. The amount of Cd on SWCNT was calculated by Eq. (2) (Moradi et al. 2011):

$$(2) \quad q_e = (C_0 - C_e)V/w$$

Where C_0 (mg L⁻¹) is the initial Cd concentration, C_e (mg L⁻¹) is the final Cd concentration at equilibrium (mg g⁻¹), V (L) and w (g)

Toxicity tests

Exposure to Cd or SWCNT

Before and during the study, $K_2Cr_2O_7$ (Sigma-Aldrich) was used as a reference toxicant (positive control) to evaluate the health of cultured organisms (concentration range 0.175 - 2.8 mg L⁻¹). Other test validation criteria (e.g. response in the negative control, temperature) were verified against guidelines criteria and laboratory in-house control data.

Stock solutions of Cd ($CdCl_2$, 1 g L⁻¹) and SWCNT (0.1 g L⁻¹) were prepared directly in the ASTM culture medium. Organisms were exposed according to standardised tests (Environment-Canada 1990). Five test concentrations and one control group were used, each with four replicates. Each replicate consisted of five *D. magna* neonates (< 24 h) in a 150 mL glass beaker containing 100 mL test solution. $CdCl_2$ and SWCNT concentrations used were respectively between 25 - 525 $\mu\text{g L}^{-1}$ (measured concentrations of Cd) and 0.5 - 10 mg L⁻¹ (nominal concentrations of SWCNT). The glass beakers were covered with a glass lid and beakers were incubated for 48 h at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16/8 h Light/Dark condition. All assays were conducted in a chamber under the same temperature and photoperiod regime using ASTM medium. After 48 h of exposure, immobile organisms were placed under a binocular microscope for heart beat observation and the percentage of surviving organisms was calculated for each condition. The residual suspensions of test solutions were used for the measurement of Cd concentration.

To test if the toxicity observed could be related to impurities released from SWCNT, *D. magna* were exposed to filtered solutions of SWCNT. The nominal test concentrations assayed were prepared by sonication of SWCNT in ASTM and then filtered using a 0.22 μm filter (EMD, PES membrane) to remove carbon nanotubes. Reduction/ elimination of carbon nanotubes was verified by measuring their absorption at 800 nm using spectrophotometry and TEM analysis.

Toxicity test of Cd and SWCNT combined

The potential impact of SWCNT on Cd toxicity was investigated under the same conditions as the Cd toxicity evaluation described above. Briefly, two series of different concentrations of Cd (25 to 525 µg L⁻¹) were prepared as described previously. Then, each series received a non toxic concentration of SWCNT (500 or 1000 µg L⁻¹). The suspensions were mixed prior to the addition of Daphnia neonates.

Chemical analysis

Cd concentrations were measured at the end of each lethality test and sorption experiment. Briefly, the solutions were transferred into polypropylene tubes with 5 % nitric acid. Samples with SWCNT and/or Cd were filtered with a 0.22 µm filter (EMD, PES) to remove carbon nanotubes. Reduction/ elimination of carbon nanotubes was verified by measuring the quantity of SWCNT in filtrate using their absorption at 800 nm with optical spectrophotometry measurements and TEM analysis. After dilution, residual Cd concentrations were measured using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, X series 2, Thermo scientific).

During analysis, blanks and two certified reference materials (ERA from water company Water Co. and SLRS-5: River water reference material for trace metals from National research Canada) were also analyzed to verify contamination and analytical accuracy. 95% recovery values were obtained.

Statistical analysis

The lethal concentration (LC50) was calculated using probit analysis or Trimmed Spearman-Kaber with the TOXCAL program (1996, software package version 5).

Statistical differences between treatments were assessed by Shapiro-Wilk test; the Bartlett test and the Levene test to assess normality and homoscedasticity, respectively. Data that fulfilled the normality and homoscedasticity assumptions were analyzed through one-way ANOVA followed by Tukey's test. Remaining data were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons like Steel Dwass. Analysis was performed with JMP IN 4 software.

3. Results and discussion

Characterization of SWCNT

Characterization of dry SWCNT by TGA analysis confirmed raw nature of the sample with 60% of unpurified SWCNT oxidized, 20% of highly pure and defect-free SWCNT and residual mass of 20 % corresponding to the fully oxidized catalysts metals, as previously reported (Dillon et al. 2005, Kim et al. 2007). Raman spectrum analysis revealed the presence of aldehyde groups (CHO) at the end of nanotubes and inclusions other than pure carbon in the sample like amorphous carbon (data not shown). The SWCNT diameter was estimated at 1.53 nm based on RBM method. The FEG-SEM and TEM analysis revealed the presence of impurities on nanotubes (Figure 1).

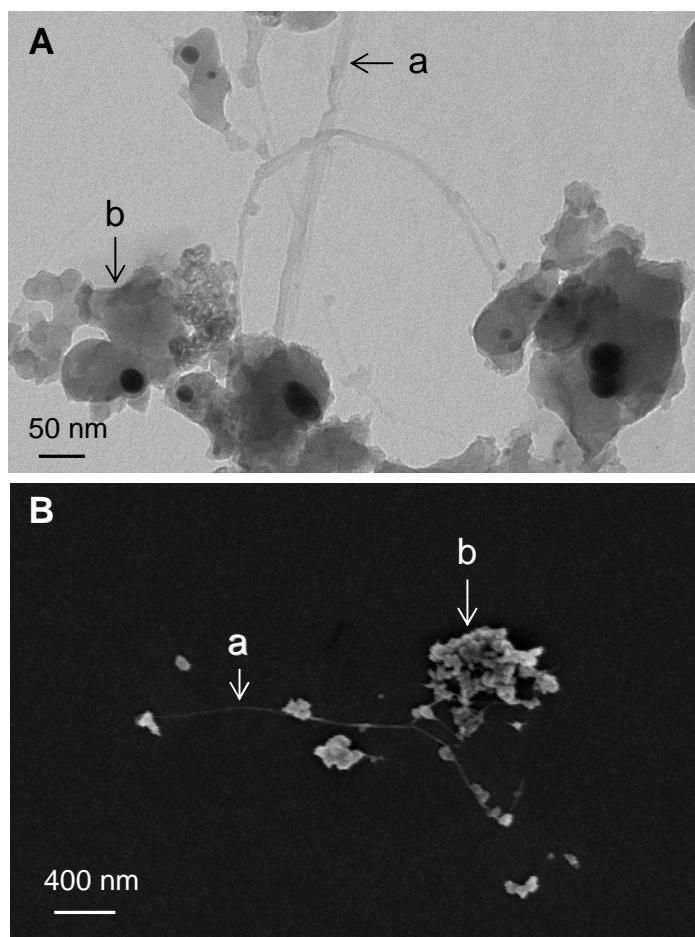


Figure 1. SWCNT observed with (A) field emission gun scanning electron microscopy and (B) transmission electron microscopy. Both techniques allow visualisation of (a) carbon nanotubes and (b) impurities forming rounded aggregates.

In solution, SWCNT formed large agglomerates with an average hydrodynamic size (by DLS technique) ranging from 582.6 to 1614 nm, and an electrophoretic mobility with a minimum value of $-1.6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a maximum of $-1.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (mean = $-1.1 \pm 0.1 \text{ SD}$).

Adsorption characteristics of Cd on SWCNT

Adsorption experiments were carried out by mixing known amounts of carbon nanotubes with Cd solutions at different concentrations after an equilibrium period of 48h. The interaction between SWCNT and Cd was evaluated by measuring the sorption equilibrium concentration (Figure 2) after 48 h.

The Langmuir isotherm was used to fit the experimental data with Eq. (3) (Jaroniec 1983):

(3)

$$q_e = \frac{K_a q_m C_e}{1 + K_a C_e}$$

Where C_e (mg L⁻¹) is the equilibrium Cd concentration (mg kg⁻¹), q_m (mg kg⁻¹) is the maximum adsorption capacity which considers a complete monolayer coverage and K_a (L mg⁻¹) is the Langmuir constant indirectly related to the energy of adsorption.

The reasonable fit of the Langmuir isotherm model was confirmed by the correlation coefficient tested ($r^2 = 0.88$) which is close to 1. The q_m value calculated by the Langmuir equation is 24.4 mg kg⁻¹ which indicate a low adsorption capacity of Cd. Therefore, the toxic effect of a Cd-SWCNT combination should be similar to effect of Cd alone because in our condition, SWCNT does not seem to concentrate Cd from water. The Langmuir equation has been widely used in metal adsorption studies. This model assumes a monolayer coverage of adsorbate over a homogeneous adsorbent surface with an equal adsorption activation energy for each molecule adsorbed onto the surface.

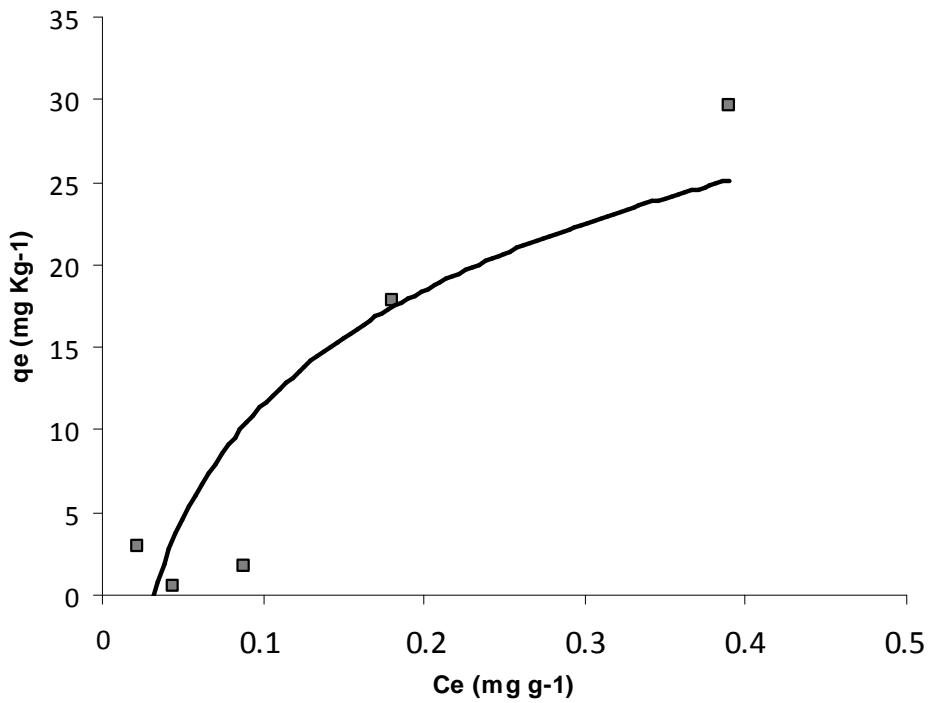


Figure 2. Adsorption isotherm for Cd ions at a concentration of 1 mg/L SWCNT.

Previously, SWCNT were reported to have various adsorption capacities towards metals. For Cd, adsorption capacities of 18.58 and 52.35 mg Cd g⁻¹ of as-produced or carboxylate group functionalized SWCNT were calculated respectively (Moradi et al. 2011). It appears that the variability of Cd adsorption capacity on SWCNT is related to the different production and purification methods (Li et al. 2004, Li et al. 2005). In particular, the presence of carboxylate groups on the surface of SWCNT enables a more effective metal adsorption.

Toxicity of Cd or SWCNT

The water quality parameters for the toxicity tests were all within the acceptable ranges: 19.5–21°C for temperature, 95-100 % for dissolved oxygen, 8.0 – 8.1 for pH and 643-750 µS/cm for conductivity. Ammonia and nitrite concentration remained very low and water hardness was measured to be between 240 and 290 mg L⁻¹. All toxicity tests performed were valid according to the criteria mentioned in the respective guidelines, i.e. for reproducible tests mortality is inferior to 10%.

Figure 3.A presents the results of three tests where *D. magna* neonates were exposed to Cd alone. Reproducible dose-response curves were obtained and the LC₅₀ determined was 252.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Previous studies have reported the toxicity of Cd to *D. magna* under different medium and culturing conditions than those mentioned in the current publication (Bodar et al. 1988, Ferreira et al. 2008, Qu et al. 2013). These studies showed a decrease in survival of *D. magna* at concentrations up to 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ in good agreement with the values measured herein.

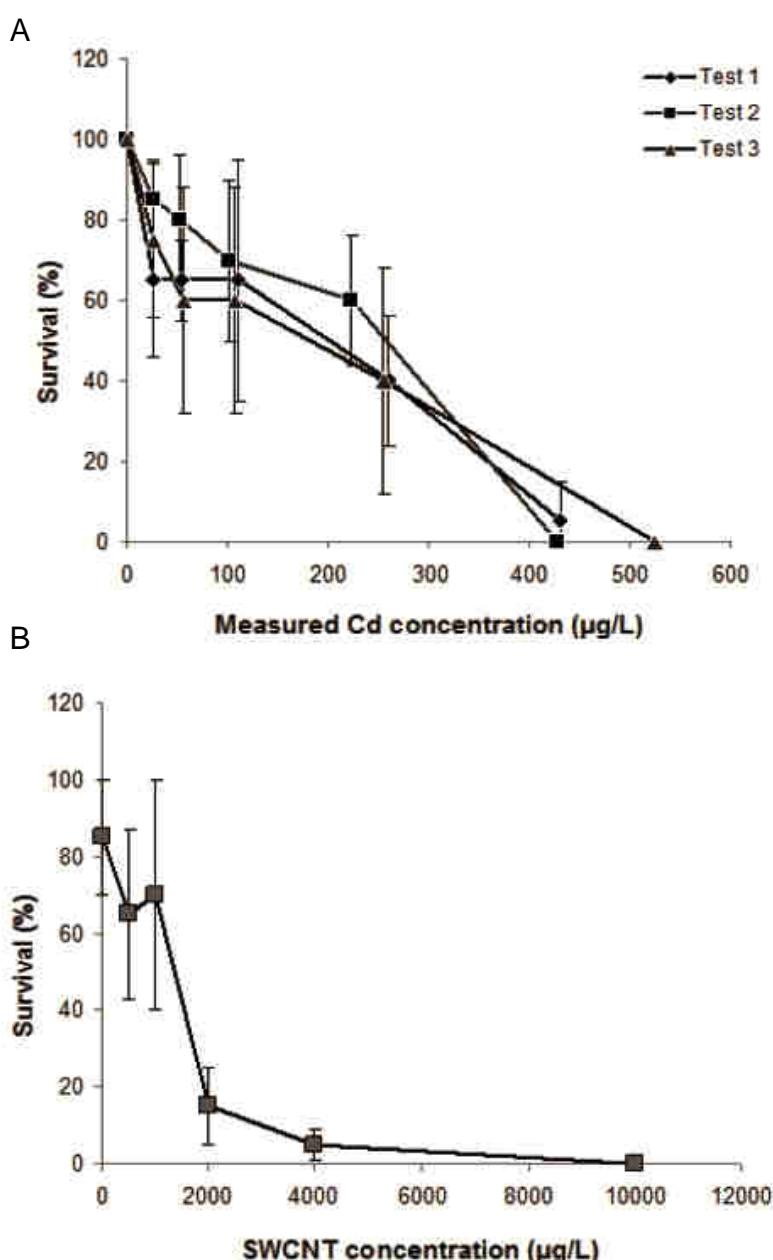


Figure 3. Mean survival of *D. magna* exposed to Cd (A) and SWCNT (B) to after 48 h of exposure (mean of 3 replicates \pm standard deviation).

Figure 3.B presents the survival of *D. magna* neonates after exposure to SWCNT alone. The LC50 determined was $1400 \mu\text{g L}^{-1}$. In recent years, the development of new applications for carbon nanotubes has been increasing. Several studies have investigated the toxicity of SWCNT towards aquatic invertebrates (review Jackson et al. 2013). Earlier work has shown that a 48 h exposure of carbon nanotubes at $400 \mu\text{g L}^{-1}$ could induce lethality in *D. magna* (Petersen et al. 2009). In addition, a previous study has shown that food particle size of *D. magna* appears to be between 100 and 5000 nm (Geller and Müller 1981). Because it is in the range of agglomerates size of SWCNT measured in our study, carbon nanotubes are likely to accumulate in the digestive tract of organisms and decrease food intake (Petersen et al. 2009, Petersen et al. 2011). This hypothesis has been confirmed by our observations of survivors that showed the presence of SWCNT in the digestive tract of daphnids exposed to 500 and $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, while SWCNT were also observed on the body surface of daphnids exposed to $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figure 4). A feeding rate test could complement this hypothesis. Earlier work has shown the presence of carbon nanotubes in the gastrointestinal track of *D. magna* using light, binocular and transmission electron microscopy (Baun et al. 2008, Petersen et al. 2009, Mwangi et al. 2012).

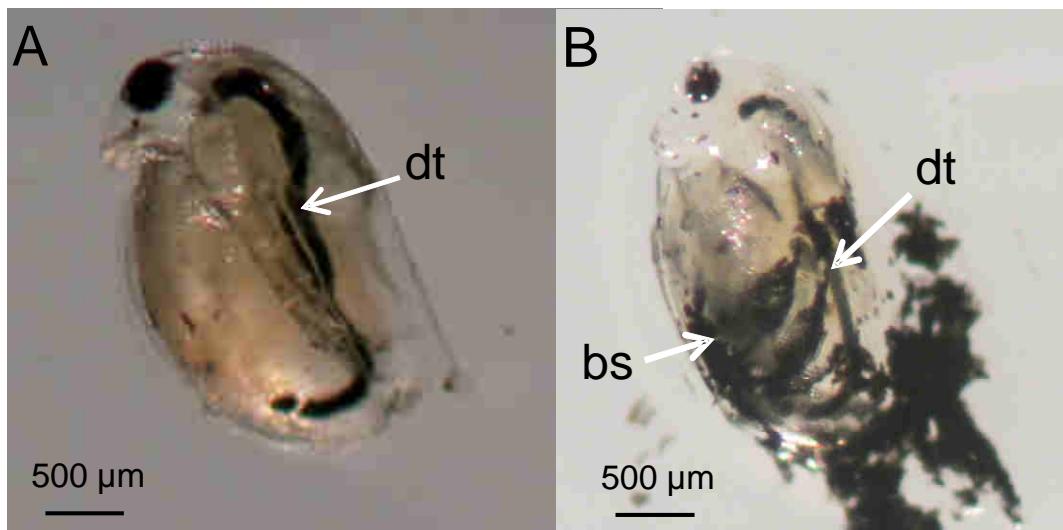


Figure 4. Binocular images of *D. magna* exposed to SWCNT after 48 h exposure to a suspension of (A) $500 \mu\text{g L}^{-1}$ and (B) $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. The black colour in the digestive tract (dt) or on the body surface (bs) shows the uptake and interaction with SWCNT.

Previously, metal impurities in carbon nanotubes were reported to disturb the hatching delay of zebrafish (Cheng et al. 2007). A 48-h lethality test was thus carried out to study the effect of a pre-sonicated filtered SWCNT solution. No significant differences between the control and other treatments were measured with a mean of survival > 85% (data not shown), and observation of organisms did not reveal any accumulation of SWCNT in the digestive tract. Therefore, we concluded that the filtered SWCNT solutions were not toxic in our model, even though the sonication process for the dispersion of SWCNT was operated for a period long enough to dissolve impurities in the medium (Toh et al. 2012). In this study, the toxicity of SWCNT to *D. magna* was thus attributed to the accumulation of SWCNT in the digestive tract rather than to the dissolution of impurities.

Toxicity of Cd in the presence of SWCNT

In natural environments, organisms are exposed to multiple contaminants. Furthermore, nanomaterials are highly reactive for their large surface area, for instance. To evaluate the toxicity of carbon nanomaterials it is crucial to consider possible interactions with other toxic substances such as metals or organic contaminants. Indeed, the surface properties and adsorption capacity of carbon nanotubes facilitate binding of compounds present in the environment or in test medium such as contaminants and influence their toxicity (Bhatt and Tripathi 2011, Al-Shaeri et al. 2013). The presence of SWCNT at 500 and 1000 µg/L enhanced the toxicity of Cd by a factor 2 with a LC50 of 127.2 and 120.1 µg L⁻¹, respectively (Figure 5). A stronger effect was measured for SWCNT at 1000 µg/L with lower variability. To our knowledge this is the first study to report a decrease in *D. magna* survival by a co-exposition to SWCNT and Cd. A previous study showed an increase of Cd accumulation in the liver of the goldfish (*Carassius auratus*) after 12 d exposure in the presence of oxidized multi-walled carbon nanotubes (Qu et al. 2014). Martinez et al. (2013) reported the increase of lead toxicity to the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the presence of purified MWCNT (Martinez et al. 2013). Another study measured a potentiating effect of SWCNT exposed with Cd or Zn on the DNA damage measured in the hemocytes of the blue mussel (*Mytilus edulis*) (Al-Shaeri et al. 2013). Although in our study SWCNT have a low adsorption capacity for Cd, the results suggest that they can still interact with Cd species and influence the toxicity to the organisms exposed. To our knowledge this is the first study highlighting such an effect in the presence of SWCNT with a low adsorption capacity. The accumulation of carbon nanotubes on the outer surface of daphnia and inside the digestive tract, as observe in binocular images (Figure 4), may induce a higher intake of Cd. The physicochemical conditions of the digestive tract of *D. magna* found in the literature (Hasler

1935, Weltens et al. 2000) support the hypothesis that Cd would then be desorbed and released into the intestine. Indeed, even though the pH is neutral in the Daphnia gastro-intestinal tract (Pennak 1978), enzymatic conditions can favor desorption processes (Lampert 1987, Weltens et al. 2000). To confirm the implicated mechanism implicated in toxicity, measurement of SWCNT and Cd intake by *D. magna* should be further investigated with quantification of contaminants into the organisms.

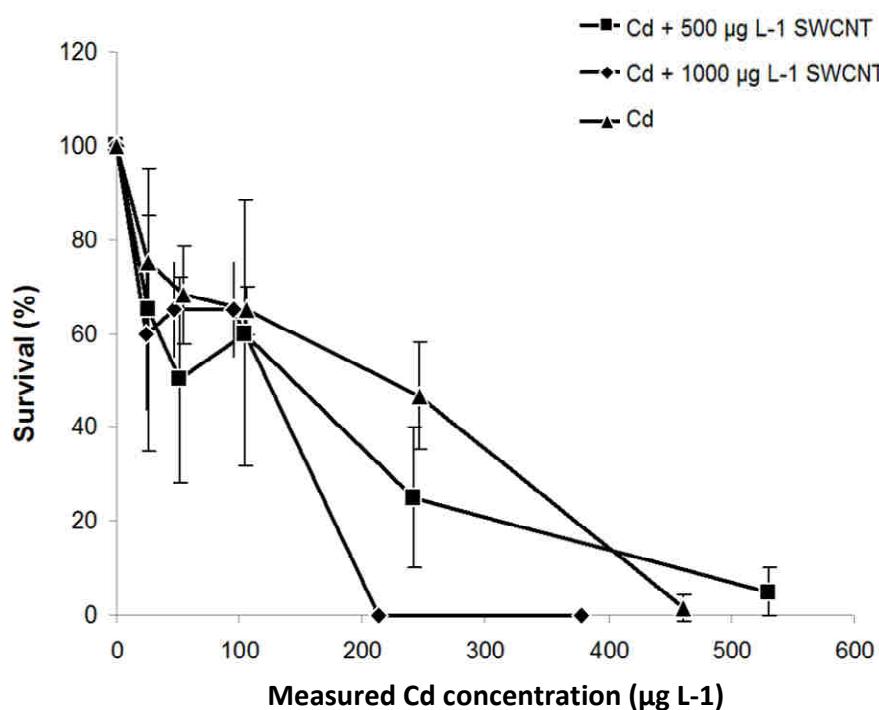


Figure 5. Mean survival of *D. magna* exposed to Cd with or without SWCNT after 48 h of exposure (mean \pm SD).

4. Conclusion

SWCNT possess a large surface area that enhances their ability to adsorb contaminants. This property is appealing for wastewater treatment (Tan et al. 2012), but also threatening for organisms that could interact with contaminants adsorbed on the surface of carbon nanotubes. Our goal in this study was to evaluate the effect of the presence of SWCNT on the toxicity of Cd to the crustacean *D. magna*. The results showed that SWCNT had a low adsorption capacity for Cd but increased the toxicity of the metal to *D. magna*. We assume that the observed effects are caused by

the uptake of free cadmium species and Cd adsorbed on SWCNT by the organisms. Our study shows how the understanding of SWCNT interactions with other contaminants is important to evaluate the consequences of their release in the environment.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Benoit Simard and Amy Hirdina from the National Research Council Canada (NRCC - Ottawa, ON) for the production and characterization of dry raw SWCNT, Florence Perrin (NRCC - Boucherville, QC) for scanning electron microscopy images and Micheline Letarte (INRS-Institut Armand-Frappier, QC) for transmission electron microscopy. We sincerely thank Patrice Turcotte (from Environment Canada) for cadmium analysis, Fanny Monteil-Rivera for her comments and Christine Kleinert for proofreading the manuscript. We thank the INRS Armand Frappier Foundation for the PhD scholarship awarded to Messika Revel.

Conflict of Interest

The authors declare having no conflict of interest.

References

- [1] Al-Shaeri, M., D. Ahmed, F. McCluskey, G. Turner, L. Paterson, E. A. Dyrynda and M. G. J. Hartl (2013). Potentiating toxicological interaction of single-walled carbon nanotubes with dissolved metals. *Environ Toxicol Chem* 32(12): 2701-2710.
- [2] Alloy, M. M. and A. P. Roberts (2011). Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicol Environ Saf* 74(7): 1839-1843.
- [3] ASTM (2014). E729-96. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
- [4] Attar, E. N. and E. J. Maly (1982). Acute toxicity of cadmium, zinc, and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol* 11(3): 291-296.
- [5] Baun, A., S. N. Sørensen, R. F. Rasmussen, N. B. Hartmann and C. B. Koch (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquat Toxicol* 86(3): 379-387.

- [6] Bhatt, I. and B. N. Tripathi (2011). Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* 82(3): 308-317.
- [7] Biesinger, K., L. Williams and W. Schalie. (2002). Procedures for conducting 'Daphnia magna' toxicity bioassays. . USER'S GUIDE. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/8-87/011 (NTIS PB88124722).
- [8] Bodar, C. W. M., C. J. Van Leeuwen, P. A. Voogt and D. I. Zandee (1988). Effect of cadmium on the reproduction strategy of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 12(4): 301-309.
- [9] Cheng, J., E. Flahaut and S. H. Cheng (2007). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem* 26(4): 708-716.
- [10] Dillon, A. C., P. A. Parilla, J. L. Alleman, T. Gennett, K. M. Jones and M. J. Heben (2005). Systematic inclusion of defects in pure carbon single-wall nanotubes and their effect on the Raman D-band. *Chem. Phys. Lett.* 401(4-6): 522-528.
- [11] Dresselhaus, M. S., G. Dresselhaus and A. Jorio (2004). Unusual properties and structure of carbon nanotubes. *Annu Rev Mater Res* 34: 247-278.
- [12] Environment-Canada (1990). Biological Test Method: Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. Report EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada: 55.
- [13] Ferguson, P. L., G. T. Chandler, R. C. Templeton, A. Demarco, W. A. Scrivens and B. A. Englehart (2008). Influence of sediment - Amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. *Environ Sci Technol* 42(10): 3879-3885.
- [14] Ferreira, A. L. G., S. Loureiro and A. M. V. M. Soares (2008). Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 89(1): 28-39.
- [15] Geller, W. and H. Müller (1981). The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* 49(3): 316-321.
- [16] Giusto, A., L. A. Somma and L. Ferrari (2012). Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyalella curvispina*. *Ecotoxicol Environ Safety* 79(0): 163-169.
- [17] Hare, L. (1992). Aquatic Insects and Trace Metals: Bioavailability, Bioaccumulation, and Toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22(5-6): 327-369.

- [18] Hasler, A. D. (1935). The physiology of digestion of plankton crustacea: I. Some digestive enzymes of daphnia. *Biol Bull* 68(2): 207-214.
- [19] Jackson, P., N. R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K. A. Jensen, U. Vogel and H. Wallin (2013). Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem Central J* 7(1):154.
- [20] Jaroniec, M. (1983). Physical adsorption on heterogeneous solids. *Adv. Colloid Interface Sci.* 18(3–4): 149-225.
- [21] Kennedy, A. J., M. S. Hull, J. A. Steevens, K. M. Dontsova, M. A. Chappell, J. C. Gunter and C. A. Weiss Jr (2008). Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* 27(9): 1932-1941.
- [22] Kim, K. S., G. Cota-Sanchez, C. T. Kingston, M. Imris, B. Simard and G. Soucy (2007). Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by induction thermal plasma. *J. Phys. D: Appl. Phys* 40(8): 2375-2387.
- [23] Lampert, W. (1987). Feeding and nutrition in Daphnia. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol* 45: 143–192.
- [24] Lazorchak, J. M., M. E. Smith and H. J. Haring (2009). Development and validation of a *Daphnia magna* four-day survival and growth test method. *Environ Toxicol Chem* 28(5): 1028-1034.
- [25] Li, M. and C. P. Huang (2011). The responses of *Ceriodaphnia dubia* toward multi-walled carbon nanotubes: Effect of physical-chemical treatment. *Carbon* 49(5): 1672-1679.
- [26] Li, Y.-h., Z.-c. Di, Z.-k. Luan, J. Ding, H. Zuo, X.-q. Wu, C.-L. Xu and D.-h. Wu (2004). Removal of heavy metals from aqueous solution by carbon nanotubes: adsorption equilibrium and kinetics. *J. Environ. Sci* 16(2): 208-211.
- [27] Li, Y.-H., Z. Di, J. Ding, D. Wu, Z. Luan and Y. Zhu (2005). Adsorption thermodynamic, kinetic and desorption studies of Pb²⁺ on carbon nanotubes. *Water Res* 39(4): 605-609.
- [28] Lu, C., H. Chiu and C. Liu (2006). Removal of Zinc(Iijima) from Aqueous Solution by Purified Carbon Nanotubes: Kinetics and Equilibrium Studies. *Ind Eng Chem Res* 45(8): 2850-2855.
- [29] Martinez, D. S. T., O. L. Alves and E. Barbieri (2013). Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *J. Phys Conference Series* 429(1).
- [30] Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int* 32(8): 967-976.
- [31] Moradi, O., K. Zare and M. Yari (2011). Interaction of some heavy metal ions with single walled carbon nanotube. *Int J Nano Dimens* 1(3): 203-220.

- [32] Mwangi, J. N., N. Wang, C. G. Ingersoll, D. K. Hardesty, E. L. Brunson, H. Li and B. Deng (2012). Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environ Toxicol Chem* 31(8): 1823-1830.
- [33] OECD Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Publishing.
- [34] Pennak (1978). Cladocera (water fleas). In *Freshwater invertebrates of the United States*. John Wiley & Sons, New York.
- [35] Petersen, E. J., J. Akkanen, J. V. K. Kukkonen and W. J. Weber (2009). Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 43(8): 2969-2975.
- [36] Petersen, E. J., J. Akkanen, J. V. K. Kukkonen and W. J. Weber (2009). Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 43(8): 2969-2975.
- [37] Petersen, E. J., R. A. Pinto, D. J. Mai, P. F. Landrum and W. J. Weber Jr (2011). Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 45(3): 1133-1138.
- [38] Qu, R., X. Wang, Z. Wang, Z. Wei and L. Wang (2014). Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *J Hazard Mater* 275: 89-98.
- [39] Qu, R. J., X. H. Wang, M. B. Feng, Y. Li, H. X. Liu, L. S. Wang and Z. Y. Wang (2013). The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicol Environ Safety* 95(0): 83-90.
- [40] Soid, G., N. Souayed, F. Yaktiti and K. Maaroufi (2013). Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicol Environ Safety* 89(0): 1-7.
- [41] Tan, C., K. Tan, Y. Ong, A. Mohamed, S. Zein and S. Tan (2012). Energy and environmental applications of carbon nanotubes. *Environ Chem Lett* 10(3): 265-273.
- [42] Templeton, R. C., P. L. Ferguson, K. M. Washburn, W. A. Scrivens and G. T. Chandler (2006). Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ Sci Technol* 40(23): 7387-7393.
- [43] Toh, R. J., A. Ambrosi and M. Pumera (2012). Bioavailability of metallic impurities in carbon nanotubes is greatly enhanced by ultrasonication. *Chem Eur J* 18(37): 11593-11596.

- [44] USGS. Mineral Commodity Summaries. U.S. Geological Survey: 36-37. 2013
- [45] Vellinger, C., M. Parant, P. Rousselle, F. Immel, P. Wagner and P. Usseglio-Polatera (2012). Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). Environ Poll 160(0): 66-73.
- [46] Wang, W. X. and P. S. Rainbow (2006). Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. Environ Chem 3(6): 395-399.
- [47] Weltens, R., R. Goossens and S. Van Puymbroeck (2000). Ecotoxicity of Contaminated Suspended Solids for Filter Feeders (*Daphnia magna*). Arch Environ Contam Toxicol 39(3): 315-323.
- [48] Weltens, R., R. Goossens and S. Van Puymbroeck (2000). Ecotoxicity of Contaminated Suspended Solids for Filter Feeders (*Daphnia magna*). Arch Environ Contam Toxicol 39(3): 315-323.
- [49] Wen-Hong, F., G. Tang, C. M. Zhao, Y. Duan and R. Zhang (2009). Metal accumulation and biomarker responses in *Daphnia magna* following cadmium and zinc exposure. Environ Toxicol Chem 28(2): 305-310.
- [50] Wijnhoven, S., Ir. A.G. Oomen, A.J.A.M. Sips, F.C. Bourgeois, G.J.P.M. te Dorsthorst, M.W. Kooi and M. I. Bakker (2011). Development of an inventory for consumer products containing nanomaterials Final Report. ENV/D3/SER/2010/0060r European commission.
- [51] Youn, S., R. Wang, J. Gao, A. Hovsepian, K. J. Ziegler, J. C. J. Bonzongo and G. Bitton (2012). Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nanotoxicology 6(2): 161-172.

ARTICLE 3 : PRELIMINARY STUDY OF SWCNT GENOTOXICITY AND IMMUNOTOXICITY IN THE PRESENCE OF CADMIUM AFTER IN VIVO EXPOSURE TO THE FRESHWATER MUSSEL *ELLIPTIO COMPLANATA*

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux

Soumis à *Ecotoxicology* le 8 décembre 2015 (ECTX-S-15-00622)

Résumé français

Le but de cette étude était de déterminer la toxicité des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) bruts et purifiées en présence de cadmium en utilisant une exposition *in vivo* avec une moule d'eau douce, *Elliptio complanata*. Plusieurs paramètres d'immunotoxicité, génotoxicité et du stress oxydant ont été mesurés sur les hémocytes, glandes digestives ou gonades de moules exposés au cadmium (Cd) à 20 µg/L, aux SWCNT bruts ou purifiés à 500 µg/L ou bien à un mélange de Cd et SWCNT. Nos résultats indiquent une légère diminution de la viabilité hémocytaire après 72 heures (82%) et 8 jours d'exposition (77%). Une augmentation de l'efficacité phagocytaire des hémocytes a été mesurée uniquement chez les organismes exposés au Cd. En outre, une augmentation des lésions de l'ADN au niveau des hémocytes a été mesurée après 24 h d'exposition au Cd. De plus, un effet potentialisateur a été mesuré pour les expositions combinées au Cd et aux deux types de SWCNT. Aucune modification des activités de la cyclooxygénase (COX) dans les gonades et l'hémolymphe n'a été mesurée. De la même manière, aucune modification de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la glutathion-S-transférase (GST) dans les gonades n'a été observée. Cette étude présente l'importance de considérer l'effet toxique potentiel des interactions entre les nanomatériaux et d'autres contaminants. Les futures études devraient s'intéresser au potentiel génotoxiques des co-expositions.

Mots clés : SWCNT, cadmium, génotoxicité, potentialisateur, bivalve

Contribution des auteurs

Messika Revel : mise en place et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Michel Fournier et Pierre Yves Robidoux : discussion des résultats et commentaires du manuscrit.

Preliminary study of SWCNT genotoxicity and immunotoxicity in the presence of cadmium after *in vivo* exposure to the freshwater mussel *Elliptio complanata*

Messika Revel,^{1 2} Michel Fournier,¹ Pierre Yves Robidoux,¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 538 boulevards des prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

² National Research Council Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Québec H4P 2R2, Canada.

Corresponding author: Messika Revel, Centre INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 538 boulevards des prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. Phone: 514 290 5008, fax: 450 686-5501, email: messika.revel@iaf.inrs.ca

Abstract

The aim of this study was to determine the toxicity of As-produced and purified single walled carbon nanotubes (SWCNT) in the presence of cadmium using *in vivo* exposure with a freshwater mussel, *Elliptio complanata*. Parameters of immunotoxicity, genotoxicity and oxidative stress were measured on hemocytes, digestive glands and gonads of mussel exposed to cadmium (Cd), SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT. Our results showed a decrease in hemocyte viability after 72-h and 8 days of exposure. An increase of hemocyte phagocytic efficiency was measured for organisms exposed to Cd. In addition, an increase of DNA damage in hemocytes was measured after 24-h of exposure to Cd and a potentiating effect for combined exposure was observed. No modification of the following activities: cyclo-oxygenase (COX) in gonads and hemolymph; and glutathion-S-transferase (GST) or lactate dehydrogenase (LDH) in gonads were measured. This study presents the importance of considering the consequences of interaction between nanomaterials and cadmium on DNA damage.

Keywords: biomarkers, SWCNT, toxic interaction, cadmium, bivalve

Introduction

Single walled carbon nanotubes (SWCNT) possess many benefits because of their physical properties, high electrical and thermal conductivity (Dresselhaus et al. 2004). They are increasingly used in various industrial applications such as electronics (Liang 2014), composite materials (Spitalsky et al. 2010) and promising future applications include environmental remediation and drug targeting (Liu et al. 2013). Indeed, carbon nanotubes possess surface and adsorption properties which enable the binding to environmental components such as organics matter or pollutants on their surface (Baun et al. 2008, Alloy et al. 2011). Those characteristics are attractive for remediation but also worrisome for organisms which will be exposed to a variety of compounds. Indeed, natural environments are already contaminated with various contaminants from metals to organic compounds which raise concerns over the consequence of carbon nanomaterials release in the environment (Petersen et al. 2011). Hence, previous work has measured toxicity partly caused by other contaminants sorbed or sequestered by carbon nanotubes which acted as a contaminants carrier to organisms (Hu et al. 2013, Martinez et al. 2013). Nevertheless, the potential interactions with environmental components leave the possibility to obtain carbon nanotubes more or less dispersed in the environment (Jackson et al. 2013). Moreover, several processes such as purification have been developed to enable their use in various composite materials and increase their dispersion in aquatic media (Dujardin et al. 1998).

Over the past few years, several investigations have evaluated the toxicity of SWCNT at an individual level to various aquatic organisms such as algae (Bennett et al. 2013), daphnids (Petersen et al. 2009), copepods (Blaise et al. 2008) and fish (Smith et al. 2007, Fraser et al. 2011). Previous work has also addressed the modification of sub lethal parameters in benthic organisms.

Because of its ubiquitous repartition and filter feeding habit, mussels are widely used in ecotoxicological studies to investigate the toxic potential of xenobiotics including nanomaterials on cellular and molecular parameters (Baun et al. 2008, Gomes et al. 2012). Indeed, the use of such organisms is particularly recommended because nanomaterials tend to settle in aquatic environment due to their hydrophobic nature. Previously, the analysis of DNA damages in aquatic organisms has been shown to be a highly suitable method for evaluating the genotoxic contamination of environments. It enables the detection of exposure to low concentrations of contaminants in a wide range of species. While several studies have measured the induction of

DNA damage in mammalian cells exposed to carbon nanotubes (Lindberg et al. 2009, Di Giorgio et al. 2011, Ursini et al. 2012), few reports are available for molluscs and one study measured DNA strand breaks of SWCNT to the marine mussel *M. Mytilus* (Al-Shaeri et al. 2013). Others have addressed immunotoxic impact. Bivalves possess an innate immunitary system, found in the hemolymph, that involves cellular (phagocytosis, encapsulation, nodule formation, encapsulation, etc.) and humoral (lysozyme activity, lectin/cytokine production, etc.,) defence capacities (Auffret 1988, Gliński et al. 1997). In addition, inflammatory stress can be evaluated by measuring the activity of cyclo-oxygenase (COX) enzyme, which is responsible for the production of prostaglandins in the tissues (Gagné et al. 2004) and participate in the destruction of bacteria in hemolymph (Canesi et al. 2002). Previous studies have observed diminution of viability and phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cd QDs (Katsumiti et al. 2014) and TiO₂ (Barmo et al. 2013). Induction of oxidative stress has also been proposed as mechanisms involved in carbon nanotubes toxicity with modification of antioxidant and Phase II enzyme activities such as GST. In mussels *M. galloprovincialis* exposed to carbon nanomaterials, an increase in antioxidant enzyme and GST activity has been measured (Canesi et al. 2010). However, to our knowledge, there are no studies on freshwater mussels exposed to SWCNT.

Aquatic organisms are exposed to a variety of pollutants in freshwater ecosystems. Hence, it is necessary to address the interactions with known contaminants to investigate the ecotoxic potential of carbon nanotubes. Cd is a non-essential metal which is harmful to humans and fauna. Cd is able to induce oxidative stress, with modification of antioxidant enzyme activity such as GST (Faria et al. 2009, Chandurvelan et al. 2013), which can lead to DNA lesions such as DNA breaks or adducts. It can also interfere with DNA repair process (Waisberg et al. 2003). Increase in DNA damage has been measured using the comet assay with the mussel *M. galloprovincialis* (Rocha et al. 2014). Our study aims to measure the sublethal toxicity of SWCNT in the presence of Cd after *in vivo* exposure to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Three aspects were chosen for their complementary information: potential induction of DNA damage using the comet assay, induction of oxidative stress by measuring GST and lactate dehydrogenase (LDH) activity, and immunological parameters disruption by evaluating phagocytosis and COX activity. The individual and combined toxicological effects were measured after 24h, 72-h or 8 days of exposure.

Materials and Methods

Synthesis, preparation and characterization of SWNT

As-produced (As-p SWCNT) and purified (P-SWCNT) SWCNT, provided by Dr. Benoit Simard's research team (NRCC, Ottawa), were synthesized using a plasma system modified from a previous method (Kim et al. 2007). Purification of As-p SWCNT was operated using a thermal oxidation and a concentrated acid treatment as follow: samples were heat treated at 325°C for 180 h, washed with concentrated HNO₃/H₂SO₄, neutralized with base and a final heat treatment at 325°C for 85 h was applied (NRCC, Ottawa).

The chemical properties of dry SWCNT were measured using thermo-gravimetric analysis (TGA) and Raman spectrometry (WiTec confocal microscope fiber coupled to an Acton 2500i spectrograph fitted with a Roper Scientific CCD array detector). The diameter of SWCNT was calculated from the characteristic radial breathing (RBM) wave number (ω) using the following relation: $D \text{ (nm)} = 248/\omega$.

SWCNT suspensions were dispersed in dechlorinated water by probe sonication for 10 minutes at 80 W (Ultrasonic processor, frequency 25 kHz, Misonix S4000). Dynamic light scattering technique (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) was used to determine the particle size and electrophoretic mobility of SWCNT suspensions. The latter was calculated from the zeta potential values using the Henry equation (Eq. (1)) with the Smolchenski approximation:

$$(1) \quad U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Where U_E is the electrophoretic mobility ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$), ϵ is the dielectric constant of the medium, z is the zeta potential (mV), $f(ka)$ is Henry's function and correspond to the ratio of particle radius to double layer thickness (1.5) and η is the viscosity ($\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

In addition, morphology of SWCNT was determined by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM, Hitachi 4700) operated at 2 kV and transmission electron microscopy (TEM, Hitachi H-7100).

Sampling and maintenance conditions

Mussels *E. complanata* (length 81.9 + 6 mm; n= 90) were collected on June 4th 2014 at the Lac des Écories which is not subjected to any direct sources of pollution. The mussels were randomly placed in five 20-L aerated aquariums with about 20 specimens each, and acclimatized to dechlorinated water at temperature of 15°C with a 16 h of light/8 h of dark photoperiod. Mussels were fed weekly with concentrates of phytoplankton (Phytoplex ©) and algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) after water renewal.

Exposure of *E. complanata* and hemolymph collection

Exposure of *E. complanata* to Cd, As-pSWCNT or P-SWCNT

Stock solutions of CdCl₂ (1g/L) and SWCNTs (10 mg/L) were prepared in dechlorinated water. Five mussels (from each aquarium) were exposed to Cd at 20 µg/L, As-p SWCNT or P-SWCNT at 500 µg/L or to a combination of Cd and SWCNT. Each prepared solution was dissolved in 3.5 L of dechlorinated water and mussels exposed for 8 days at 15°C. Mussel hemolymph was collected at 24-h, 72-h and 8 days of exposure and the organisms were dissected for further analysis. The gonads and the digestive glands were stored at -80°C until parameter measurements.

Hemolymph collection

Hemolymph containing hemocytes was collected from the posterior adductor mussels using a 3 ml syringe with 22G-gauged needle of individuals. Total cell concentrations and viabilities for each mussel were determined microscopically using a Neubauer hemocytometer in which was introduced the cell suspension mixed with 0.4% trypan blue in a 1:4 (v:v) ratio.

Phagocytosis

Phagocytic activity was evaluated by following the procedure of Brousseau et al. 1999. Briefly, 500 µL of hemolymph suspension was mixed with Fluorescent latex beads (Polysciences) at a ratio of 100:1 (beads: hemocytes) and incubated for 18-h in the dark at 15 °C. After the 18-h of exposure, each cell suspension (0.5 ml) was layered over 4 mL of a 3% bovine serum albumin gradients and centrifuged at 150 x g for 8 min at 4 °C (Brousseau et al. 1999). This step

allows the removal of free beads at the cell surface. The pellets were fixed in a solution of 0.5 % formaldehyde and 0.2% sodium azide. The phagocytosis was analysed by measuring the cell fluorescence in flow cytometry (FACSCalibur). For each sample 10,000 events were acquired. Results were analyzed with the CellQuest Pro software (Becton Dickinson) to determine the percentage of cells containing one bead or more and three beads or more in order to determine the phagocytosis activity and efficiency respectively.

Biochemical biomarkers

COX activity was measured in supernatant of hemocytes and gonads after centrifugation of cell suspension at 12 000 x g by the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein substrate in the presence of arachidonate (Fujimoto et al., 2002). In brief, 1 ml of the 12 000 x g supernatant was added to a freshly prepared assay mixture containing 50 mM arachidonate, 10 mM dichlorofluorescein and 0.1 µg/mL of horseradish peroxidase in 50 mM Tris-acetate buffer, pH 8, containing 0.1% Tween 20, 0.5 mM EDTA and 10 mM hematin. The fluorescence was measured every 5 min during 30 min, at 485 nm for excitation and 535 nm for emission using a spectrophotometer (SpectraMax M5, Molecular devices). The data were expressed as increase in relative fluorescence units/ min/ mg of protein. Protein content was determined by the method using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

GST activity was determined in the digestive gland using the method of Habig et al. (1974), with 2,4-dichloronitrobenzene as a substrate in microplates (Habig et al. 1974). The assay was performed on the 12 000 x g supernatant using 0.1mM of the substrate (1-chloro-2,4-dinitrobenzene). Absorbance readings were made at 340 nm using a microplate reader. Data were expressed as the decrease in absorbance min/ mg protein.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in the digestive gland. Briefly, an aliquot of the homogenate prepared as described above for GST was centrifuged at 3 300 x g for 5 min at 4°C. The activity was measured by monitoring the absorbance decrease at 340 nm due to NADH oxidation (Diamantino et al. 2001).

Comet assay

DNA damage was quantified in *E. complanata* hemocytes using the alkaline comet assay as described by Singh et al. (Singh et al. 1988) and modified as follows. Cell suspension was

added to 1 % low-melting-point agarose in PBS with a ratio of 1:1. The mix was applied to a microscopy slide pre-coated with 1 % agarose and covered with a 18×18-mm glass coverlid. Two slides (two gels per slide) were tested per condition. After agarose polymerization operated at 4 °C for 10 min, the coverslip was removed and the slides were placed in a freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris–HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4 °C for 90 min in the dark. The slides were then placed 30 min in an electrophoresis buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) for DNA unwinding. Electrophoresis was performed at 23 V and 300 mA (0.8 V/cm) for 24 min to enable DNA unwinding. The slides were washed three times for 5 min in a neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5). Slides were drained, immersed in 70% ethanol to dehydrate agarose for 5 min, dried, and stored at room temperature prior to scoring. The slides were stained with 20 µL of SYBRGREEN solution just before the examination with inverted fluorescent microscope. For the quantization of the comet assay data, 50 randomly selected cells on each gel were measured using KOMET 6.0 image analysis software (Andor, Gamble Technologies Ltd, ON, Canada). Two comet parameters, the tail DNA content (proportion based on tail intensity) and the olive tail moment (product of comet tail length and proportion DNA in comet tail) were measured (Kumaravel et al. 2006).

Statistical analysis

For the comet assay, the Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the variance of the data. The non parametric Wilcoxon test was used to evaluate any significant differences. All comet statistical analysis was performed with R software. For all other biomarkers, statistical comparisons between treatments were conducted using one-way analysis of variance (Murray et al. 2009), followed by a multiple comparison post hoc test using the software JMP 4.

Results

Characterization of SWCNT

Characterization of dry SWCNT samples was previously described (Revel et al. 2015). For As-p SWCNT, TGA analysis confirmed that the sample contained approximately 60 % of unpurified SWCNT oxidized, 20 % of highly pure and defect-free SWCNT with 20 % residual mass

corresponding to the fully oxidized catalysts metals as previously reported (Kim et al. 2007). For P-SWCNT, the sample contained 85 % of highly pure carbon and 15 % of fully oxidized catalysts metals.

In addition, the ratio of the G-band (~1580 cm⁻¹) to the D-band (~1350 cm⁻¹) using Raman spectrometry (WiTec confocal microscope fiber coupled to an Acton 2500i spectrograph fitted with a Roper Scientific CCD array detector) was established. Indeed, it can be a good measure for the purity evaluation of SWCNT sample (Lian et al. 2004). The weaker D-band intensity of the P-SWCNT sample than that of As-p SWCNT sample indicated a lower amount of amorphous carbon. Moreover, the SWCNT diameter was estimated at 1.53 nm. The FEG-SEM and TEM analysis of SWCNT solutions confirmed the presence of impurities on nanotubes (Figure 1).

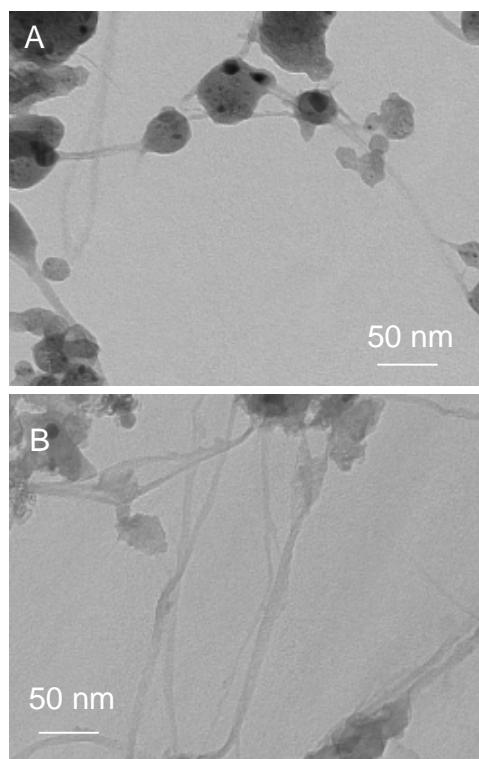


Figure 1. Transmission electron microscopy images of As-p SWCNT (A) and P-SWCNT (B) in milliQwater at 10 and 50 mg/L respectively.

In solution, SWCNT formed large agglomerates with an average size ranging from 250 to 4900 nm for As-p SWCNT and P-SWCNT which is in the range of the particle size that can be

captured by the gill (between 1 and 6 μM) (Ward and Shumway, 2003). An electrophoretic mobility with a minimum value of $-1.6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a maximum of $-1.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for As-p SWCNT and P-SWCNT was measured.

Phagocytosis

Hemocytes viability was about 85-90% after 24-h and started to decline at 65-85% after 72-h for As-p SWCNT, P-SWCNT and Cd + As-p SWCNT; and after 8 days for all treatments except the negative control (Figure 2.A). Whereas no significant differences was measure for phagocytic activity, phagocytic efficiency in hemocytes of mussels exposed to Cd was increased after 72-h of exposure (Figure 2.B).

DNA damage

Due to the viability decrease in hemocytes, the comet assay could be performed only after 24 h of exposure (viability > 87%). A significant increase in DNA damage, expressed by the tail DNA (Figure 3.A) and olive tail moment (Figure 3.B) was measured in organisms exposed to Cd and the mixture of Cd + As-p SWCNT or Cd + P-SWCNT compared to the control ($p<0.001$). The DNA damage was also significantly increased for mussels exposed to Cd + As-p SWCNT compared to Cd or As-p SWCNT; and for organisms exposed to Cd + P-SWCNT compared to Cd or P-SWCNT. Hence, a potentiating toxic effect was measured for mixture of Cd + As-p SWCNT and Cd + P-SWCNT.

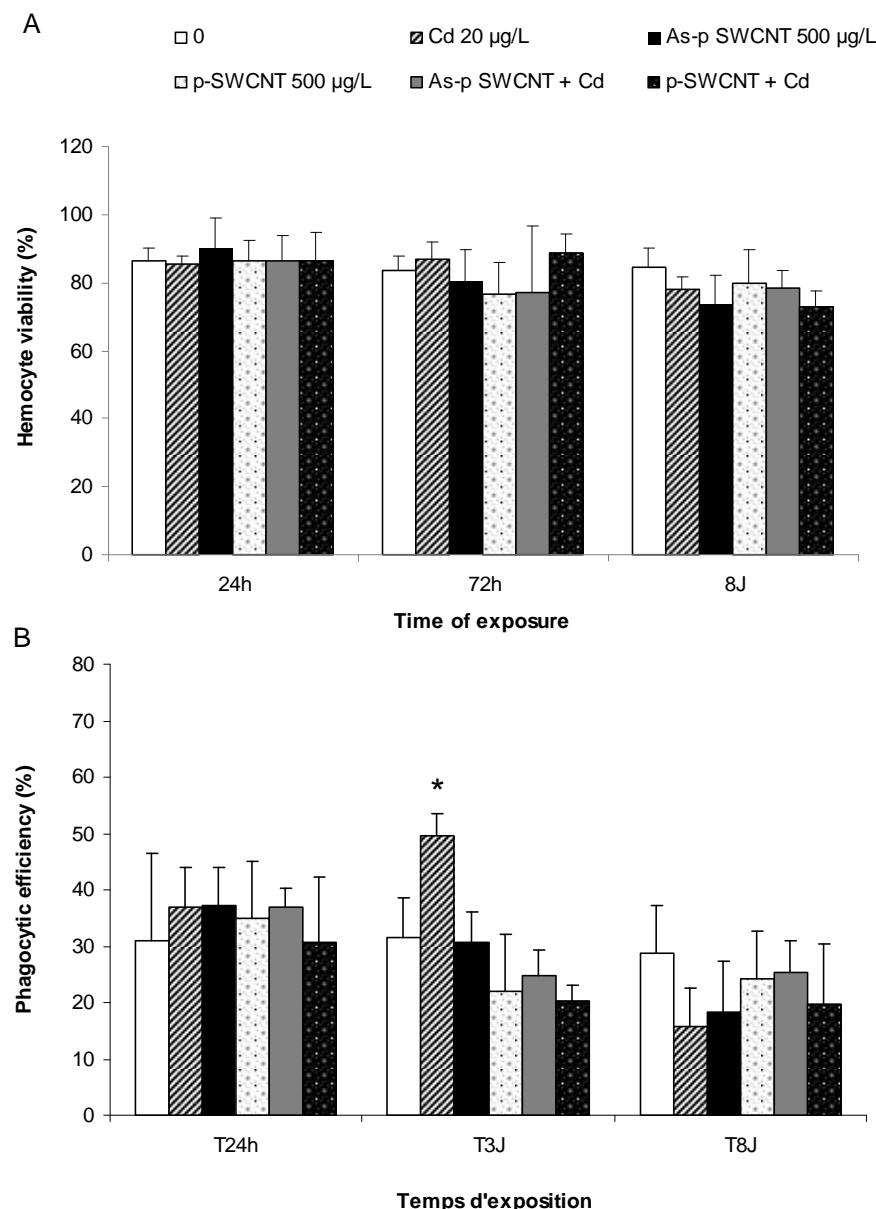


Figure 2. Viability (A) and phagocytic efficiency (B) of the mussel *E. complanata* hemocytes exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT (mean + SEM, n=5) for 8 days. “**” indicates significant difference of group exposed compared to the control.

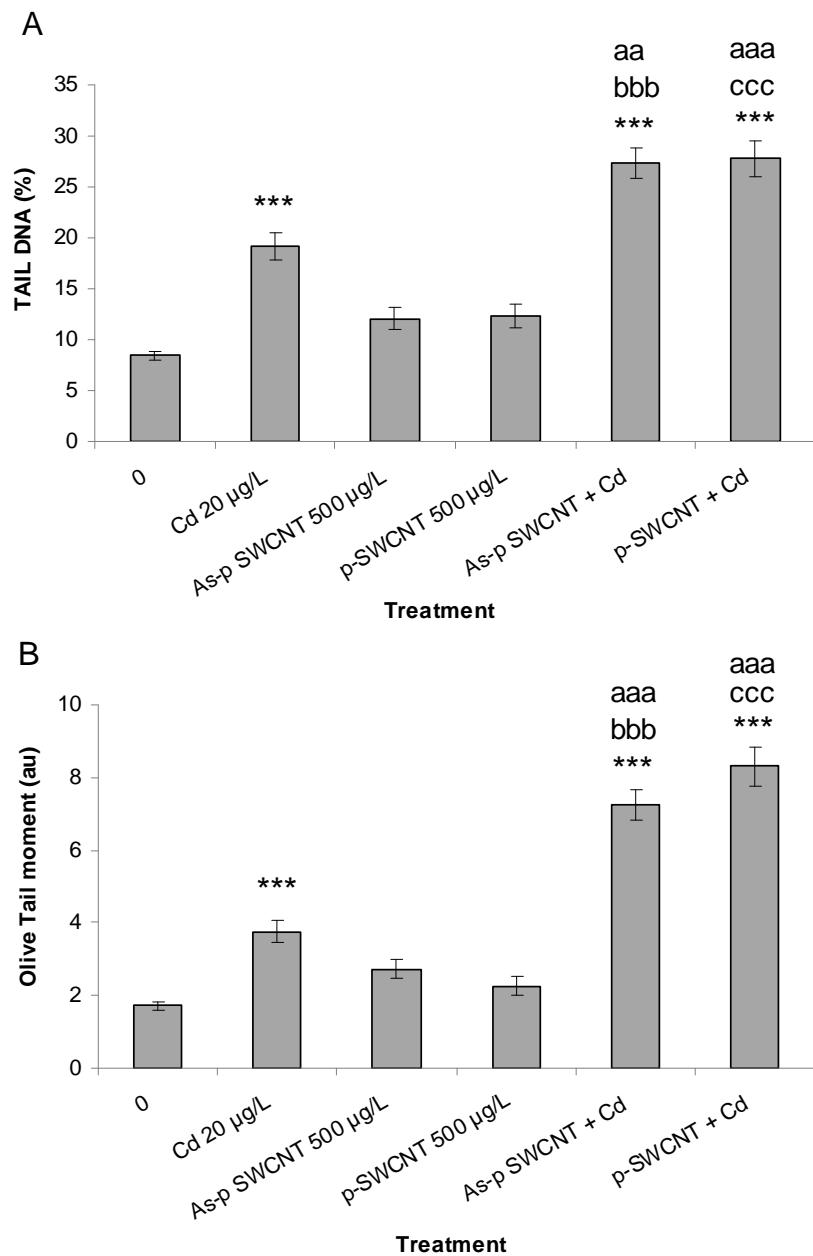


Figure 3. DNA damage in hemocytes of mussels *E. complanata* exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT for 24-h (mean ±SEM, n=300) expressed as Tail DNA (A) and Olive Tail moment (B). Stars and letters represent statistical differences between each treatment and negative control as follow: (*) negative control vs treatments, (a) Cd vs. mixtures, (b) As-p SWCNT vs. mixture, (c) P-SWCNT vs. mixture. Three levels of significance were used (*,a,b : p < 0.05; **,aa,bb : p< 0.01; ***,aaa,bbb : p<0.001).

Biochemical analysis

No significant differences between treatments were measured for LDH and GST activity (Figure 4.A et B). Nevertheless, an increase in gonads GST activity for all treatments after 8 days compared to the 72-h of exposure was observed (Figure 4.B). No modification of COX activity was measured in gonads (Figure 4.C) but an increase for all treatments was measured after 72-h compared to the 24-h exposure time in hemocytes (Figure 4.D).

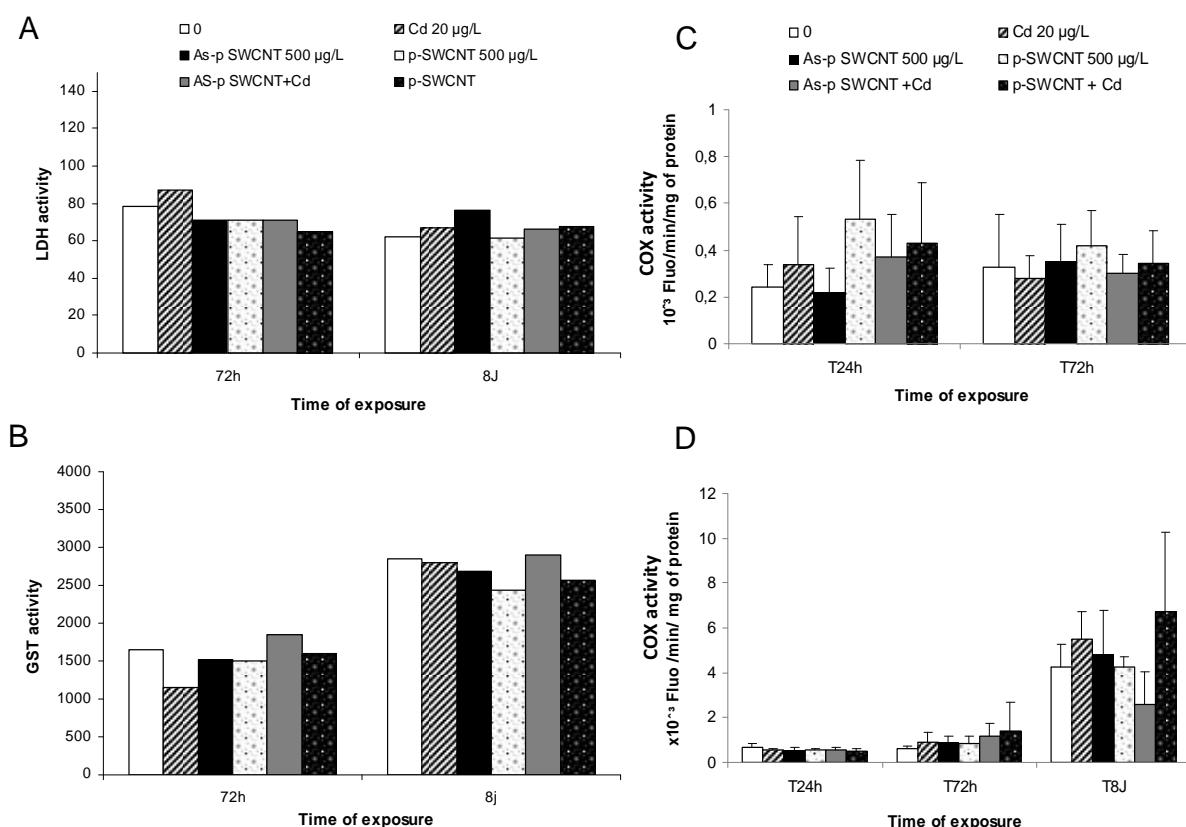


Figure 4. Lactate dehydrogenase (A), glutathione-S-Transferase (B) measured in digestive glands and Cyclo-oxygenase activity measured in gonads (C) and hemocytes (D) of mussel *E. complanata* exposed to Cd (20 µg/L), As-p SWCNT (500 µg/L), P-SWCNT (500 µg/L) and a mixture of Cd and SWCNT (LDH and GST: mean of 3 replicate per condition, in nmole/min/mg of protein ; COX: mean \pm SEM, n=5).

Discussion

Carbon nanotubes are generally perceived as less threatening than other contaminants because of their hydrophobic nature inducing their settlement in aquatic media which therefore limits their dispersion in the water column and increase their accumulation in sediment. Nevertheless, because the production and development of carbon nanomaterials is increasing, the evaluation of SWCNT toxic potential is still necessary for risk assessment purpose. In order to establish the potential immunotoxicity of SWCNTs alone and combined with Cd, we measured viability, phagocytosis and COX activity in hemocytes or gonads. Those parameters enabled us to determine the health status of the organisms exposed. Whereas Cd induced an increase in phagocytic efficiency, at a low non-cytotoxic concentration (20 µg/L) in hemocytes after 24h of exposure, SWCNT did not modify phagocytosis. Because Cd is known for generating oxidative stress and hemocytes of mussels use ROS as immunological defences (Pipe and Coles, 2005), it is possible that in our experiment, after 24-h, the mussels defend themselves and recover from the Cd effect. Phagocytosis has been measured in *E. complanata* exposed to several types of pollutants (Sauvé et al. 2002) and modification of phagocytic activity has mainly been observed with exposure to metallic nanoparticles (Barmo et al. 2013, Bruneau et al. 2015). Cd Canesi et al. (2008) measured a stimulation of immune parameters in mussel hemocytes exposed *in vitro* to carbon black (Canesi et al. 2008). The absence of phagocytosis and COX activity modification implies that SWCNTs combined or not with Cd have no impact on the immune parameters of the mussel *E. complanata* in the conditions tested.

Enzymatic activity of GST and LDH were measured in digestive glands in order to evaluate the biochemical status of mussels exposed to SWCNTs and/or Cd. In our study, no modifications of the GST (clue of oxidative stress) or LDH (indicator of metabolic impairment) were measured between the negative control and the treatment. These results suggest that Cd and SWCNT at the concentrations tested have a limited impact on oxidative stress in this organ. Previous work has shown an increase in GST activity in mussel *M. galloprovincialis* exposed to C60 fullerene (Canesi et al. 2010). Another study has shown an induction of oxidative stress in the freshwater snail *Lymnaea luteola* with a decrease in GST and glutathione peroxidase activity (Ali et al. 2014).

Reports about nanomaterials genotoxic potential to aquatic organisms can be essentially found with metallic nanoparticles (Gomes et al. 2013, Rocha et al. 2014, Vignardi et al. 2015) whereas information about carbon nanotubes are very sparse (Ali et al. 2014, Filho et al.

2014). Among genotoxicity tests, the comet assay is one of the most common used to assess DNA strand breaks in aquatic organisms. In bivalves, it enables the determination of xenobiotics genotoxic potential including carbon nanomaterials (Naya et al. 2011, Al-Shaeri et al. 2013). In our study, we observed induction of DNA lesions in hemocytes from mussels *E. Complanata* after 24 h of exposure to Cd or a mixture of Cd and As-p SWCNT or P-SWCNT. Cd is known to increase oxidative stress which can induce DNA damage, but can also interfere with DNA repair mechanisms. Previous work has shown the induction of DNA stand break by Cd in fish (Isani et al. 2009), freshwater mussels (Faria et al. 2009) and snails (Vincent-Hubert et al. 2012). A limited number of studies have addressed the genotoxic potential of carbon nanotube toward bivalve. Al shaeri et al. (2013) measured an increase in DNA strand break for a marine mussel exposed to SWCNT at low concentrations (5-500 µg/L). Our results showed no DNA damage induced by SWCNT alone but its presence increased Cd genotoxicity. For this reason, we believe that the effect observe is of a potentiating nature. A similar effect has also been observed in the marine mussel *Mytilus edulis* where SWCNT could potentiate metals (Al-Shaeri et al. 2013) but also in mice exposed to multi walled carbon nanotubes inducing a potentiating effect of airway fibrosis (Ryman-Rasmussen et al. 2009). However, to our knowledge it has never been measured in freshwater mussels and never studied with purified SWCNT. The mechanism of SWCNTs genotoxicity is not well understood. Some reports imply that SWCNT could penetrate the cells and be cytotoxic or genotoxic (Cui et al. 2005, Magrez et al. 2006) or even carcinogenic (Sargent et al. 2012).

Because in natural waters organisms are exposed to multiple pollutants, the evaluation of interaction between nanomaterials and other contaminants towards organisms is crucial. This preliminary study was an attempt to measure the toxic effect of SWCNT co exposed with Cd, a toxic metal. Our first results show the potentiating genotoxic effect of SWCNT towards Cd to the freshwater mussel *E. complanata*, indicating that the indirect ecotoxic effect could be more harmful to aquatic organisms. Indeed, direct effects are usually measured at concentrations higher than estimated concentration in the environment (Revel et al. 2015). Future studies should focus on other genotoxic damages such as DNA adduct or micronucleus (Châtel et al. 2015) induced by carbon nanotubes combined with environmental contaminants such as other metals, hydrocarbons or pesticides.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Benoit Simard and Amy Hirdina from the National Research Council Canada - Ottawa for the production and characterization (TGA and Raman spectrometry) of dry raw SWCNT, Florence Perrin from the NRCC (Boucherville, QC) for scanning electron microscopy images and Micheline Letarte (INRS-Institut Armand-Frappier) for transmission electron microscopy. We thank the Armand Frappier Foundation for the PhD scholarship awarded to Messika Revel.

References

- Al-Shaeri, M., D. Ahmed, F. McCluskey, G. Turner, L. Paterson, E. A. Dyrynda and M. G. J. Hartl. 2013. Potentiating toxicological interaction of single-walled carbon nanotubes with dissolved metals. *Environ Toxicol Chem* 32: 2701-2710.
- Ali, D., M. Ahmed, S. Alarifi and H. Ali. 2014. Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environ Toxicol* 30: 674-682.
- Alloy, M. M. and A. P. Roberts. 2011. Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 1839-1843.
- Auffret, M. 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs* (W. S. Fisher, ed.). American Fisheries Society Special Publication 18: 169-177.
- Barmo, C., C. Ciacci, B. Canonico, R. Fabbri, K. Cortese, T. Balbi, A. Marcomini, G. Pojana, G. Gallo and L. Canesi. 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.
- Baun, A., N. B. Hartmann, K. Grieger and K. O. Kusk. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicol* 17: 387-395.
- Baun, A., S. N. Sørensen, R. F. Rasmussen, N. B. Hartmann and C. B. Koch. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquat Toxicol* 86: 379-387.

- Bennett, S. W., A. Adeleye, Z. Ji and A. A. Keller. 2013. Stability, metal leaching, photoactivity and toxicity in freshwater systems of commercial single wall carbon nanotubes. *Water Res* 47: 4074-4085.
- Blaise, C., F. Gagné, J. F. Férand and P. Eullaffroy. 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ Toxicol* 23: 591-598.
- Brousseau, P., Y. Payette, B. R. Blakley, H. Boermans, H. Tryphonas and M. Fournier. 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boston, USA 141p.
- Bruneau, A., M. Fortier, F. Gagne, C. Gagnon, P. Turcotte, A. Tayabali, T. A. Davis, M. Auffret and M. Fournier. 2015. In vitro immunotoxicology of quantum dots and comparison with dissolved cadmium and tellurium. *Environ Toxicol* 30: 9-25.
- Canesi, L., C. Ciacci, M. Betti, R. Fabbri, B. Canonicco, A. Fantinati, A. Marcomini and G. Pojana. 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ Int* 34: 1114-1119.
- Canesi, L., R. Fabbri, G. Gallo, D. Vallotto, A. Marcomini and G. Pojana. 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquat Toxicol* 100: 168-177.
- Canesi, L., A. Scarpato, M. Betti, C. Ciacci, C. Pruzzo and G. Gallo. 2002. Bacterial killing by mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar Environ Res* 54: 547-551.
- Chandurvelan, R., I. D. Marsden, S. Gaw and C. N. Glover. 2013. Biochemical biomarker responses of green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, to acute and subchronic waterborne cadmium toxicity. *Aquat Toxicol* 140–141: 303-313.
- Châtel, A., V. Faucet-Marquis, C. Gourlay-Francé, A. Pfohl-Leszkowicz and F. Vincent-Hubert. 2015. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. *Ecotoxicol Environ Saf* 114: 241-249.
- Cui, D., F. Tian, C. S. Ozkan, M. Wang and H. Gao. 2005. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 155: 73-85.
- Di Giorgio, M. L., S. D. Bucchianico, A. M. Ragnelli, P. Aimola, S. Santucci and A. Poma. 2011. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mu* 722: 20-31.

- Diamantino, T. C., E. Almeida, A. M. V. M. Soares and L. Guilhermino. 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. Chemosphere 45: 553-560.
- Dresselhaus, M. S., G. Dresselhaus and A. Jorio (2004). Unusual properties and structure of carbon nanotubes. Annu Rev Mater Res. 34: 247-278.
- Dujardin, E., T. W. Ebbesen, A. Krishnan and M. M. J. Treacy. 1998. Purification of Single-Shell Nanotubes. Advanced Materials 10: 611-613.
- Edgington, A. J., E. J. Petersen, A. A. Herzing, R. Podila, A. Rao and S. J. Klaine. 2014. Microscopic investigation of single-wall carbon nanotube uptake by *Daphnia magna*. Nanotoxicology 8: 2-10.
- Faria, M., L. Carrasco, S. Diez, M. C. Riva, J. M. Bayona and C. Barata. 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. Comp Bio Phys Part C: Toxicol Pharmacol 149: 281-288.
- Filho, J. d. S., E. Y. Matsubara, L. P. Franchi, I. P. Martins, L. M. R. Rivera, J. M. Rosolen and C. K. Grisolia. 2014. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*danio rerio*) model. Environ Res 134: 9-16.
- Fraser, T. W. K., H. C. Reinardy, B. J. Shaw, T. B. Henry and R. D. Handy. 2011. Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C60) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Nanotoxicology 5: 98-108.
- Gagné, F., M. Fournier and C. Blaise. 2004. Serotonergic effects of municipal effluents: Induced spawning activity in freshwater mussels. Fresenius Environmental Bulletin 13: 1099–1103.
- Gliński, Z. and J. Jarosz. 1997. Molluscan immune defenses. Arch Immunol Ther Exp 45: 149-155.
- Gomes, T., O. Araújo, R. Pereira, A. C. Almeida, A. Cravo and M. J. Bebianno. 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Mar Environ Res 84 : 51-59.
- Gomes, T., C. G. Pereira, C. Cardoso, J. P. Pinheiro, I. Cancio and M. J. Bebianno. 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 118 – 119 : 72-79.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferases : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249 : 7130-7139.

- Hu, C., Y. Cai, W. Wang, Y. Cui and M. Li. 2013. Toxicological effects of multi-walled carbon nanotubes adsorbed with nonylphenol on earthworm *Eisenia fetida*. Environ Sci : Processes and Impacts 15 : 2125-2130.
- Innovative-Report. 2011. Production and Applications of Carbon nanotubes, Carbon nanofibers, Fullerenes, Graphene and Nanodiamonds : A Global Technology Survey and Market Analysis. Innovative Research and Products http://www.innoresearch.net/report_summary.aspx?id=77&pg=531&rcd=ET113&pd=2/1/2011 :
- Isani, G., G. Andreani, F. Cocchioni, D. Fedeli, E. Carpené and G. Falcioni. 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. Ecotoxicol Environ Saf 72 : 224-230.
- Jackson, P., N. R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K. A. Jensen, U. Vogel and H. Wallin. 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chem Cent J 7 : 154.
- Katsumiti, A., D. Gilliland, I. Arostegui and M. P. Cajaraville. 2014. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 153 : 39-52.
- Kim, K. S., G. Cota-Sanchez, C. T. Kingston, M. Imris, B. Simard and G. Soucy. 2007. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by induction thermal plasma. J. Phys. D : Appl. Phys. 40 : 2375-2387.
- Kumaravel, T. S. and A. N. Jha. 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mu 605 : 7-16.
- Lian, Y., Y. Maeda, T. Wakahara, T. Akasaka, S. Kazaoui, N. Minami, T. Shimizu, N. Choi and H. Tokumoto. 2004. Nondestructive and High-Recovery-Yield Purification of Single-Walled Carbon Nanotubes by Chemical Functionalization. J Phys Chem B 108 : 8848-8854.
- Liang, X. 2014. Chapter 19 - Transition from Tubes to Sheets — A Comparison of the Properties and Applications of Carbon Nanotubes and Graphene. Nanotube Superfiber Materials. M. J. S. N. S. Yin. Boston, William Andrew Publishing : 519-568.
- Lindberg, H. K., G. C. M. Falck, S. Suhonen, M. Vippola, E. Vanhala, J. Catalán, K. Savolainen and H. Norppa. 2009. Genotoxicity of nanomaterials : DNA damage and micronuclei

- induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett* 186 : 166-173.
- Liu, X., M. Wang, S. Zhang and B. Pan. 2013. Application potential of carbon nanotubes in water treatment : A review. *J. Environ. Sci* 25 : 1263-1280.
- Magrez, A., S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller and L. Forró. 2006. Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials. *Nano Letters* 6 : 1121-1125.
- Martinez, D. S. T., O. L. Alves and E. Barbieri. 2013. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *J. Phys Conference Series* 429 :
- Murray, A. R., E. Kisin, S. S. Leonard, S. H. Young, C. Kommineni, V. E. Kagan, V. Castranova and A. A. Shvedova. 2009. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicol* 257 : 161-171.
- Naya, M., N. Kobayashi, K. Mizuno, K. Matsumoto, M. Ema and J. Nakanishi. 2011. Evaluation of the genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. *Regul Toxicol Pharmacol* 61 : 192-198.
- Petersen, E. J., J. Akkanen, J. V. K. Kukkonen and W. J. Weber. 2009. Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 43 : 2969-2975.
- Petersen, E. J., L. Zhang, N. T. Mattison, D. M. O'Carroll, A. J. Whelton, N. Uddin, T. Nguyen, Q. Huang, T. B. Henry, R. D. Holbrook and K. L. Chen. 2011. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* 45 : 9837-9856.
- Revel, M., M. Fournier, P.Y Robidoux. 2015. Single-walled carbon nanotubes toxicity to the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: Influence of sediment and exposure duration. *J Xenobiotics* 5:5086.
- Rocha, T. L., T. Gomes, C. Cardoso, J. Letendre, J. P. Pinheiro, V. S. Sousa, M. R. Teixeira and M. J. Bebianno. 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 101 : 29-37.
- Ryman-Rasmussen, J. P., E. W. Tewksbury, O. R. Moss, M. F. Cesta, B. A. Wong and J. C. Bonner. 2009. Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes Potentiate Airway Fibrosis in Murine Allergic Asthma. *Am J Resp Cell Mol* 40 : 349-358.

- Sargent, L. M., A. F. Hubbs, S. H. Young, M. L. Kashon, C. Z. Dinu, J. L. Salisbury, S. A. Benkovic, D. T. Lowry, A. R. Murray, E. R. Kisin, K. J. Siegrist, L. Battelli, J. Mastovich, J. L. Sturgeon, K. L. Bunker, A. A. Shvedova and S. H. Reynolds. 2012. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mu* 745 : 28-37.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Senécal, P. Goudreau and M. Fournier. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves : in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat Toxicol* 58 : 189-200.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 : 184-191.
- Smith, C. J., B. J. Shaw and R. D. Handy. 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) : Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 82 : 94-109.
- Spitalsky, Z., D. Tasis, K. Papagelis and C. Galiotis. 2010. Carbon nanotube – polymer composites : Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Prog Polym Sci* 35 : 357-401.
- Ursini, C. L., D. Cavallo, A. M. Freseagna, A. Ciervo, R. Maiello, G. Buresti, S. Casciardi, F. Tombolini, S. Bellucci and S. Iavicoli. 2012. Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicol in Vitro* 26 : 831-840.
- Vignardi, C. P., F. M. Hasue, P. V. Sartório, C. M. Cardoso, A. S. D. Machado, M. J. A. C. R. Passos, T. C. A. Santos, J. M. Nucci, T. L. R. Hewer, I.-S. Watanabe, V. Gomes and N. V. Phan. 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat Toxicol* 158 : 218-229.
- Vincent-Hubert, F., M. Revel and J. Garric. 2012. DNA strand breaks detected in embryos of the adult snails, *Potamopyrgus antipodarum*, and in neonates exposed to genotoxic chemicals. *Aquatic Toxicology* 122 – 123 : 1-8.
- Ward, J.E and S.E Shumway. 2004. Separating the grain from the chaff : particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol* 300 : 83-130.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La question du potentiel toxique des NM est devenue cruciale ces dernières années. En effet, les NM, y compris les NTC, sont de plus en plus utilisés dans divers produits de consommation et le nombre d'applications envisagées notamment en médecine et pour le traitement de l'eau laisse penser que leur dissémination augmentera dans le futur. Divers programmes (Nanosafety en Europe) et organismes gouvernementaux (Environmental Protection Agency aux États-Unis) s'intéressent à l'établissement d'encadrement pour leur utilisation et évaluent les bénéfices risques des NM (EPA, 2010; Savolainen *et al.*, 2013). L'étude de leurs effets toxiques et mécanismes d'action est donc un élément essentiel pour aider à la prise de décision et à l'encadrement législatif. L'ensemble de ce travail avait pour objet de mettre en évidence les effets écotoxiques des SWCNT, ainsi que l'influence de plusieurs facteurs abiotiques, à différentes échelles biologiques pour mieux comprendre les effets d'une production massive de ces NTC. Ce chapitre présente l'analyse générale des effets observés ainsi que leur implication pour l'évaluation des risques.

1. LA TOXICITÉ DIRECTE DES SWCNT BRUTS

Une partie importante du projet a consisté à évaluer la toxicité directe des NTC bruts au niveau de l'individu chez un organisme benthique (l'amphipode *H. Azteca*, article 1), plus susceptible d'être en contact avec les nanotubes que les organismes pélagiques. En effet, la structure hydrophobe des NTC conduit à leur sédimentation en milieu aqueux. Par ailleurs, à cause de cette propriété, les NTC ont été qualifiés au début de leur utilisation de NM peu écotoxiques, car ils auraient tendance à s'accumuler au fond des cours d'eau (Chen *et al.*, 2010). Moins d'études se sont alors intéressées à leur toxicité. Néanmoins, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'impact écotoxicique des SWCNT, malgré leur sédimentation, chez *H. Azteca* mais aussi chez les deux autres organismes étudiés par la suite (la daphnie *D. magna* dans l'article 2 et la moule *E. complanata* dans l'article 3) et à plusieurs échelles biologiques. Par ailleurs, il nous a été possible d'observer des effets toxiques des formes agglomérées de NTC et de les attribuer aux nanotubes plutôt qu'aux impuretés métalliques contrairement à de précédentes études (Cheng *et al.*, 2007; Mwangi *et al.*, 2012).

• L'état d'agglomération

Les NTC bruts ont tendance à sédimenter, à s'agglomérer et à s'accumuler au fond des cours d'eau, ce qui les rendrait moins toxiques que d'autres substances hydrosolubles telles que les métaux (Desboeufs *et al.*, 2005; Mukwaturi *et al.*, 2015). Néanmoins, dans notre étude, nous avons pu observer que les formes agglomérées pouvaient interagir avec les organismes benthiques (*H. azteca* et *E. complanata*) et pélagiques (*D. magna*).

Dans toutes nos expositions, les SWCNT ont formé de larges agglomérats/agrégats (de 200 à 5 000 nm) capables d'interagir avec les organismes exposés. En effet, des photographies des hyalèles, des daphnies et des moules ont permis de confirmer la présence des nanotubes à l'intérieur des organismes principalement au niveau du tube digestif (excepté pour la moule). Ainsi, au niveau individuel les SWCNT ont induit une diminution de la survie et de la croissance (articles 1 et 2) qui d'après nos observations proviendrait de l'obstruction du tube digestif qui pourrait empêcher ou diminuer la prise alimentaire des organismes. Dans le cas des daphnies (article 2), les effets pourraient également intervenir par l'immobilisation des individus et possiblement par le blocage de la mue comme cela a déjà été observé chez des daphnies exposées aux NP TiO₂ (Dabrunz *et al.*, 2011).

Il est important de noter que les SWCNT étudiés ont montré des effets toxiques à des concentrations supérieures aux concentrations estimées dans l'environnement. Ainsi, ces résultats nous ont permis d'évaluer les effets écotoxiques potentiels des SWCNT, mais ne s'inscrivent pas dans une évaluation directe des effets en condition environnementale (l'ensemble des concentrations toxiques étudiées dans ce travail est résumé dans le Tableau 1). Ainsi, chez *H. azteca*. Des effets directs (SWCNT seuls) ont été observés dès 10 mg/L en absence de sédiments et dès 320 mg/L en présence de sédiments. Chez *D. magna*, un effet direct des SWCNT a été observé dès 2 mg/L mais aussi indirect (en présence de Cd) à 0,5 et 0,1 mg/L. Au niveau cellulaire et moléculaire des effets directs et indirects ont été mesurés chez les moules *E. complanata* exposées aux SWCNT bruts ou purifiés.

Niveau	Organisme	Concentrations toxiques	
		Effets DIRECTS	Effets INDIRECTS
Individuel	<i>H. azteca</i>	(-) sédiments : 10 mg/L (+) sédiments : 320 mg/L	-
	<i>D. magna</i>	SWCNT : 2 mg/L	SWCNT : 0,5-1 mg/L
Cellulaire	<i>E. complanata</i>	500 µg/L	Pas d'effet
Moléculaire	<i>E. complanata</i>	500 - 1000 µg/L	500 µg/L

Tableau 1. Résumé des concentrations toxiques des SWCNT bruts et/ou purifiés chez *H. azteca*, *D. magna* et *E. complanata*.

• La contribution des impuretés métalliques dissoutes

De précédentes études réalisées sur les NTC ont attribué l'origine de la toxicité observée aux métaux catalyseurs, nommés impuretés métalliques, introduits pendant la fabrication des nanotubes et solubilisés dans le milieu d'exposition après dispersion des NTC (Cheng *et al.*, 2007). En effet, la fabrication des NTC fait intervenir divers métaux (le plus souvent le fer, le cobalt et le nickel) et la dispersion des nanotubes par la technique de sonication, qui est la méthode la plus efficace et la plus utilisée pour permettre la mise en suspension des nanotubes, induit une dispersion de ces métaux dans la solution. Plusieurs auteurs recommandent donc de mesurer la présence des métaux solubilisés dans le milieu ou bien de l'évaluer de manière indirecte en mesurant l'effet d'une solution de NTC débarrassée des nanotubes par filtration (Petersen *et al.*, 2014). Dans notre étude, les expositions des filtrats de SWCNT n'ont révélé aucune toxicité chez les organismes exposés ce qui indique que les effets mesurés étaient dus aux SWCNT, ces derniers pouvant par ailleurs toujours contenir des impuretés.

Après avoir étudié la toxicité directe des SWCNT au niveau de l'individu, nous avons déterminé de façon préliminaire les effets directs et indirects au niveau de la cellule et de la molécule d'ADN de SWCNT bruts et purifiés.

2. L'UTILISATION DES BIOMARQUEURS

L'utilisation des biomarqueurs a très souvent permis d'évaluer les réponses biologiques des organismes à divers contaminants (Binelli *et al.*, 2007; Wen-Hong *et al.*, 2009). Cet outil est de plus en plus présent dans les études de nanotoxicologie, car il permet d'identifier les effets sous-létaux des NM. De plus, étant donné que la concentration en NM est insuffisante pour lier les effets et qu'il n'existe pas encore de méthode standardisée pour mesurer les NTC en solution, la mesure de paramètres physiologiques, immunitaires ou encore du stress oxydant, représente un outil sensible pour évaluer les effets toxiques et les mécanismes d'action des NM pour les organismes aquatiques (Anisimova *et al.*, 2015; Canesi *et al.*, 2012; Ringwood *et al.*, 2009). Ainsi, la troisième partie de notre étude a consisté à évaluer les effets sous létaux des SWCNT bruts et purifiés, chez la moule d'eau douce, *E. complanta*, à l'aide de différents paramètres cellulaires et moléculaires (article 3). Des travaux préliminaires ont été réalisés et une différence au niveau des dommages à l'ADN a pu être observée entre les organismes témoins et ceux exposés aux SWCNT (voir Annexe I). Ainsi, une augmentation significative du taux de cassure au niveau des hémocytes des moules exposés aux SWCNT bruts ou purifiés à 1 000 µg/L a été observée. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude des effets génotoxiques des SWCNTs au niveau de différents types cellulaires et à l'aide d'exposition plus longue.

De précédentes études ont également mis en évidence l'activation du système immunitaire par les NTC, ce qui a d'ailleurs stimulé l'élaboration d'applications biomédicales telles que la vectorisation de molécules thérapeutiques pour la vaccination (Gottardi *et al.*, 2013). Ainsi, l'interaction des NTC avec le système immunitaire des organismes aquatiques est très intéressante à évaluer ce qui n'a que peu été fait. Notre étude préliminaire n'a révélé ici aucune modification de l'activité phagocytaire ou de la COX entre les organismes témoins et ceux exposés aux SWCNT bruts ou purifiés. Malgré tout, d'autres paramètres et d'autres conditions d'exposition mériteraient d'être testés afin d'établir un diagnostic plus précis des effets potentiels de ces NM sur le système immunitaire des mollusques bivalves.

3. INFLUENCE DES PARAMÈTRES ABIOTIQUES

Comme beaucoup de contaminants traditionnels (les métaux ou les HAP), nous avons pu observer que la toxicité des SWCNT augmentait avec la durée d'exposition des organismes.

Nos résultats ont également mis en évidence l'influence de la présence de sédiments ainsi que l'impact de la co-exposition avec un métal toxique, le Cd, sur la toxicité des NTC.

• Influence des sédiments

Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'influence de la présence de sédiment sur la toxicité des SWCNT. En effet, la plupart du temps les études d'écotoxicité utilisent des expositions à travers l'eau d'exposition ou bien en mélangeant les NM avec un sédiment (naturel ou artificiel). Dans notre étude nous avons choisi d'évaluer la toxicité de SWCNT exposée à travers l'eau, mais à la surface de sédiments étant donné la tendance à la sédimentation des NTC et les possibilités de remise en suspension par la matière organique. Ainsi, nous avons observé que la présence de sédiment était capable de modifier la toxicité des SWCNT, certainement à cause de la présence de matière organique qui est connue pour adsorber les contaminants organiques (Huang *et al.*, 2003). Il est important de préciser que dans le milieu naturel, le sédiment pourra également agir comme une source de contamination de NTC pour les organismes benthiques mais aussi pélagiques de par la remise en suspension des nanotubes via le dragage ou la bioturbation comme cela a déjà été observé avec des métaux ou d'autres contaminants organiques (Eggleton *et al.*, 2004).

• Influence des contaminants présents

Actuellement, une des préoccupations croissantes est l'impact indirect des NM via les interactions avec divers contaminants présents dans le milieu aquatique. Le Cd fait partie des métaux toxiques dont la présence est très contrôlée et l'utilisation des NTC pour leur élimination est étudiée de près (Tan *et al.*, 2012).

Notre étude a permis de mettre en évidence l'interaction des SWCNT avec le Cd malgré le niveau faible d'adsorption mesurée. Au niveau individuel, chez la daphnie *D. magna*, la présence de SWCNT a induit une diminution de la CL50 d'un facteur 2 (article 2). Les SWCNT ont donc augmenté la toxicité du Cd pour les organismes exposés. Notre hypothèse est que les effets observés sont causés par l'absorption du Cd libre et adsorbé à la surface des SWCNT qui

seront libérés à l'intérieur des organismes. En effet, les conditions physiques et chimiques de l'appareil digestif de *D. magna* (Hasler, 1935; Weltens *et al.*, 2000) soutiennent l'hypothèse que le Cd serait ensuite désorbé dans l'intestin grâce aux conditions enzymatiques en faveur du processus de désorption (Lampert, 1987). Il ne nous a malheureusement pas été possible de doser le Cd au niveau des organismes, ce qui nous aurait permis de confirmer notre hypothèse. Ce type d'effet a déjà été observé notamment chez le poisson tilapia (*Oreochromis niloticus*) où une augmentation de la toxicité du Pb en présence de MWCNT purifié a été mesuré (Martinez *et al.*, 2013).

De plus, au niveau moléculaire, un effet potentialisateur entre les SWCNT bruts ou purifiés et le Cd a été observé au niveau du taux de cassures de l'ADN mesuré à l'aide du test comète. Le même effet potentialisateur a été mis en évidence chez une moule marine exposée à des métaux et des SWCNT bruts maintenus en suspension avec de la matière organique (Al-Shaeri *et al.*, 2013). D'après la littérature, c'est la première étude qui présente un tel effet des SWCNT bruts et purifiés chez une moule d'eau douce et sans l'utilisation de dispersant.

Il devient de plus en plus important de mesurer la présence d'autres contaminants et d'évaluer les effets d'interaction sur les organismes exposés. Il serait donc pertinent d'évaluer les effets de co-exposition avec d'autres contaminants (HAP, pesticides, autres métaux) et de mesurer la quantité accumulée à l'intérieur des organismes tout en évaluant le taux d'adsorption entre les NTC et le contaminant.

4. IMPLICATION DES RÉSULTATS POUR L'ÉVALUATION DE RISQUE

L'ensemble de notre étude s'inscrit dans une perspective d'évaluation des risques des NTC. Cette démarche consiste à évaluer le danger et l'exposition à un agent biologique, chimique etc. Alors que le danger est défini comme la capacité d'une substance à altérer ou à détruire les fonctions vitales de l'organisme, l'exposition correspond au contact de la substance avec l'organisme qui peut se produire selon différentes voies d'expositions. Le risque peut ensuite être défini comme la probabilité qu'un ou plusieurs effets néfastes pour la santé d'un individu ou d'une population surviennent à la suite d'une exposition à un « agresseur ». L'évaluation des

risques associés aux NM doit donc prendre en compte l'exposition ainsi que les effets toxiques mesurés (Figure 1).

Ainsi, nos résultats s'inscrivent dans l'évaluation de ces effets toxiques. Cette étude nous a permis d'observer que la toxicité des NTC est complexe et que leur caractérisation doit être effectuée, notamment l'état d'agglomération. Comme le montre notre étude, cela pourra permettre une meilleure prévision des effets potentiels des NM manufacturés.

Néanmoins, l'analyse de risques pour les NM diffère par rapport aux autres substances chimiques. La multiplicité des particules d'un même type en raison des caractéristiques physiques et chimiques qui peuvent grandement varier, fait que d'autres techniques doivent être utilisées pour l'évaluation de risque tel que de la modélisation du devenir des NM ou de leurs effets (Tiede *et al.*, 2009). Un autre aspect important à prendre en compte est l'analyse du cycle de vie des NM.

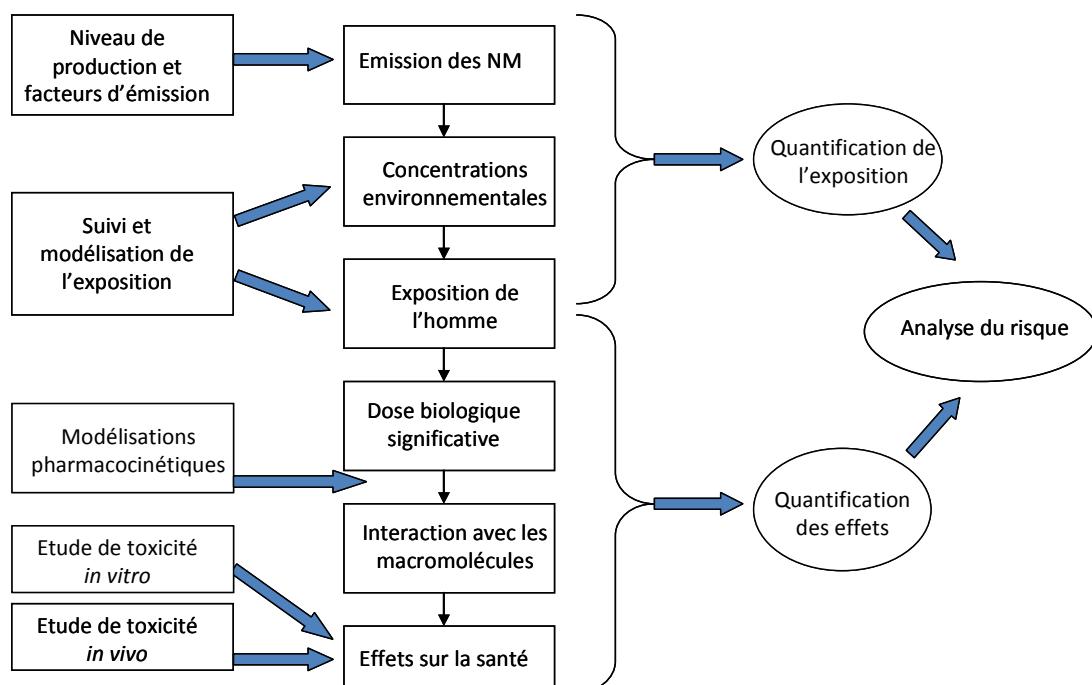


Figure 1. L'analyse de risque des nanomatériaux (modifié de Kandlikar *et al.*, 2007)

- **L'analyse de cycle de vie**

L'analyse de cycle de vie (ACV) est un cadre global qui permet de quantifier les impacts d'un système ou d'un produit sur la santé humaine et l'environnement au niveau de son cycle de vie complet. Pour les produits ou substances, c'est l'acquisition des ressources (pour la production), leur distribution, production, utilisation et fin de vie qui sont évalués. À l'heure actuelle, il existe très peu d'études d'ACV sur les NM. Il manque encore des scénarios d'expositions plus réalistes et des questions persistent sur le comportement, le transport et le devenir des NM dans le milieu naturel (Jackson *et al.*, 2013b; Petersen, 2015). En effet, les NTC peuvent être solubilisés et subir des modifications physiques et chimiques par l'action de processus d'oxydation. Comme nos résultats l'indiquent, la caractérisation des NTC doit être effectuée mais des techniques nous permettant d'identifier et de quantifier les nanotubes ainsi que leurs produits de dégradation restent encore à élaborer.

5. RECOMMANDATIONS POUR LES FUTURES ÉTUDES

Actuellement, certains auteurs se posent la question de savoir si les NTC présentent un risque ou bien seraient un formidable outil pour les applications environnementales, notamment avec la décontamination de l'eau. Nos résultats sur l'interaction des NTC avec le Cd mettent en évidence l'importance de considérer les effets toxiques indirects des NM carbonés. Ainsi, il nous paraît essentiel de poursuivre les études sur la toxicité des NTC en caractérisant les échantillons (le taux d'agglomération jouant un rôle important) et en fournissant également des informations précises sur le milieu utilisé. Par ailleurs, la poursuite des études de toxicité devrait être associée au développement de l'analyse des cycles de vie ainsi que de la modélisation (en prenant en compte les voies de transfert des NM, leur transport, leur devenir, l'exposition, les effets toxiques, etc.). Le développement de techniques de quantification des NTC dans l'environnement et les matrices complexes sont également des points essentiels à étudier. De plus, on connaît également peu de choses sur les facteurs qui influencent le devenir des NTC dans l'environnement. Ainsi, il serait pertinent d'étudier l'effet des UV ou encore de la température sur les NTC et d'évaluer ensuite la toxicité des éventuels produits de dégradation. Toutes ces études nous permettront à terme de mieux évaluer les risques associés aux NTC dans l'environnement.

RÉFÉRENCES

- Aguilar ZP (2013) Chapter 7 - Nanopharmacology. *Nanomaterials for Medical Applications*, Aguilar ZP (Édit.) Elsevier. p 293-360.
- Åkesson A, Lundh T, Vahter M, Bjellerup P, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Strömberg U & Skerfving S (2005) Tubular and glomerular kidney effects in swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environmental Health Perspectives* 113(11):1627-1631.
- Al-Shaeri M, Ahmed D, McCluskey F, Turner G, Paterson L, Dyrynda EA & Hartl MGJ (2013) Potentiating toxicological interaction of single-walled carbon nanotubes with dissolved metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(12):2701-2710.
- Al-Subiai SN, Arlt VM, Frickers PE, Readman JW, Stolpe B, Lead JR, Moody AJ & Jha AN (2012) Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: An integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 745(1-2):92-103.
- Ali D, Ahmed M, Alarifi S & Ali H (2014) Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environmental Toxicology* 30(6):674-682.
- Amiard J & Amiard-Triquet C (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris: Lavoisier.
- Anisimova AA, Chaika VV, Kuznetsov VL & Golokhvast KS (2015) Study of the influence of multiwalled carbon nanotubes (12–14 nm) on the main target tissues of the bivalve *Modiolus modiolus*. *Nanotechnol Russia* 10(3-4):278-287.
- Anses (2014) Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : enjeux et mise à jour des connaissances. *Rapport d'expertise collective ANSES/PR1/9/01-06*.
- Attar E & Maly E (1982) Acute toxicity of cadmium, zinc, and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11(3):291-296.
- Auffret M (1988) Bivalve hemocyte morphology. *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs* (W. S. Fisher, ed.). American Fisheries Society Special Publication 18:169-177.
- Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C & Moraga D (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 54(3-5):585-589.
- Ban E, Yoo YS & Song EJ (2015) Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis. *Talanta* 141(0):15-20.
- 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*. *Aquatic Toxicology* 132–133(0):9-18.
- Bastos M & Camps I (2014) First-principles calculations of nickel, cadmium, and lead adsorption on a single-walled (10,0) carbon nanotube. *Journal of Molecular Modeling* 20(2):1-8.
- Baun A, Hartmann NB, Grieger K & Kusk KO (2008a) Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* 17(5):387-395.

- Baun A, Sørensen SN, Rasmussen RF, Hartmann NB & Koch CB (2008b) Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Toxicology* 86(3):379-387.
- Beckmann N, Morse MP & Moore CM (1992) Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59(2):124-132.
- Binelli A, Riva C & Provini A (2007) Biomarkers in Zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 12(4):349-368.
- Bodar CWM, van Der Sluis I, Voogt PA & Zandee DI (1988) Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 90(2):341-346.
- Borgmann U, Bennie D, Ball A & Palabrica V (2007) Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere* 66(7):1278-1283.
- Borgmann U & Munawar M (1989) A new standardized sediment bioassay protocol using the amphipod *Hyalella azteca* (Saussure). *Hydrobiol* 188-189(1):425-431.
- Bouchard B, Gagné F, Fortier M & Fournier M (2009) An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 150(2):132-140.
- Bouraoui Z, Banni M, Ghedira J, Clerandau C, Guerbej H, Narbonne JF & Boussetta H (2008) Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol Biochem* 34(3):201-207.
- Bradley MO, Taylor VI, Armstrong MJ & Galloway SM (1987) Relationships among cytotoxicity, lysosomal breakdown, chromosome aberrations, and DNA double-strand breaks. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 189(1):69-79.
- Buffet P-E (2012) *L'évaluation du risque environnemental des nanoparticules métalliques : biodisponibilité et risque potentiel pour deux espèces clés des écosystèmes estuariens*. Thèse de doctorat en pharmacie (Université de Nantes, France).
- Buffet P-E, Pan J-F, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Gaudin P, Risso de Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E & Mouneyrac C (2013) Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89(0):117-124.
- 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(0):16-21.
- Canesi L, Fabbri R, Gallo G, Vallotto D, Marcomini A & Pojana G (2010) Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic toxicology* 100:168-177.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M & Pruzzo C (2002a) Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57(6):469-476.

- Canesi L, Scarpato A, Betti M, Ciacci C, Pruzzo C & Gallo G (2002b) Bacterial killing by mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research* 54(3–5):547-551.
- Cassell AM, Raymakers JA, Kong J & Dai H (1999) Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* 103(31):6484-6492.
- Chapman PM (1995) Ecotoxicology and pollution—Key issues. *Marine Pollution Bulletin* 31(4–12):167-177.
- Charissou A, Jourdain M, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Férand J & Bispo A (2006) Démarche optimale de sélection de batterie de bioessais pour l'évaluation écotoxicologique des milieux complexes. Synthèse bibliographique. *Techniques sciences méthodes* 5:101-110.
- Chen KL, Smith B, Ball WP & Fairbrother DH (2010) Assessing the colloidal properties of engineered nanoparticles in water: case studies from fullerene C60 nanoparticles and carbon nanotubes. *Environmental chemistry* 7:10-27.
- Chen M-y, Yang H-s, Delaporte M, Zhao S-j & Xing K (2007) Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 345(1):52-60.
- Cheng J, Flahaut E & Cheng SH (2007) Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(4):708-716.
- Cheng W-W, Lin Z-Q, Ceng Q, Wei B-F, Fan X-J, Zhang H-S, Zhang W, Yang H-L, Liu H-L, Yan J, Tian L, Lin B-C, Ding S-M & Xi Z-G (2012) Single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress in rat aortic endothelial cells. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22(4):268-276.
- Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M & Hofmann T (2008) Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* 17(5):326-343.
- Chu F-L & La Peyre JF (1989) Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* 54(2):224-232.
- Clancy S (2008) DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1):103.
- CNT-Report (2013) Carbon nanotubes (CNTs) market by type (SWCNTS & MWCNTS), application (electronics & semiconductors, chemical & polymers, batteries & capacitors, energy, medical, composites, & aerospace & defense) & geography - Global trends & forecasts To 2018
- Cole MT, Mann M, Teo KBK & Milne WI (2015) Chapter 5 - Engineered carbon nanotube field emission devices. *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing (Second Edition)*, Ahmed W & Jackson MJ (Edit.) William Andrew Publishing, Boston. p 125-186.
- Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, Horn T, Ahle D, Detmer J, Shen L-P, Kolberg J, Bushnell S, Urdea MS & Ho DD (1997) A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Research* 25(15):2979-2984.

- Colomer JF, Piedigrosso P, Willems I, Journet C, Bernier P, Van Tendeloo G, Fonseca A & B.Nagy J (1998) Purification of catalytically produced multi-wall nanotubes. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 94(24):3753-3758.
- Cooper EL (2003) Comparative immunology. *Current Pharmaceutical Design* 9(2):119-131.
- Crane M, Handy R, Garrod J & Owen R (2008) Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17(5):421-437.
- Dabrunz A, Duester L, Prasse C, Seitz F, Rosenfeldt R, Schilde C, Schaumann GE & Schulz R (2011) Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE* 6(5):e20112.
- Daer S, Kharraz J, Giwa A & Hasan SW (2015) Recent applications of nanomaterials in water desalination: A critical review and future opportunities. *Desalination* 367(0):37-48.
- Depledge MH (1994) The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates. *Fossi, M.C., Leonzio, C., Eds. Lewis Publishers*, p. 271-296.
- Desboeufs KV, Sofikitis A, Losno R, Colin JL & Ausset P (2005) Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere* 58(2):195-203.
- Di Z-C, Ding J, Peng X-J, Li Y-H, Luan Z-K & Liang J (2006) Chromium adsorption by aligned carbon nanotubes supported ceria nanoparticles. *Chemosphere* 62(5):861-865.
- Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C & Choi K-S (2015) The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 42(1):91-97.
- Downing JA, Amyot J-P, Perusse M & Rochon Y (1989) Visceral sex, hermaphroditism, and protandry in a population of the freshwater bivalve *Elliptio complanata*. *Journal of the North American Benthological Society* 8(1):92-99.
- Dresselhaus MS, Dresselhaus G & Jorio A (2004) Unusual properties and structure of carbon nanotubes. in *Annual Review of Material Research*, p 247-278.
- Drouillard KG, Jezdic I, O'Rourke SM, Gewurtz SB, Raeside AA, Leadley TA, Drca P & Douglas Haffner G (2013) Spatial and temporal variability of PCBs in Detroit River water assessed using a long term biomonitoring program. *Chemosphere* 90(1):95-102.
- Dujardin E, Ebbesen TW, Krishnan A & Treacy MMJ (1998) Purification of single-shell nanotubes. *Advanced Materials* 10(8):611-613.
- Edgington AJ, Petersen EJ, Herzing AA, Podila R, Rao A & Klaine SJ (2014) Microscopic investigation of single-wall carbon nanotube uptake by *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 8(SUPPL. 1):2-10.
- Edgington AJ, Roberts AP, Taylor LM, Alloy MM, Reppert J, Rao AM, Mao J & Klaine SJ (2010) The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(11):2511-2518.
- Eggleton J & Thomas KV (2004) A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30(7):973-980.

- Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M & Nakanishi J (2012) Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of *in vitro* and *in vivo* assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63(2):188-195.
- Environment-Canada (1990) Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Daphnia spp. Report EPS 1/RM/11. *Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada*: 55.
- EPA (2010) Environmental protection agency. <http://www2.epa.gov/chemical-research/research-evaluating-nanomaterials-chemical-safety> [visité en mai 2015].
- EPA (2014) Environmental Protection Agency. available at <http://www.epa.gov/iris/subst/0141.htm> [visité en mai 2015].
- Falfushynska H, Gnatyshyna L, Yurchak I, Sokolova I & Stolar 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(0):82-93.
- Farcy E, Gagné F, Martel L, Fortier M, Trépanier S, Brousseau P & Fournier M (2011) Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environmental Research* 111(8):1096-1106.
- Fasano M, Bozorg Bigdeli M, Vaziri Sereshk MR, Chiavazzo E & Asinari P (2015) Thermal transmittance of carbon nanotube networks: Guidelines for novel thermal storage systems and polymeric material of thermal interest. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41(0):1028-1036.
- Ferguson PL, Chandler GT, Templeton RC, Demarco A, Scrivens WA & Englehart BA (2008) Influence of sediment - Amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. *Environmental Science and Technology* 42(10):3879-3885.
- Foo KY & Hameed BH (2010) Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal* 156(1):2-10.
- Fraczek A, Menaszek E, Palusziewicz C & Blazewicz M (2008) Comparative *in vivo* biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia* 4(6):1593-1602.
- Frenzilli G, Nigro M & Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(1):80-92.
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H & Renault T (2006a) Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish and Shellfish Immunology* 20(4):536-547.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T & Renault T (2006b) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22(1):1-14.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H & Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 16(4):501-512.
- Gagné F, Auclair J, Peyrot C & Wilkinson K (2015) The influence of zinc chloride and nanoparticles on air-time survival in freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* (0).

- Gagné F, Fournier M & Blaise C (2004) Serotonergic effects of municipal effluents: Induced spawning activity in freshwater mussels. *Fresenius Environmental Bulletin* 13:1099–1103.
- Gewurtz SB, Drouillard KG, Lazar R & Haffner GD (2002) Quantitative Biomonitoring of PAHs Using the Barnes Mussel (*Elliptio complanata*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43(4):0497-0504.
- Ghiazz M, Vietti G & Fenoglio I (2014) 8 - Carbon nanotubes: properties, applications, and toxicity. *Health and Environmental Safety of Nanomaterials*, Njuguna J, Pielichowski K & Zhu H (Édit.) Woodhead Publishing. p 147-174.
- Gillis PL, Higgins SK & Jorge MB (2014) Evidence of oxidative stress in wild freshwater mussels (*Lasimigona costata*) exposed to urban-derived contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102(0):62-69.
- Gohardani O, Elola MC & Elizetxea C (2014) Potential and prospective implementation of carbon nanotubes on next generation aircraft and space vehicles: A review of current and expected applications in aerospace sciences. *Progress in Aerospace Sciences* 70(0):42-68.
- Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A & Bebianno MJ (2013) Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 84(0):51-59.
- Gómez-Mendikute A & Cajaraville MP (2003) Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro* 17(5–6):539-546.
- Gottardi R & Douradinha B (2013) Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and cancer. *Journal of nanobiotechnology* 11(30).
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW & Nowack B (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology* 43(24):9216-9222.
- Gottschalk F, Sun T & Nowack B (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* 181(0):287-300.
- Green MHL, Lowe JE, Delaney CA & Green IC (1996) Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods in Enzymology*, Lester P (Édit.) Academic Press, Vol Volume 269. p 243-266.
- Guo T, Nikolaev P, Tess A, Colbert D & Smalley R (1995) Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters* 243:49-54.
- Hagino N (1957) About investigations on itai-itai disease. *Journal of the American Medical Association*. 7 [in Japanese].
- Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IRd, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ & Mahmoudi M (2012) Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 30(10):499-511.
- Handy RD, Cornelis G, Fernandes T, Tsyusko O, Decho A, Sabo-Attwood T, Metcalfe C, Steevens JA, Klaine SJ, Koelmans AA & Horne N (2012) Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):15-31.

- Hare L (1992) Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 22(5-6):327-369.
- Hasler AD (1935) The physiology of digestion of plankton crustacea: I. Some digestive enzymes of daphnia. *The Biological Bulletin* 68(2):207-214.
- Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835):366-374.
- Hook SE & Lee RF (2004) Interactive effects of UV, benzo[a]pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Paleomonetes pugio*. *Marine environmental research* 58:735-739.
- Hu J, Wang D & Wang J (2012) Toxicity of lead on *Ceriodaphnia dubia* in the presence of nano-CeO₂ and nano-TiO₂. *Chemosphere* 89(5):536-541.
- Huang W, Peng Pa, Yu Z & Fu J (2003) Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry* 18(7):955-972.
- Hyung H, Fortner JD, Hughes JB & Kim J-H (2007) Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environmental Science and Technology* 41(1):179-184.
- Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354(6348):56-58.
- Innovative-Report (2011) Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphene and nanodiamonds: A global technology survey and market analysis. *Innovative Research and Products* http://www.innoresearch.net/report_summary.aspx?id=77&pg=531&rcd=ET113&pd=2/1/2011.
- Ishaque AB, Johnson L, Gerald T, Boucaud D, Okoh J & Tchounwou PB (2006) Assessment of individual and combined toxicities of four non-essential metals (As, Cd, Hg and Pb) in the microtox assay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3(1):118-120.
- ISO (2011) Nanostructured materials. . ISO/TS 80004-4 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 4.
- ISO (2012) Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. ISO/TR 13014. Prepared by Technical Committee ISO/TC 229, Nanotechnologies.
- Ivanina AV, Hawkins C & Sokolova IM (2014a) Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish and Shellfish Immunology* 37(2):299-312.
- Ivanina AV, Hawkins C & Sokolova IM (2014b) Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish & Shellfish Immunology* 37(2):299-312.
- Jackson P, Jacobsen N, Baun A, Birkedal R, Kühnel D, Jensen K, Vogel U & Wallin H (2013a) Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal* 7(1):154.
- Jackson P, Jacobsen NR, Baun A, Birkedal R, Kühnel D, Jensen KA, Vogel U & Wallin H (2013b) Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal* 7(1):154.

- Kádár E, Salánki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR & White KN (2001) Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology* 55(3–4):137-148.
- Kaloyianni M, Dailianis S, Chrisikopoulou E, Zannou A, Koutsogiannaki S, Alamdar DH, Koliakos G & Dimitriadis VK (2009) Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149(4):631-639.
- Kennedy AJ, Gunter JC, Chappell MA, Goss JD, Hull MS, Kirgan RA & Steevens JA (2009) Influence of nanotube preparation in aquatic bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9):1930-1938.
- Kim KS, Kingston CT, Ruth D, Barnes M & Simard B (2014) Synthesis of high quality single-walled carbon nanotubes with purity enhancement and diameter control by liquid precursor Ar-H₂ plasma spraying. *Chemical Engineering Journal* 250(0):331-341.
- Klaper R, Arndt D, Setyowati K, Chen J & Goetz F (2010) Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 100(2):211-217.
- Koutsogiannaki S, Franzellitti S, Kalogiannis S, Fabbri E, Dimitriadis VK & Kaloyianni M (2015) Effects of cadmium and 17 β -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* redox status. Prooxidant-antioxidant balance (PAB) as a novel approach in biomonitoring of marine environments. *Marine Environmental Research* 103(0):80-88.
- Kruss S, Hilmer AJ, Zhang J, Reuel NF, Mu B & Strano MS (2013) Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(15):1933-1950.
- Lacaze E, Pédelucq J, Fortier M, Brousseau P, Auffret M, Budzinski H & Fournier M (2015) Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. *Environmental Pollution* 202(0):177-186.
- Lampert W (1987) Feeding and nutrition in Daphnia. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol* 45:143–192.
- Latt SA, Schreck RR, Loveday KS & Shuler CF (1978) In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange. *Pharmacological Reviews* 30(4):501-535.
- Lead JR & Wilkinson KJ (2007) Environmental colloids and particles: Current knowledge and future developments. *Environmental Colloids and Particles*, John Wiley & Sons, Ltd, 10.1002/9780470024539.ch1. p 1-15.
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Charissou A-M & Vasseur P (2005) DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers* 10(1):41-57.
- Leroy T, Van Hummelen P, Anard A, Castelain P, Kirsch-Volders M, Lauwerys R & Lison D (1996) Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: Alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 47(5):409-422.
- Liang X (2014) Chapter 19 - Transition from tubes to sheets—A comparison of the properties and applications of carbon nanotubes and graphene. *Nanotube Superfiber Materials*, Yin MJSNS (Édit.) William Andrew Publishing, Boston. p 519-568.

- Liber K, Doig LE & White-Sobey SL (2011) Toxicity of uranium, molybdenum, nickel, and arsenic to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus* in water-only and spiked-sediment toxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5):1171-1179.
- Lin Y, Taylor S, Li H, Fernando KAS, Qu L, Wang W, Gu L, Zhou B & Sun Y-P (2004) Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry* 14(4):527-541.
- Liu J, Rinzler A, Dai H, Hafner J, Bradley R, Boul P, Lu A, Iverson T, Shelimov K, Huffman C, Rodriguez-Macias F, Shon Y, Lee T, Colbert D & Smalley R (1998) Fullerene pipes. *Science* 280(5367):1253-1256.
- Liu W-W, Chai S-P, Mohamed AR & Hashim U (2014) Synthesis and characterization of graphene and carbon nanotubes: A review on the past and recent developments. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(4):1171-1185.
- Liu X-M, Huang Zd, Oh Sw, Zhang B, Ma P-C, Yuen MMF & Kim J-K (2012) Carbon nanotube (CNT)-based composites as electrode material for rechargeable Li-ion batteries: A review. *Composites Science and Technology* 72(2):121-144.
- Liu X, Wang M, Zhang S & Pan B (2013) Application potential of carbon nanotubes in water treatment: A review. *Journal of Environmental Science* 25(7):1263-1280.
- Long SM, Ryder KJ & Holdway DA (2003) The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis* planulatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55(3):261-270.
- Lövestam G, Rauscher H, Roebben G, Sokull Klüttgen B, Gibson N, Putaud J-P & Stamm H (2010) Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. *Reference Report by the Joint Research Centre of the European Commission EUR 24403, Luxembourg*.
- Martinez DST, Alves OL & Barbieri E (2013) Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics: Conference Series* 429(1).
- Mauter MS & Elimelech M (2008) Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environmental Science and Technology* 42(16):5843-5859.
- McHenery JG & Birkbeck TH (1979) Lysozyme of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biology Letters* 1:111-119.
- Mohd Omar F, Abdul Aziz H & Stoll S (2014) Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Science of The Total Environment* 468–469(0):195-201.
- Moon J-M, An KH, Lee YH, Park YS, Bae DJ & Park G-S (2001) High-yield purification process of single walled carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* 105(24):5677-5681.
- Moradi O, Zare K & Yari M (2011) Interaction of some heavy metal ions with single walled carbon nanotube. *International Journal of Nano Dimension* 1(3):203-220.
- Mouchet F, Landois P, Sarremejean E, Bernard G, Puech P, Pinelli E, Flahaut E & Gauthier L (2008) Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 87(2):127-137.
- Mueller NC & Nowack B (2008) Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environmental Science & Technology* 42(12):4447-4453.

- Mukwaturi M & Lin C (2015) Mobilization of heavy metals from urban contaminated soils under water inundation conditions. *Journal of Hazardous Materials* 285(0):445-452.
- Murr LE, Brown DK, Esquivel EV, Ponda TD, Martinez F & Virgen A (2005) Carbon nanotubes and other fullerenes produced from tire powder injected into an electric arc. *Materials Characterization* 55(4–5):371-377.
- Murray AR, Kisin E, Leonard SS, Young SH, Kommineni C, Kagan VE, Castranova V & Shvedova AA (2009) Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 257(3):161-171.
- Mwangi JN, Wang N, Ingersoll CG, Hardesty DK, Brunson EL, Li H & Deng B (2012) Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(8):1823-1830.
- Nacci DE, Cayula S & Jackim E (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35(3–4):197-210.
- Nanotechproject (2011) PEN The Project on Emerging Nanotechnologies - Nanotech-enabled Consumer Products Continue to Rise. <http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/>.
- Nanotechproject (2015) The project on emerging technologies. [Page lu en avril 2015]. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>.
- Naya M, Kobayashi N, Mizuno K, Matsumoto K, Ema M & Nakanishi J (2011) Evaluation of the genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 61(2):192-198.
- Newman P, Minett A, Ellis-Behnke R & Zreiqat H (2013) Carbon nanotubes: Their potential and pitfalls for bone tissue regeneration and engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9(8):1139-1158.
- NNI (2013) Nano.gov, National Nanotechnology Initiative website. United States of America, National Nanotechnology Initiative. Available from: <http://www.nano.gov/about-nni/what/funding> ; [visité en juillet 2014].
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3):192-200.
- Nowack B & Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1):5-22.
- OECD (2008) *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. OECD Publishing,
- Othman MS & Pascoe D (2001) Growth, development and reproduction of *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) in laboratory culture. *Crustaceana* 74(2):171-181.
- Parant M (1998) Xenobiotic metabolism in bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 321(6):485-494.
- Pardeike J, Hommoss A & Müller RH (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 366(1–2):170-184.
- Parks AN, Portis LM, Schierz PA, Washburn KM, Perron MM, Burgess RM, Ho KT, Chandler GT & Ferguson PL (2013) Bioaccumulation and toxicity of single-walled carbon nanotubes to benthic organisms at the base of the marine food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(6):1270-1277.

- Parry HE & Pipe RK (2004) Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 69(4):311-325.
- Pedersen S, Palmqvist A, Thorbek P, Hamer M & Forbes V (2013) Pairing behavior and reproduction in *Hyalella azteca* as sensitive endpoints for detecting long-term consequences of pesticide pulses. *Aquatic Toxicology* 144-145(0):59-65.
- Pennak (1978) Cladocera (water fleas). In Freshwater invertebrates of the United States. John Wiley & Sons, New York.
- Petersen EJ (2015) In Response: Measurement science challenges that complicate the assessment of the potential ecotoxicological risks of carbon nanomaterials-A governmental perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34(5):955-957.
- Petersen EJ, Akkanen J, Kukkonen JVK & Weber WJ (2009) Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 43(8):2969-2975.
- Petersen EJ & Henry TB (2012) Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: Review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):60-72.
- Petersen EJ, Henry TB, Zhao J, MacCuspie RI, Kirschling TL, Dobrovolskaia MA, Hackley V, Xing B & White JC (2014) Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environmental Science and Technology* 48(8):4226-4246.
- Petersen EJ, Huang Q & Weber Jr WJ (2008) Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Health Perspective* 116(4):496-500.
- Petersen EJ, Pinto RA, Mai DJ, Landrum PF & Weber Jr WJ (2011) Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 45(3):1133-1138.
- Peyrot C, Gagnon C, Gagné F, Wilkinson KJ, Turcotte P & Sauvé S (2009) Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(2):246-251.
- Pichardo S, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Sánchez E, Grilo A, Cameán AM & Jos Á (2012) Oxidative stress responses to carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro* 26(5):672-677.
- Pradhan A, Geraldes P, Seena S, Pascoal C & Cássio F (2015) Natural organic matter alters size-dependent effects of nanoCuO on the feeding behaviour of freshwater invertebrate shredders. *Science of The Total Environment* (0).
- Qu G, Bai Y, Zhang Y, Jia Q, Zhang W & Yan B (2009) The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice. *Carbon* 47(8):2060-2069.
- R B, S W, H P, J S & R P (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology* 2(1):67-74.

- R&I (2013) Le 7e Programme-Cadre de Recherche et de Développement Technologique de la Communauté européenne, 2007-2013. Commission européenne, http://ec.europa.eu/research/fp7/index_en.cfm?pg=budget
- Radetić M (2013) Functionalization of textile materials with TiO₂ nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 16(0):62-76.
- Rao GP, Lu C & Su F (2007) Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by carbon nanotubes: A review. *Separation and Purification Technology* 58(1):224-231.
- Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF & Jha AN (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640(1-2):113-122.
- Règlement-(CE) (2013) Règlement (CE) No 1223/2009 du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (refonte). Chapter 13 Volume 027 P. 152 - 302.
- Ren X, Chen C, Nagatsu M & Wang X (2011) Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. *Chemical Engineering Journal* 170(2-3):395-410.
- Renwrantz L (1990) Internal defence system of *Mytilus edulis*. *Studies in Neuroscience, Neurobiology of Mytilus edulis* (G. B. Stefano. ed.) Manchester: Manchester University Press. p. 256-275.
- Revillard JP (2001) Immunologie. 4ème édition, De Boeck Université, Bruxelles.
- Richman LA, Hobson G, Williams DJ & Reiner E (2011) The Niagara river mussel biomonitoring program (*Elliptio complanata*): 1983–2009. *Journal of Great Lakes Research* 37(2):213-225.
- Ringwood AH, Levi-Polyachenko N & Carroll DL (2009) Fullerene exposures with oysters: Embryonic, adult, and cellular responses. *Environmental Science and Technology* 43(18):7136-7141.
- Roberts AP, Mount AS, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S, Ke PC, Rao AM & Klaine SJ (2007) In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 41(8):3025-3029.
- Roco M, Mirkin C & Hersam M (2011) Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. *J Nanopart Res* 13(3):897-919.
- Rodríguez-Yáñez Y, Bahena-Uribe D, Chávez-Munguía B, López-Marure R, González-Monroy S, Cisneros B & Albores A (2015) Commercial single-walled carbon nanotubes effects in fibrinolysis of human umbilical vein endothelial cells. *Toxicology in Vitro* (0).
- Roméo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, Lafaurie M & Girard JP (2000) Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48(2-3):185-194.
- Ruthven DM (1984) Principles of Adsorption and Adsorption Processes. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1984, Chaps. 3, 4, p. 108.
- Saria R, Mouchet F, Perrault A, Flahaut E, Laplanche C, Boutonnet J-C, Pinelli E & Gauthier L (2014) Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107(0):22-29.

- Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senécal L, Goudreau P & Fournier M (2002) Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58(3–4):189-200.
- Savolainen K, Ulrika Backman, Derk Brouwer, Bengt Fadeel, Teresa Fernandes, Thomas Kuhlbusch, Robert Landsiedel, Lynch I & Pykkänen L (2013) Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations. *Finnish Institute of Occupational Health. EDITA, Helsinki.*
- Sellers K, Mackay C., Bergeson L.L, Clough S. R, Hoyt M, Chen J, Henry K, Hamblen J (2008). Nanotechnology and the environment, ed par CRC press, pp 295-297.
- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P & Mahmoudi M (2012) Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews* 41(6):2323-2343.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1):184-191.
- Smith CJ, Shaw BJ & Handy RD (2007) Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 82(2):94-109.
- Smith VJ (2001) Immunology of Invertebrates: Cellular. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Söderhäll K (2010) Invertebrate Immunity. Describes the diversity between different invertebrate animal groups. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Spehar RL, Anderson RL & Fiandt JT (1978) Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution* (1970) 15(3):195-208.
- Spitalsky Z, Tasis D, Papagelis K & Galiotis C (2010) Carbon nanotube–polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progress in Polymer Science* 35(3):357-401.
- Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, von der Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Joner E & Fernandes T (2010) Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment* 408(7):1745-1754.
- Suman TY, Radhika Rajasree SR & Kirubagaran R (2015) Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae chlorella vulgaris through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113(0):23-30.
- Sumathi M, Kalaiselvi K, Palanivel M & Rajaguru P (2001) Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 66(3):407-414.
- Tan C, Tan K, Ong Y, Mohamed A, Zein S & Tan S (2012) Energy and environmental applications of carbon nanotubes. *Environmental Chemistry Letters* 10(3):265-273.
- Teague-EC (2004) Responsible development of nanotechnology National Nanotechnology Initiative Meeting, April 2, 2004. [S.I.] National Nanotechnology Initiative, 29 p. <http://www.nano.gov/html/res/Infocast2004PresentationB.pdf> ; [visité en juin 2015]. *Environmental Science and Technology*.

- Templeton RC, Ferguson PL, Washburn KM, Scrivens WA & Chandler GT (2006) Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environmental Science and Technology* 40(23):7387-7393.
- Tessier L, Vaillancourt G & Pazdernik L (1994) Comparative study of the cadmium and mercury kinetics between the short-lived gastropod *Viviparus georgianus* (Lea) and pelecypod *Elliptio complanata* (Lightfoot), under laboratory conditions. *Environmental Pollution* 85(3):271-282.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC & Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(3):206-221.
- Tiede K, Hassellöv M, Breitbarth E, Chaudhry Q & Boxall ABA (2009) Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1216(3):503-509.
- Tiscar PG & Mosca F (2004) Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications*. 28(1):57-62.
- Tiwari DK, Dasgupta-Schubert N, Villaseñor Cendejas LM, Villegas J, Carreto Montoya L & Borjas García SE (2014) Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience*. 4(5):577-591.
- Tiwari PM, Bawage SS & Singh SR (2015) 13 - Gold nanoparticles and their applications in photomedicine, diagnosis and therapy. *Applications of Nanoscience in Photomedicine*, Hamblin MR & Avci P (Édit.) Chandos Publishing, Oxford. p 249-266.
- Tobias G, Shao L, Salzmann CG, Huh Y & Green MLH (2006) Purification and opening of carbon nanotubes using steam. *The Journal of Physical Chemistry B* 110(45):22318-22322.
- Toh RJ, Ambrosi A & Pumera M (2012) Bioavailability of metallic impurities in carbon nanotubes is greatly enhanced by ultrasonication. *Chemistry - A European Journal* 18(37):11593-11596.
- Torre CD, Balbi T, Grassi G, Frenzilli G, Bernardeschi M, Smerilli A, Guidi P, Canesi L, Nigro M, Monaci F, Scarcelli V, Rocco L, Focardi S, Monopoli M & Corsi I (2015) Titanium dioxide nanoparticles modulate the toxicological response to cadmium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials* (0).
- Truhaut R (1977) Ecotoxicologie : objectifs, principes et perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1:151-173.
- Tsang SC, Chen YK, Harris PJF & Green MLH (1994) A simple chemical method of opening and filling carbon nanotubes. *Nature* 372(6502):159-162.
- USEPA (1994) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. *Environmental Protection Agency. EPA/600/R-94/024. Center for Environmental Research Information, Cincinnati, US.*
- USGS (2013) Mineral commodity summaries. *U.S. Geological Survey*:36-37.
- Vincent-Hubert F, Arini A & Gourlay-Francé C (2011) Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B[a]P and a combination of

B[a]P and Cd. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 723(1):26-35.

- Vincent-Hubert F, Revel M & Garric J (2012) DNA strand breaks detected in embryos of the adult snails, *Potamopyrgus antipodarum*, and in neonates exposed to genotoxic chemicals. *Aquatic Toxicology* 122–123(0):1-8.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B & Beyersmann D (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192(2–3):95-117.
- Wallis LK, Diamond SA, Ma H, Hoff DJ, Al-Abed SR & Li S (2014) Chronic TiO₂ nanoparticle exposure to a benthic organism, *Hyalella azteca*: impact of solar UV radiation and material surface coatings on toxicity. *Science of The Total Environment* 499(0):356-362.
- Wang D, Hu J, Forthaus BE & Wang J (2011) Synergistic toxic effect of nano-Al₂O₃ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 159(10):3003-3008.
- Weltens R, Goossens R & Van Puymbroeck S (2000) Ecotoxicity of Contaminated Suspended Solids for Filter Feeders (*Daphnia magna*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39(3):315-323.
- Wen-Hong F, Tang G, Zhao CM, Duan Y & Zhang R (2009) Metal accumulation and biomarker responses in *Daphnia magna* following cadmium and zinc exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(2):305-310.
- Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark WJ & Bruinink A (2007) The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters* 168(2):121-131.
- Wiesner MR & J.-Y. B (2007) Environmental nanotechnology: Applications and impacts of nanomaterials. pp 540.
- Witschger O & Fabries J.F (2005) Particules ultra-fines et santé au travail. 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail*, 199 :ND2227.
- Wootton EC, Dyrynda EA & Ratcliffe NA (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish and Shellfish Immunology* 15(3):195-210.
- Wu RSS & Lam PKS (1997) Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): Possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research* 31(11):2797-2801.
- Yang K, Zhu L & Xing B (2006) Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by carbon nanomaterials. *Environmental Science and Technology* 40(6):1855-1861.
- Zeni O & Scarfì M (2010) DNA damage by carbon nanotubes using the single cell gel electrophoresis technique. *Carbon Nanotubes*, (Methods in Molecular Biology, Balasubramanian K & Burghard M (Édit.) Humana Press, Vol 625. p 109-119.
- Zhang F, Wang N, Kong J, Dai J, Chang F, Feng G & Bi S (2011) Multi-walled carbon nanotubes decrease lactate dehydrogenase activity in enzymatic reaction. *Bioelectrochemistry* 82(1):74-78.
- Zhang Y, Song J, Yuan H, Xu Y, He Z & Duan L (2010) Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30(1):19-25.

Zhu XS, Zhu L, Tian SY, Lang YP & Li Y (2008) Toxicity effect of three kinds of carbon nanomaterials on aquatic organisms. *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science* 28(3):269-273.

**ANNEXE 1 : EXPOSITION *IN VIVO* PENDANT
72 H DE LA MOULE *E. COMPLANATA* AUX
SWCNT OU AU CD**

Au niveau de la dernière partie de l'étude (article) nous avons cherché à déterminer de manière préliminaire les effets d'interaction entre les SWCNT bruts ou purifiés et un métal toxique, le Cd. En effet, en milieu naturel les organismes sont susceptibles d'exposer à un mélange de contaminants, ce qui signifie que le potentiel toxique de ces mélanges doit être de plus en plus élucidé. De plus, l'augmentation de la production et du développement d'application en rémédiation va conduire à un accroissement de la présence des NTC dans le milieu aquatique et plusieurs études commencent à s'intéresser aux effets d'interactions possibles avec d'autres contaminants.

Avant de réaliser les co-expositions de SWCNT et Cd, notre objectif était de réaliser une étude préliminaire des effets génotoxiques des contaminants seuls, chez la moule d'eau douce *Elliptio complanata* exposée *in vivo* pendant 3 jours. Nous avons mesuré la viabilité puis la génotoxicité à l'aide du test comète. La méthodologie ayant déjà été présentée dans l'article 3, nous nous contenterons de présenter les résultats.

1. Observation de SWCNT dans les moules exposées

Il nous a été possible d'observer des nanotubes à l'intérieur de moules exposées aux SWCNT (Figure 1).

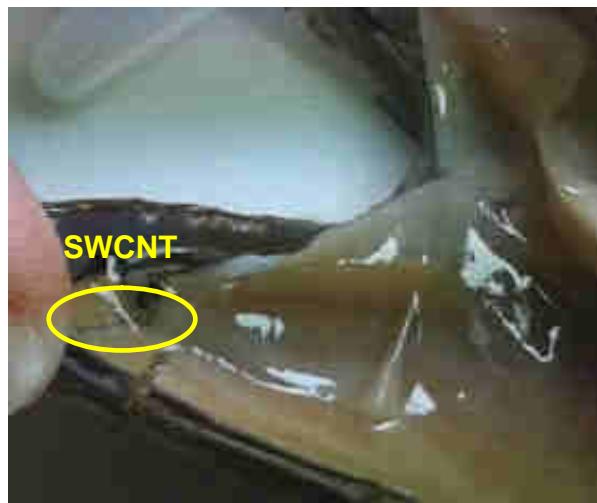


Figure 1. Observation de nanotubes de carbone dans une moule *E. complanata* exposée aux SWCNT.

2. Viabilité des hémocytes

Aucune modification significative de la viabilité des hémocytes de moules exposées au Cd ou aux SWCNT n'a été observée (Figure 2).

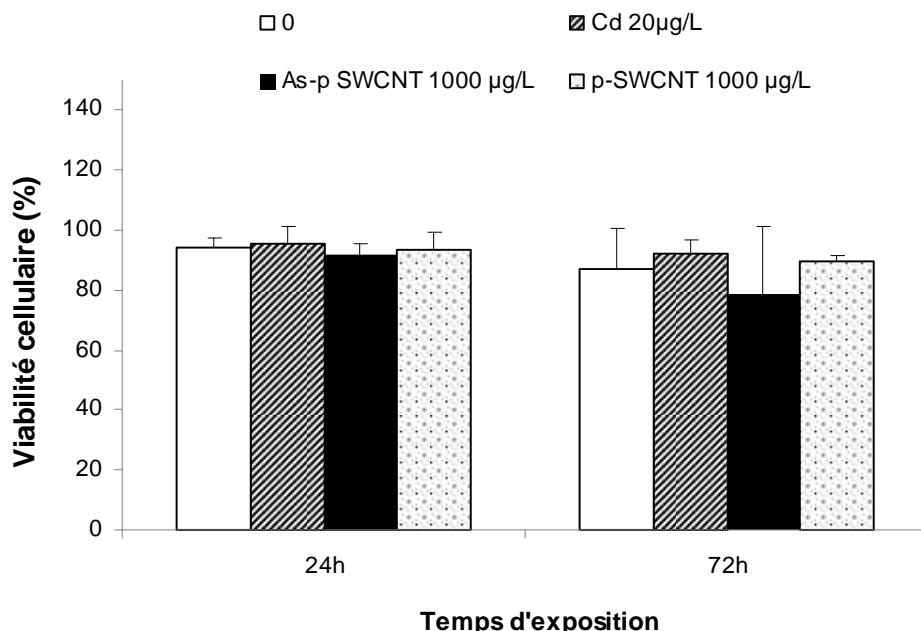


Figure 2. Viabilité des hémocytes après 24 h et 72 h jours d'exposition *in vivo* au Cd ou aux SWCNT bruts (As-p SWCNT) ou purifiés (p-SWCNT) (mean + SD).

3. Taux de cassure de l'ADN au niveau des hémocytes

Une augmentation significative du taux de cassure de l'ADN, mis en évidence par le Tail DNA et l'Olive Tail moment, a été mise en évidence chez les hémocytes de moules exposées aux SWCNT bruts ou purifiés à 1 000 µg/L et au Cd à 20 µg/L après 24 h d'exposition (Figure 3). Après 72 h d'exposition, seul le Cd continue de provoquer des dommages à l'ADN.

D'après ces résultats nous avons choisi de diminuer par deux la concentration de SWCNT et de tester l'effet des contaminants seuls puis en mélange.

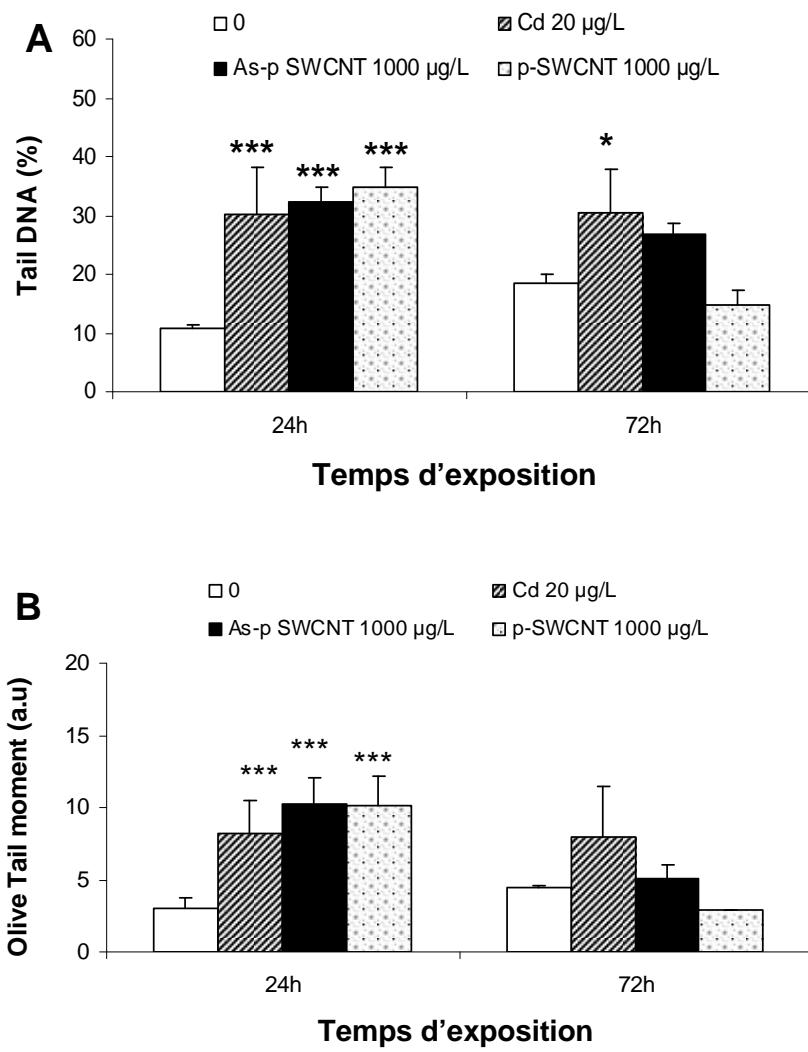


Figure 3. Taux de cassures de l'ADN évaluées avec le test des comètes sur les hémocytes de moule après 24 h et 72 h d'exposition *in vivo* au Cd ou aux SWCNT bruts (As-p SWCNT) ou purifiés (p-SWCNT). A : Tail DNA (pourcentage d'ADN cassé) et B : Olive Tail moment. Moyenne de 300 noyaux + erreur standard. ***p < 0.001, **p < 0.01 with * : traitement VS témoin négatif (0).

ANNEXE 2 : CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Dans le cadre de la thèse

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Preliminary study of SWCNT genotoxicity and immunotoxicity in the presence of cadmium after in vivo exposure to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Soumis à Ecotoxicology*.

Messika Revel, Michel Fournier, Christian Gagnon, Pierre Yves Robidoux. 2015. Toxic effect of single walled carbon nanotubes combined with cadmium to the crustacean *Daphnia magna*. *International Letters of Natural Sciences*, 42: 50-6.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. 2015. Single-walled carbon nanotubes toxicity to the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: Influence of sediment and exposure duration. *Journal of xenobiotics*, 5: 5086.æ

Publications antérieures à la thèse

Alain Dejean, **Messika Revel**, Frédéric Azémar, Olivier Roux. 2013. Altruism during predation in an assassin bug. *Naturwissenschaften*, 100 (10): 913-22.

Françoise Vincent-Hubert, **Messika Revel**, Jeanne Garric. 2012. DNA strand breaks detected in embryos of the adult snails, *Potamopyrgus antipodarum*, and in neonates exposed to genotoxic chemicals. *Aquatic toxicology*, 1-8: 122-123.

Messika Revel, Alain Dejean, Régis Céréghino, Olivier Roux. 2010. An assassin among predators : the relationship between plant-ants, their host Myrmecophytes and the Reduviidae *Zelus annulosus*. *Plos One*, 5 (10).

Communications orales

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Toxicity of single-walled carbon nanotubes combined with cadmium to the crustacean *Daphnia magna*. SETAC-Europe 25th Annual Meeting, Barcelone (Espagne), 3 au 7 mai 2015.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Cadmium biodisponibility in presence of single-walled carbon nanotubes to the crustacean *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology Workshop, Ottawa (Ontario, Canada), 28 septembre au 1er octobre 2014.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Biodisponibilité du cadmium pour la daphnie *Daphnia magna* en présence de nanotubes de carbone mono-paroi : étude préliminaire de l'effet de l'adsorption d'un métal sur un nanomatériau. Chapitre Saint-Laurent 18ème colloque, Québec (QC, Canada), 5 et 6 juin 2014.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Étude de la biodisponibilité des nanotubes de carbone mono-paroi pour un organisme benthique à l'aide de tests de toxicité. ECOBIM 10ème colloque, Brest (France), 20 au 23 mai 2014.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Étude de la biodisponibilité de nanotubes de carbone mono-paroi pour un amphipode d'eau douce, *Hyalella azteca*, en présence de sédiment artificiel. TOXEN colloque annuel, Montréal (QC, Canada), 30 avril 2014.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Effets écotoxicologiques de nanotubes de carbone mono-paroi chez l'organisme benthique *Hyalella azteca*. Canada – Brésil : les nanomatériaux et l'environnement 3ème symposium, Montréal (QC, Canada), 19 au 21 août 2013.

Par affiche

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Direct and indirect toxicity of single walled carbon nanotube to freshwater organism. Canadian Ecotoxicity Workshop, Saskatoon, (Saskatchewan, Canada), 4 au 7 octobre 2015.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Toxicité des nanotubes de carbone, mono-paroi bruts et purifiés, chez la moule d'eau douce, *Elliptio complanata*, en présence de cadmium. ECOBIM 11ème colloque, Québec (QC, Canada), 19 au 22 mai 2015.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Immunotoxicity and genotoxicity of pristine and purified SWCNT to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. SETAC-Europe 25th Annual Meeting, Barcelone (Espagne), 3 au 7 mai 2015.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Ecotoxicological effects of single-walled carbon nanotubes against a freshwater amphipod *Hyalella azteca*. ECOBIM 10ème colloque, Brest (France), 20 au 23 mai 2014.

Messika Revel, Michel Fournier, Pierre Yves Robidoux. Ecotoxicological effects of single-walled carbon nanotubes against benthic organisms. SETAC-Europe 24th Annual Meeting, Bâle (Suisse), 11 au 15 mai 2014.