THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

M. LAURENT VERNEUIL

le vendredi 9 janvier 2015

Titre :

TOXICITE ENVIRONNEMENTALE ET ECOTOXICITE DE NANOTUBES DE CARBONE CHEZ DES DIATOMEES BENTHIQUES: DE LA CELLULE AU BIOFILM

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDUEE)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

M. ERIC PINELLI

M. JEROME SILVESTRE

Rapporteurs :

M. BENOIT SCHOEFS, UNIVERSITE DU MANS

M. JEAN-PIERRE GAGNE, UNIVERSITE DU QUEBEC A RIMOUSKI

Membre(s) du jury :

Mme ELISABETH GIRBAL-NEUHAUSER, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ERIC PINELLI, INP TOULOUSE, Membre

M. JEROME SILVESTRE, INP TOULOUSE, Membre

Mme CATHERINE SANTAELLA, CEA CADARACHE, Membre

Thèse de doctorat

De L'institut National Polytechnique de Toulouse (INPT)

TOXICITE ENVIRONNEMENTALE ET ECOTOXICITE DE NANOTUBES DE CARBONE CHEZ DES DIATOMEES BENTHIQUES: DE LA CELLULE AU BIOFILM

Présentée et soutenue publiquement

Par

Laurent VERNEUIL

le 09 janvier 2015

Directeur de thèse : **Éric PINELLI**
Codirecteur : **Jérôme SILVESTRE**

Laboratoire EcoLab
UMR 5245 UPS / INPT / CNRS
Toulouse (31)
France

Ecole doctorale Sciences De l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

Devant le jury :

Jean Pierre GAGNE, Professeur, Université du Québec à Rimouski (Rapporteur)
Benoît SCHOEFS, Professeur, Université du Maine à Le Mans (Rapporteur)
Catherine SANTAELLA, Chargée de Recherche - HDR, CEA - Cadarache (Examinatrice)
Elisabeth GRIBAL-NEUHAUSER, Professeur, Université Paul Sabatier (Examinatrice et Présidente du jury)
Jean-Charles BOUTONNET, Chef de Département, ARKEMA-France (Membre invité)
Laury GAUTHIER, Maître de Conférences - HDR, Université Paul Sabatier (Membre invité)
Éric PINELLI, Professeur, INPT - ENSAT (Directeur de thèse)
Jérôme SILVESTRE, Ingénieur de Recherche - HDR, INPT - ENSAT (Codirecteur de thèse)



Few objects are more beautiful than the minute siliceous cases of the diatomaceae: were these created that they might be examined and admired under the high powers of the microscope?

Charles Darwin, 1859

On **the origin of species** by means of natural selection,
or the Preservation of favoured races in the struggle for life

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au laboratoire EcoLab (UMR 5245 INPT/UPS/CNRS) dans l'équipe d'accueil « ECotoxicologie et Santé des ECOsystèmes » (ECSECO) à partir d'octobre 2011.

Je tiens à remercier l'INPT, l'école doctorale SDU2E, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir contribué au financement et à l'accomplissement de cette thèse. Je tiens également à remercier le Laboratoire Commun Nautile (association entre le laboratoire EcoLab et la société ARKEMA) pour avoir financé une partie des travaux réalisés.

Je souhaite également remercier Jean-Pierre GAGNE, Benoît SCHOEFS, Catherine SANTAELLA, Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER, Jean-Charles BOUTONNET et Laury GAUTHIER, membres du jury de cette thèse qui ont accepté de lire, corriger et commenter le présent manuscrit résumant ces trois années de travail. La qualité de leur évaluation ainsi que la pertinence de leurs remarques et questions lors de la soutenance ont grandement contribué au dynamisme et au bon déroulement de cette inoubliable journée du 9 janvier 2015.

J'adresse ma sincère et profonde reconnaissance à Éric PINELLI et Jérôme SILVESTRE pour m'avoir donné ma chance sur ce sujet de thèse, mais également pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant ces trois années fort enrichissantes. Leur investissement dans ces travaux, les débats et discussions parfois enflammés dans le « couloir de réunion », ainsi que leur enthousiasme et bonne humeur inébranlables ont fortement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je souhaite à tous les futurs thésards d'avoir des encadrants tel que vous.

Je tiens également à exprimer ma sympathie et ma reconnaissance à Florence MOUCHET pour les longues discussions que l'on a pu avoir, ainsi que pour son investissement dans ces travaux de thèse.

Merci aussi à George MERLINA pour les intéressants débats que l'on a pu avoir au labo ou durant nos nombreux repas au Grill du Midi.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans l'aide que m'ont apporté les membres de l'équipe du LBAE d'Auch et plus particulièrement Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER, Claire Emmanuelle ROMAIN-MARCATO et Irina RANDRIANJATOVO. Ce fut une collaboration très agréable et enrichissante et je garderai un très bon souvenir de mes périodes de « camping » à l'IUT d'Auch.

Je remercie également Olivier GIOVANNAÏ pour son investissement dans mes travaux de thèse durant son stage de Master 2, mais également pour les nombreuses discussions botaniques et sociétales, toujours fort intéressantes, que nous avons eu lors des nombreuses séances nocturnes de microscopie.

Merci également à Maïalen BARRET et Yehia EL TEMSAH, pour leur gentillesse et l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux ainsi que pour les investigations menées sur l'effet des NTC chez des communautés bactériennes associées aux diatomées.

Merci à Annick CORREGE et Chrystelle RADOU pour tous les bons moments passés ensemble dans une ambiance chaleureuse et conviviale ainsi que pour leur soutien pendant ces trois années. Je tiens également à les remercier d'avoir permis à mes parents d'arriver à l'heure le jour de la soutenance... Elles garderont toujours une place dans mon cœur.

Je voudrais également remercier chaleureusement Loïc TEN-HAGE et Joséphine LEFLAIVE pour m'avoir accueilli dans leur équipe et ceci dès ma seconde année de licence. Les différents stages que j'ai effectué à leur côté ont grandement contribué à l'acquisition de connaissances qui m'ont été d'une grande aide durant cette thèse. Merci également à Jessica FERRIOL pour sa gentillesse et son aide ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré durant ces années.

Je ne peux oublier de remercier les nombreux enseignants de l'Université Paul Sabatier qui m'ont permis d'acquérir et d'approfondir mes connaissances dans divers domaines de la biologie durant ces huit années universitaires. Une pensée toute particulière à l'équipe pédagogique de la L3 BOPE (BV), année qui restera pour moi la meilleure de toute ma scolarité.

Merci à Cyril, Thibault, Xiaolin, Tian Tian, Adrien, Antoine, Floriane, Nico ainsi qu'aux autres thésards du laboratoire qui, malgré ma faible (pour ne pas dire inexistante…) participation aux soirées et activités de groupe, ont toujours été très sympathiques et de bonne compagnie pendant nos moments de détente. Bon courage à tous pour la suite.
Parmi eux je souhaite tout particulièrement remercier Allison pour les nombreux moments passés ensemble. Tu es maintenant le dernier espoir des poissons de la laverie.

Un pensée toute particulière à mes deux compères de bureau Agathe BOUR et Marion FIDENCI pour leur présence, leur bonne humeur et leur soutien. Je garderai un très bon souvenir de la complicité que nous avons eu durant ces années de labeur. Je vous souhaite à toutes deux de vous épanouir personnellement mais également dans la recherche scientifique, l'élevage de brebis, ou toute autre chose qui vous plaira.

Merci aussi à Antoine MOTTIER, compère éphémère de bureau, pour toutes les discussions que nous avons eues, pour les moments passés ensemble, ainsi que pour son assiduité au Burger du mardi.

Je tiens également ici à adresser l'expression de ma sincère reconnaissance aux nombreuses autres personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou avec qui j'ai pu interagir durant ces trois années.

Je ne peux oublier mes amis Faustine, Léa, Jessie, Catherine, Julie, Gaël, Maxime et tous les autres pour ces années et moments passés ensemble. Les week-ends à Montfaucon et à Bordeaux, les plongées à Banyuls, les sorties escalade, ski et tant d'autres choses, resteront pour moi des moments inoubliables.

J'adresse également une chaleureuse pensée à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours fait confiance. Merci également à ma petite Bubu qui, sans le savoir, m'a apporté beaucoup de réconfort.

Enfin, une pensée affectueuse pour Géraldine qui m'a toujours soutenu et encouragé dans mes choix.

SOMMAIRE

Liste des abréviations 09

INTRODUCTION GENERALE 11

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 13

CHAPITRE 2 - PRESENTATION DES MODELES D'ETUDE 75

CHAPITRE 3 - EFFETS DE NANOTUBES DE CARBONE MULTI-PAROIS CHEZ LA DIATOMEE BENTHIQUE *NITZSCHIA PALEA* : ROLE DU FRUSTULE ET DES SUBSTANCES EXTRACELLULAIRES POLYMERIQUES 89

CHAPITRE 4 - DYNAMIQUE DE FIXATION DE NANOTUBES DE CARBONE DOUBLE-PAROI ET MULTI-PAROIS SUR UN BIOFILM DE *NITZSCHIA PALEA* 105

CHAPITRE 5 - LES SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRES : UNE PROTECTION CONTRE LES NANOTUBES DE CARBONE ? 121

CHAPITRE 6 - AUTRE ESPECE, AUTRES EFFETS : EFFETS TOXIQUES, GENOTOXIQUES ET TERATOGENES DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LA DIATOMEE *NITZSCHIA LINEARIS* 141

CHAPITRE 7 - DISCUSSION GENERALE 163

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 174

TABLE DES MATIERES 181

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 189

ANNEXES 197

ARTICLE EN CO-AUTEUR 205

CONFERENCES ET POSTERS 213

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BSA : Bovine Serum Albumin

CE_{50} : indique la quantité qui induit un effet de 50% par rapport au témoin. Ici il était équivalent à la CI_{50}

CHU10 : Milieu de culture CHU n°10 (Cf. Annexe 1)

CI_{50} : indique la quantité de produit nécessaire pour inhiber 50% d'une fonction biologique (croissance photosynthèse, vitalité…).

CIRIMAT : Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux

CNRS : Centre Nationale de la Recherche Scientifique

DVC : Dépôt de Vapeur Chimiques (Chemical Vapor Deposition : CVD ou CCVD pour Catalyst Chemical vapor déposition)

DWNTC : NanoTubes de Carbone double-paroi

ECHA : European CHemical Agency

FDA : United State Food and Drug Administration

$IC_{95\%}$: Intervalle de confiance avec un risque $\alpha < 0,05$

INPT : Institut National Polytechnique de Toulouse

iRAP : innovative Research and Products Inc.

ISDD : Installation de Stockage de Déchets Dangereux

KT : KiloTonne(s) (10^3 tonnes)

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique en Transmission

MON : Matière Organique Naturelle provenant de la rivière Swannee

MWNTC : NanoTubes de Carbone multi-parois

NAUTILE : NAnotUbes et ecoToxIcoLogiE, laboratoire commun issu du partenariat entre : le Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT), l'Université Paul Sabatier (UPS) et l'entreprise ARKEMA-France

NOM : Swannee river Natural Organic Matter

NNC : Equipe du CIRIMAT (Nanocomposites et Nanotubes de Carbone)

NP : NanoParticules

NTC : NanoTubes de Carbone

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

PLP : Protein like polymers

REACH : Registration Evaluation, Authorization of Chemicals

RLO : Radicaux Libres Oxygénés

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

SCENIHR : Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

SPE : Substances Polymériques Extracellulaires

SPE-1 : milieu de culture SPE-1 (Cf. annexe 2)

SWNTC : NanoTubes de Carbone mono-paroi

UPS : Université Paul Sabatier

US : United States (les états unis d'Amérique)

INTRODUCTION GENERALE

Depuis 2005, l'intérêt grandissant pour les nanomatériaux, ainsi que le faible recul sur leurs effets environnementaux, a motivé le regroupement de deux laboratoires présentant des compétences complémentaires dans le domaine, ceci permettant une meilleure évaluation et compréhension des risques liés aux NanoTubes de Carbone (NTC). Le laboratoire EcoLab (UMR 5245) et plus particulièrement l'équipe écotoxicologie et santé des écosystèmes (ECSECO), profitant de nombreuses années d'expérience en toxicologie environnementale et en écotoxicologie, apporte son expertise concernant les effets sur le vivant. L'équipe Nanocomposites et Nanotubes de Carbone (NNC) du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux (CIRIMAT, UMR5085, Institut Carnot) apporte quant à elle une approche physico-chimique s'intéressant plus spécifiquement à la caractérisation des nanomatériaux carbonés. L'équipe NNC a d'ailleurs fourni un des deux types de NTC (les NTC double-paroi (DWNTC, en anglais Double Walled Carbon NanoTubes DWCNTs) évalués lors de cette étude. A partir de 2007, l'industriel Arkema, leader français de la production de NTC, a soutenu un projet permettant la création en 2010 d'un Laboratoire Commun issu d'un partenariat public / privé (Centre National de Recherche Scientifique CNRS / Institut National Polytechnique de Toulouse INPT / Université Paul Sabatier UPS / Arkema-France) entre ces différents acteurs précités : NAUTILE (NAnotUbes et écoToxIcoLogiE). La société ARKEMA a également fourni les NTC multi-parois (MWNTC, en anglais Multi-Walled Carbon NanoTubes MWCNTs) utilisé dans ce travail de thèse.

A l'interface entre toxicologie environnementale et écotoxicologie, ces travaux de thèse participent à l'étude des effets de NP carbonés sur les écosystèmes aquatiques continentaux dans un contexte croissant d'utilisation ces matériaux ainsi que du risque de leur rejet dans l'environnement. Plus particulièrement, ces travaux se sont focalisés sur les effets de NTC chez des algues microscopiques, producteurs primaires essentiels à de nombreuses chaînes trophiques aquatiques. En effet, bien que les algues aient un rôle essentiel pour la vie aquatique, les études traitant des effets des NTC sur les algues restent peu nombreuses et principalement focalisées sur des algues marines. Les diatomées, utilisées depuis de nombreuses années au laboratoire Ecolab pour l'évaluation des pollutions agricoles et métalliques, se sont présentées comme un modèle pertinent pour l'évaluation de l'effet des NTC sur le compartiment primaire des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles. Allant de l'échelle des populations à l'échelle moléculaire, tout en contribuant à l'évaluation des risques à l'échelle des écosystèmes aquatiques, ces travaux se sont focalisés sur différents

aspects. La toxicité propre des NTC a bien entendu été évaluée via différents outils (croissance, mortalité, altération des photosystèmes II, micronoyaux, anomalies de frustules). Cette étude s'est également intéressée aux effets « indirects » des NTC (ombrage) pouvant contribuer fortement à l'inhibition observée à certaines concentrations, particulièrement dans le cas de NTC stables dans la colonne d'eau, ainsi qu'aux réponses naturelles des diatomées exposées à ces particules. Les interactions entre les NTC et le biofilm ont été étudiées en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE, EA4565) de par son expertise dans le domaine des biofilms et agrégats microbiens.

<u>Ainsi les travaux de cette thèse avaient pour but :</u>

- D'évaluer la toxicité de différents NTC sur des organismes unicellulaires du compartiment primaire des rivières : les diatomées benthiques.
- De déterminer la nature des interactions entre les NTC et ces algues ainsi que le rôle des substances polymériques extracellulaires (SPE) qu'elles produisent.
- D'évaluer comment les interactions entre les biofilms photo-autotrophes et les NTC peuvent modifier le comportement, la toxicité et le devenir des NTC dans l'environnement.

Pour cela, le présent manuscrit va s'articuler en sept chapitres distincts.
Un premier chapitre introductif vise à établir une synthèse bibliographique concernant les NTC, leurs effets sur les milieux aquatiques et les organismes qui les habitent, notamment les algues unicellulaires et plus particulièrement deux diatomées benthiques.
Le second chapitre présente les modèles d'études : diatomées, NTC et Matière Organique Naturelle (MON) utilisée dans ce travail.
Le troisième chapitre présente les premiers résultats concernant la toxicité de MWNTC sur la diatomée benthique *Nitzschia palea* (*N. palea*) en présence ou absence de MON.
Le quatrième chapitre est focalisé sur la quantification de l'adhérence à la fois des DWNTC et des MWNTC sur un biofilm de *N. palea* au cours du temps.
Le cinquième chapitre présente une étude de l'analyse quantitative et qualitative des substances polymériques extracellulaires (SPE) produites par *N. palea* exposée à des NTC double-paroi (DWNTC) ainsi que la nature des interactions entre NTC et SPE.
Le sixième chapitre, présente une étude sur les effets de MWNTC chez une autre espèce de diatomée benthique : *Nitschia linearis (N. linearis*).
Le dernier chapitre aborde une discussion générale et les perspectives sur l'ensemble des travaux réalisés.



CHAPITRE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les nanoparticules et l'environnement…

Les nanoparticules (NP) sont définies comme étant des structures élémentaires, ayant au moins une dimension à l'échelle nanométrique, comprise entre 1 et 100 nanomètres (nm). Cette échelle nanométrique est en relation avec leur surface spécifique élevée (m^2 Kg^{-1} ; Figure 1). Cette taille leur confère des propriétés intrinsèques particulières qui ouvrent de nouveaux horizons en termes d'applications dans de nombreux secteurs industriels et médicaux. Cette surface spécifique importante va jouer un rôle déterminant dans la toxicité des NP ainsi que leurs interactions avec de nombreuses matrices environnementales (sédiments, eaux naturelles, organismes… ; Nel, 2006).

Les NP peuvent avoir des origines naturelles ou anthropiques et leur production peut être intensionnelle on non. Les argiles (phyllo-silicates), par exemple, sont des minéraux très abondants sur terre qui peuvent atteindre des épaisseurs nanométriques. D'autres particules de tailles nanométriques sont produites lors de la combustion incomplète de combustibles carbonés ou d'énergies fossiles. C'est le cas des suies qui sont produites lors d'incendies, d'éruptions volcaniques, ou encore d'éclairs. D'autres nanoparticules sont produites durant l'érosion des roches ou par des réactions photochimiques (Aitken, 2006; Biswas and Wu, 2005; Buzea *et al.*, 2007; Luther and Rickard, 2005). Ainsi, au cours leur évolution, les organismes vivants ont intégré la pression de sélection des NP naturelles (*eg*. Abrasion, turbidité, internalisation).

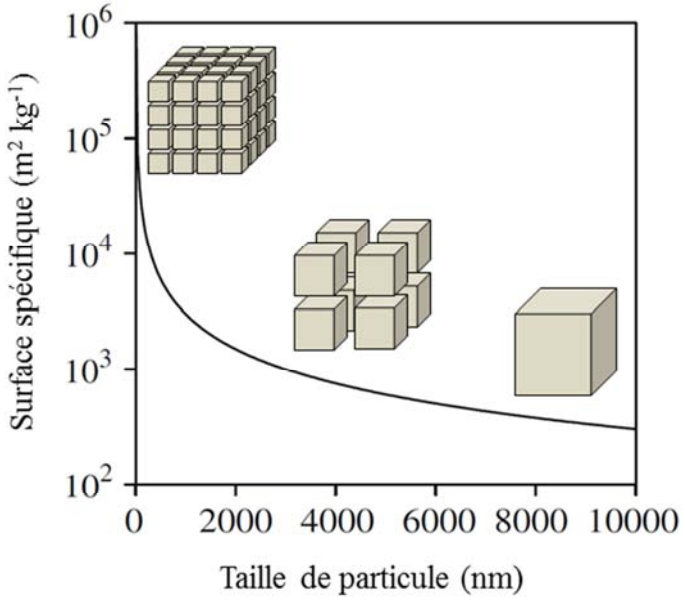


Figure 1 : Relation entre surface spécifique (m^2 kg^{-1}) d'une particule sphérique et sa taille (diamètre en nm) avec une densité de 1000 kg m^{-3} comme exemple (d'après Navarro et al. 2008). Plus la taille de la particule diminue et plus la surface spécifique augmente alors que le volume est conservé (Les cubes ont été rajoutés à la figure originale pour illustrer ce phénomène).

Confinées au départ au domaine de la recherche, les NP manufacturées (produites intentionnellement et de façon spécifique) sont maintenant présentes dans une grande variété de produits du quotidien. On les retrouve par exemple dans de nombreux cosmétiques tels que les crèmes solaires ou de beauté (dioxyde de titane), en pharmacie

(blanchissant pour les comprimés), dans l'alimentation (silice, dioxyde de titane), les textiles (NP d'argent comme antibactérien), le bâtiment, principalement dans les peintures (pigments, blanchissant, opacifiant), dans certains équipements sportifs en remplacement de la fibre de carbone (nanotubes de carbone), dans la fabrication de l'essence et de pots catalytiques (oxydes de cérium) ou encore dans l'industrie automobile : pneus de voiture, matériaux composites (nanotubes de carbone). Ces champs d'applications, bien qu'encore restreints, se développent et vont rapidement s'appliquer à grande échelle dans de nombreux secteurs, comme la médecine (transport de molécules ciblées sur l'organe ou le tissu à traiter, patch à insuline…), l'électronique (transistors, écrans souples, stockage d'énergie…), l'agriculture (nano-pesticides[1]) ou encore l'environnement (dépollution des sols et des eaux ; MarketsandMarkets, 2013 ; Ministère de L'écologie, du Développement Durable et de L'énergie, ANSES, 2013, 2014). Ainsi, le marché mondial annuel des NP et de leurs produits dérivés est aujourd'hui estimé à plusieurs milliards de dollars US (Roco, 2005 ; Biswas and Wu, 2005). Devant la multitude et la diversité de leurs applications, une augmentation des rejets de ces matériaux dans l'environnement semble inévitable dans les années à venir. Vous l'aurez compris, les écosystèmes et nous même sommes d'ores et déjà exposés aux NP, souvent même sans le savoir.

L'Europe a instauré en 2007 un règlement européen du nom de REACH[2] (règlement n°1907/2006) visant à « sécuriser » la fabrication et l'utilisation de substances chimiques dans l'industrie européenne. Le but est de recenser, d'évaluer et de contrôler les substances chimiques fabriquées, importées, mises sur le marché européen (REACH, 2007). Bien que le règlement REACH n'inclut pas explicitement les nanoparticules, ces dernières répondent cependant à la définition des substances décrites et les mêmes dispositions leurs sont applicables (ECHA, 2014). Il en va de même pour le CLP (en anglais : Classification, Labelling, Packaging ; règlement CE n°1272/2008) qui vise à réguler et homogénéiser l'étiquetage des compositions chimiques des produits afin que les consommateurs soient clairement informés (par étiquetage) de la composition des produits chimiques qu'ils utilisent (ECHA, 2014). Un consortium international nommé REACHnano (2012) a également été créé. Il vise à fournir à l'industrie des outils pour appuyer l'évaluation de la

[1] Pesticides formulés à base de nanoparticules. L'effet peut être directement lié à la nanoparticule ou aux ions qu'elle relâche (*e.g.* nanoparticules d'argent, cuivre, aluminium…). Ou alors, la nanoparticule peut être utilisée comme vecteur pour déposer une substance active et/ou la transporter dans l'organisme cible. Le pesticide et la nanoparticule peuvent également agir en synergie (Kah and Hofmann, 2014).

[2] Acronyme anglais de : Registration (enregistrement de toutes les substances chimiques fabriquées ou importés sur le marché européen (tonnage > 1 t/an) d'ici 2018), Evaluation (Evaluation des propositions d'essais, des dossiers d'enregistrement et des substances), Autorisation (Autorisation pour les substances extrêmement préoccupantes) of CHemicals (des substances chimiques).

sécurité chimique des nanomatériaux et à soutenir la mise en œuvre du règlement REACH. Dans le cadre de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique ; en anglais : Organism for Economic Cooperation and Development : OECD), l'Europe, a également mis à disposition une liste des nanomatériaux prioritaires à évaluer, ainsi que certaines recommandations pour arriver à cette fin (OECD, 2010, 2002). Le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) a quant à lui conclu que, malgré un risque lié aux nanomatériaux semblant relativement faible, de nombreuses incertitudes demeurent quant à leur dangerosité réelle (effets à long terme, formes rejetées dans l'environnement…). De plus, il préconise une règlementation au cas par cas des différents nanomatériaux (SCENIHR, 2007). Concernant cette fois les Etats Unis d'Amérique, la FDA (US Food and Drug Administration) a mis en place un guide pour les industriels des filières alimentaires et cosmétiques pour l'évaluation de l'innocuité des nanomatériaux (FDA, 2012a, 2012b). En France, une obligation de déclaration a été instaurée par la loi du 3 Août 2009 (n° 2009-967 Article 42. 2009-967) et du 12 juillet 2010 (n° 2010-788 Article 185. 2010-788) à partir de 100 g de substance nano-particulaire produite, importée ou distribuée. Cette réglementation inclut les substances en l'état, les substances à l'état nano particulaire contenues dans un mélange sans y être liées, ainsi que les articles destinés à rejeter de telles substances dans des conditions normales d'utilisation (Ministère de L'écologie, du Développement Durable et de L'énergie and ANSES, 2013). Le règlement de l'Union Européenne, du Parlement Européen et du Conseil du 25 octobre 2011 (UE N° 1169/2011), prévoit également la mise à disposition pour le public de l'identification et des usages de ce type de substances. Ceci se matérialise principalement par un étiquetage explicitant la présence de NP dans le cas des denrées alimentaires (Ministère de L'écologie, du Développement Durable et de L'énergie, 2014). Malgré toutes ces initiatives, de nombreuses questions demeurent concernant les scénarios de rejet et les doses d'exposition réelles aux NP, ainsi que l'évaluation de leurs effets sur le vivant (Gordon *et al.*, 2014).

2 …ou l'essor de la nano-écotoxicologie et de la nano-toxicologie environnementale

L'apparition et le développement industriel des nanotechnologies, nanomatériaux et NP ont conduit à l'évolution de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie, sciences étudiant respectivement l'effet des polluants des plus petites (molécules, cellules, tissus, organes, individus) aux plus grandes échelles (populations, communautés, écosystèmes). Pour appréhender clairement ces deux sciences, il est d'abord important de revenir sur

celles dont elles sont issues : l'écologie[3], la toxicologie[4], et la chimie de l'environnement[5], auquelles a été rajouté le préfixe nano pour désigner l'écotoxicologie et la toxicologie environnementale, appliquées aux NP.

Ce n'est que dans les années 60 avec les travaux de Rachel Carson[6] qu'il est apparu important de faire la distinction entre la toxicologie et la toxicologie environnementale. Cette scientifique mettait en avant le besoin d'extrapoler les effets toxiques observés chez les organismes à ceux sur les écosystèmes et l'équilibre naturel. Cette dernière dénonçait déjà le fait que des populations humaines pouvaient être intoxiquées par négligence ou méconnaissance des dangers des produits qu'elles utilisaient (Carson, 1962). Le terme écotoxicologie a été introduit par René Truhaut[7] à la même période. Il définissait l'écotoxicologie comme une branche de la toxicologie étudiant spécifiquement les effets de polluants d'origine naturelle ou anthropique sur les populations et les communautés de plantes, d'animaux et de microorganismes telles qu'elles sont présentes et organisées dans la nature. Ainsi, l'écotoxicologie est essentiellement l'étude des effets toxiques de substances chimiques présentes dans l'environnement sur les populations et communautés naturelles de différents écosystèmes (Bazerman and De los Santos, 2005). Quelques années plus tard, Chapman a mis à jour la notion d'écotoxicologie en décrivant celle-ci comme étant de l'écologie en présence de polluants. Ainsi l'écotoxicologie vise à comprendre l'effet d'un stress sur des populations, communautés ou écosystèmes, contrairement à la toxicologie

[3] Le thème écologie a été introduit par le philosophe Enrst Haeckel au milieu du 19ème siècle. Il découle du grec oikos (éco) qui veut dire l'habitat (au sens l'endroit où l'on vit), et logos qui signifie la science. L'écologie est en fait plus précisément la science qui étudie les interactions entre les organismes et leur environnement.

[4] L'origine du terme toxicologie est incertaine. Certains disent qu'il est originaire du grec « toxicon signifiant les flèches empoisonnées jadis utilisés pour tuer des proies ou des ennemis. D'autres disent qu'il proviendrait du mot « Taxus », l'If dont le bois servait à la confection des flèches et les baies à la confection du poison dont les pointes étaient enduites. Originellement ce terme désignait donc l'art de fabriquer des poisons puis l'art de se prémunir des effets toxiques de ces derniers. Aujourd'hui, ce terme désigne la science qui étudie la toxicité (capacité d'une substance à provoquer des effets nocifs pour les organismes) de substances à différentes échelles, allant de l'organisme à la molécule (Klaassen et al., 2013; Lauwerys, 2007).

[5] Chimie de l'environnement : qui traite des aspects chimiques des processus intervenant dans l'environnement. Elle traite des sources, des puits et du transport (des cycles), de la distribution, ainsi que des réactions et des effets des substances dans l'eau, le sol, l'air et leurs impacts sur le monde du vivant. (Bliefert and Perraud, 2008).

[6] Rachel Carson (1907-1964): zoologiste et biologiste marine américaine de la première moitié du XXème siècle à la fin des années 1950. Elle orienta ses travaux sur la protection de l'environnement et sur les problèmes liés aux pesticides de synthèse. Son ouvrage intitulé « Silent Spring » a grandement contribué à la prise de conscience de ce problème grandissant et a grandement contribué à l'interdiction de l'usage du DDT et de nombreux autres biocides, ainsi qu'à la création de l'Environnemental Protection Agency (EPA).

[7] René Truhaut (1909-1994) : Toxicologue spécialisé pionnier de la cancérologie en France. Professeur titulaire de la chaire de toxicologie, Il a siégé dans des instances prestigieuses telles que : le Conseil supérieur d'hygiène publique de France, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Union internationale contre le cancer, l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC). Il a également été président du comité sur l'écotoxicité et la toxicité des produits chimiques.

environnementale, qui étudie l'effet des polluants chez les organismes dans des conditions environnementales (Chapman, 2002; Ramade, 2007).

3 Les nanotubes de carbone : de leur découverte à leurs applications

3.1 Les nanotubes de carbone

Les NanoTubes de Carbone (NTC) font partie des différentes formes allotropiques (différentes assemblages d'un même élément chimique) du carbone rencontrées sur terre (Figure 2) au même titre que le diamant et le graphite. Les NTC peuvent se former naturellement en faibles quantités lors d'incendies, d'éruption volcaniques, ou pendant des orages *via* la foudre. Des NTC et fullerènes[8] ont par exemple été observés dans une carotte de glace âgée de 10000 ans (Murr *et al.*, 2004). Ils sont également produits de façon involontaire durant la combustion de gaz naturel et de propane par des dispositifs tels que les brûleurs des plaques de cuisson, les fours industriels, les chauffe-eaux et les centrales électriques (Murr *et al.*, 2004). De nos jours, ils sont aussi produits de façon contrôlée et en quantités importantes. Ce sont ces derniers, souvent définis dans la littérature comme NTC «manufacturés», qui ont particulièrement intéressé cette étude. C'est au début des années 1990 que la synthèse contrôlée de NTC a été réalisée par différents laboratoires (Bethune *et al.*, 1993 ; Ebbesen and Ajayan, 1992 ; Iijima and Ichihashi, 1993). On attribue souvent la découverte des NTC à Iijima en 1991 (Iijima, 1991). Pourtant, les premières observations de NTC semblent en fait remonter à 1952. A l'époque, deux scientifiques russes avaient observé en Microscopie Electronique à Transmission

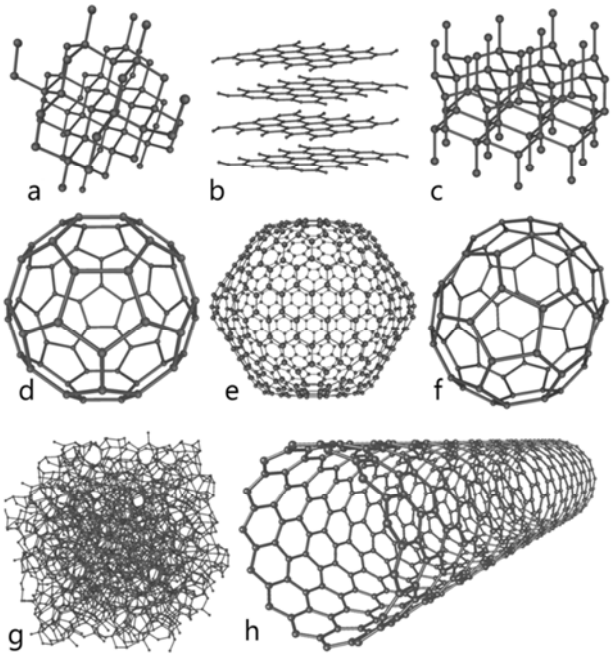


Figure 2 : Huit formes allotropiques du carbone présentes sur terre : (a) Diamant (hybridation sp^3), (b) Graphite (hybridation (sp^2), (c) Lonsdaleite, Fullerènes (d) C60 (e) C540 (f) C70 (g) Carbone amorphe (h) Nanotube de carbone mono paroi. http://fr.wikipedia.org/wiki/Formes_allotropiques_du_carbone. Michael Ströck (mstroeck) 7 février 2006 (CC) BY-SA 3.0.

[8] Molécules nano-particulaires composées d'une couche de carbone d'épaisseur monoatomique présentant une structure sphérique ou ellipsoïdale rappelant l'assemblage des pièces en cuir d'un ballon de football (Figure 2 d-f). Ils sont produits dans des conditions comparables à celles requises pour la synthèse des NTC.

(MET) des structures carbonées d'une cinquantaine de nm de diamètre avec une cavité continue, s'apparentant à des MWNTC (Monthioux and Kuznetsov, 2006). Quelques années plus tard, Oberlin *et al.* (1976) observaient également des structures s'apparentant à des DWNTC. Cependant, le contexte de la guerre froide a fortement limité le transfert de connaissance à l'échelle planétaire. De plus, les NTC étaient surtout considérés à cette époque comme étant des résidus indésirables de la combustion dans différents procédés de fabrication utilisant des températures élevées (*e.g*. la sidérurgie). Le challenge des scientifiques à cette période était donc plus d'en éviter la formation (Monthioux and Kuznetsov, 2006). Ce n'est qu'à la fin du XX^{ème} siècle, dans un contexte scientifique propice (meilleurs outils d'observation et d'analyse, développement de techniques de synthèse contrôlée, meilleure diffusion des informations…), que le potentiel technologique des NTC a été révélé. Depuis, la production annuelle mondiale n'a fait que s'accroître. En 2007, la production de NTC était estimée entre 0,35 Kt et 0,5 Kt / an (Mueller and Nowack, 2008) ; en 2013, elle se situe à plus de 3 Kt / an (Keller *et al.*, 2013). Il est prévu une production mondiale de NTC supérieure à 9,2 Kt en 2015 (iRAP, 2011) et une production avoisinant les 14 Kt en 2016 pour un marché d'environ 2,5 milliards de dollars US en 2018 (MarketsandMarkets, 2013). En 2012, la production annuelle Européenne était estimé à 550 t/an (Piccinno *et al.*, 2012), le reste étant produit majoritairement par la Chine et les Etats Unis d'Amérique. A l'heure actuelle, de nombreux domaines d'activité utilisent déjà les NTC ou en développent de futures applications. C'est le cas de secteurs tels que l'électronique (*e.g*. écrans plats, transistors, semi-conducteurs), la chimie des polymères et des composites (*e.g*. résistance et propriétés de matériaux, matériel sportif), l'énergie (*e.g*. batteries, condensateurs, transport d'électricité), le secteur médical (*e.g*. transport ciblé et diffusion des molécules actives…), le secteur nautique (*e.g*. coques de bateaux…), l'aéronautique et l'aérospatial (*e.g*. voilure d'avion, revêtements, allégements), l'environnement (*e.g*. filtres à polluants organiques et métalliques) ou encore la défense (Ajayan and Zhou, 2001 ; Alpatova *et al.*, 2010 ; Bouchard *et al.*, 2012 ; De Volder *et al.*, 2013 ; Endo *et al.*, 2008 ; Hilding *et al.*, 2003 ; MarketsandMarkets, 2013 ; Upadhyayula and Gadhamshetty, 2010 ; Yang and Xing, 2009). Ainsi, la future demande en NTC est estimée entre 3,7 Kt et 5,72 Kt pour 2015 et entre 10,5 Kt et 12 Kt en 2020 (Future Markets Inc, 2013).

Cependant, l'utilisation des NTC peut être classée en deux catégories. La première ne se focalise pas directement sur les propriétés nanométriques des NTC mais plutôt sur la résistance que leur structure leur confère. Cela en fait le candidat idéal pour remplacer la célèbre fibre de carbone, qui avait déjà supplanté dans de nombreux domaines la fibre de verre. C'est ce type d'utilisation qui est à l'heure actuelle mis en œuvre à l'échelle

industrielle et la plus économiquement viable. Ainsi, on peut déjà retrouver des NTC dans divers plastiques, gommes de pneus, matériaux composites, afin de les rendre plus légers tout en conservant une résistance comparable ou supérieure (Lam *et al.*, 2006). On peut également les retrouver dans l'industrie automobile et aéronautique, pour la fabrication de pales d'éolienne, dans de nombreux équipements sportifs tels que les vélos, les skis, les flèches et battes de baseball ou encore les clubs de hockey et de golf (Hussain, 2006; Köhler *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009). La seconde catégorie exploite leurs propriétés quantiques liées à leur taille. Par exemple, leurs propriétés de stockage et de conduction de l'électricité ont permis la fabrication de batteries lithium-ion pour les téléphones mobiles et ordinateurs portables. (iRAP, 2011; Köhler *et al.*, 2008). Certains producteurs (*e.g.* Nanocyl) développent également différents enduits (anti-adhérents, ignifugeant, antistatique…) pour l'industrie navale et aéronautique (http://www.nanocyl.com/). Cependant, les propriétés nanométriques des NTC ne sont encore que peu exploitées. Pourtant, de nombreuses entreprises et laboratoires investissent massivement dans le développement d'applications pour les industries de hautes technologies. Dans un futur plus ou moins proche, ils pourraient par exemple être présents dans les textiles (*e.g*. vêtements plus légers et résistants, changeant de couleur), dans le stockage et le transport d'énergie à grande échelle, dans le domaine médical (vecteur de transport de substances actives, culture cellulaire… ; Aitken, 2006 ; Béduer *et al.*, 2012 ; Bhushan, 2010 ; Endo *et al.*, 2008 ; Gaillard *et al.*, 2009 ; Köhler *et al.*, 2008 ; Kostarelos *et al.*, 2009). Mais le secteur le plus prometteur en terme de revenu semble être l'électronique, avec l'élaboration d'écrans ultraplat et souples (Dijon, 2005), de puces électroniques et nano-processeurs cinq à dix fois supérieurs aux actuels microprocesseurs en silicones (Nanowerk, 2014 ; Park *et al.*, 2012 ; Park and Haensch, 2012), ou encore des sondes de microscopie à force atomique (Wilson and Macpherson, 2009). Certains chercheurs ont mis au point des matériaux adhésifs, à base de MWNTC, mimant la surface des pattes de geckos avec une efficacité bien supérieure à ces dernières (Qu *et al.*, 2008). Bien qu'anecdotique, la production de NTC à grande échelle a également remis au goût du jour l'idée perdue, car irréalisable avec les matériaux disponibles à l'époque (milieu du XXème siècle), de l'élaboration d'un ascenseur spatial. Il pourrait transporter des satellites ou autres matériels dans l'espace à moindre coût en comparaison des propulseurs spatiaux actuels. Ce projet a d'ailleurs présenté un grand intérêt pour la NASA cette dernière décennie (Edwards and Ragan, 2006).

3.2 Structures, propriétés et synthèses des nanotubes de carbones

3.2.1 Structures et propriétés

Nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les NTC sont une forme allotropique du carbone. C'est-à-dire qu'ils ne sont composés théoriquement que d'atomes de carbones, hybridés en sp^2 de façon covalente, formant une (dans le cas des SWNTC) ou plusieurs parois (pour les DWNTC et MWNTC ; de 2 à 25) d'épaisseur monoatomique et espacées d'environ 3,6 Å. Chacune des parois, assimilables à un feuillet de graphène enroulé sur lui-même[9], est constituée d'atomes de carbone agencés en hexagones, le tout formant un tube. Les extrémités du tube sont souvent fermées par une structure comparable à un demi-fullerène. En fonction du nombre de parois et des conditions de synthèse, leur diamètre varie d'environ un nm à une centaine de nm. En plus de leur diamètre, l'orientation de l'axe « d'enroulement » des feuillets de carbone (hélicité, θ) leur confère des propriétés métalliques (zigzag, θ = 0°), semi conductrices (armchair, θ = 30°) ou intermédiaire (chiral, 0° < θ < 30° ; Figure 3). Les NTC ont également la particularité d'avoir un ratio longueur / diamètre pouvant être très important (jusqu'à plusieurs centaines de micromètres (µm) de longueur pour quelques nm à dizaines de nm de diamètre (Aqel *et al.*, 2012 ; Ávila and Lacerda, 2008 ; Belin and Epron, 2005 ; Dai, 2002 ; Karthikeyan *et al.*, 2009). Enfin, plus le nombre de parois est faible et plus la surface spécifique sera importante. Cette dernière va également être dépendante de l'état d'agglomération des NTC entre eux, la formation de faisceaux et d'agglomérats conduisant à une diminution de leur surface spécifique (Laurent *et al.*, 2010 ; Peigney *et al.*, 2001). Toutes ces caractéristiques constituent des éléments clés pour la compréhension de l'effet des NTC sur le vivant, ainsi que pour l'étude de leur comportement et répartition dans l'environnement[10] (Belin and Epron, 2005).

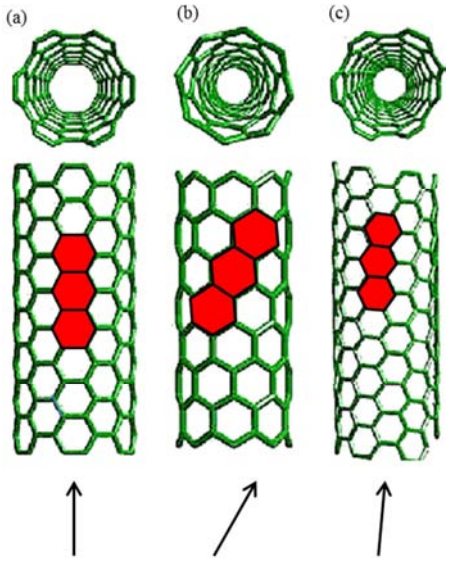


Figure 3 : représentations schématiques de différents assemblages des cycles carbonés constituant la paroi des nanotubes de carbone. (a) Métallique (zigzag, θ = 0°), (b) semi-conducteur (armchair, θ = 30°) ou (c) intermédiaire (chiral, 0° < θ < 30°).
Inspirée de : http://education.mrsec.wisc.edu/143.htm.

[9] Bien que cette explication permette de visualiser la structure des NTC, la formation de ces derniers se fait par une déposition progressive d'atomes de carbone de façon circulaire et non pas par un enroulement de feuillets de graphène (Figure 5).
[10] Les techniques existantes pour arriver à cette fin ont été répertoriées par Belin and Epron, (2005)

3.3 Synthèse

Les NTC sont principalement synthétisés de façon contrôlée *via* trois procédés différents : la synthèse par décharge d'arc électrique, la vaporisation ou ablation laser, et enfin le dépôt chimique en phase vapeur catalysé (Aqel *et al.*, 2012 ; Awasthi *et al.*, 2005 ; Karthikeyan *et al.*, 2009).

3.3.1 Arc électrique

La synthèse par arc électrique est réalisée, comme son nom l'indique, lors de la formation d'un arc électrique entre deux électrodes de graphite pur (une autre forme allotropique du carbone) sous atmosphère inerte (argon ou hélium). C'est cette méthode qui a été utilisée pour les premières synthèses contrôlées de NTC par Bethune *et al.*, (1993) et par Iijima & Ichihashi (1993). Un courant d'intensité variant de 50 A à 100 A, pour une différence de potentiel d'environ 20 V, va induire des décharges électriques entre les deux électrodes. Le carbone composant l'anode est alors vaporisé, formant un plasma pouvant atteindre plusieurs milliers de degrés Celsius (°C). Une partie du plasma se condense ensuite rapidement sur la cathode pour former principalement des MWNTC mêlés à d'autres NP carbonées. Des SWNTC peuvent également être obtenus en utilisant une anode contenant cette fois un catalyseur métallique (Fe, Co…) en plus du graphite (Bethune *et al.*, 1993 ; Iijima and Ichihashi, 1993). Du fait des très hautes températures de synthèse mises en jeu, ce procédé permet en revanche de produire des NTC avec une qualité de structure élevée (proche de la structure parfaite théorique (Ebbesen and Ajayan, 1992). Bien que certains auteurs aient réussi des synthèses à plus grande échelle et avec une pureté d'échantillon comprise entre 70% et 90% (Journet *et al.*, 1997), les quantités de NTC produits par cette technique restent cependant faibles. Un exemple de nanotubes formés par ce dernier procédé est donné en Figure 4.

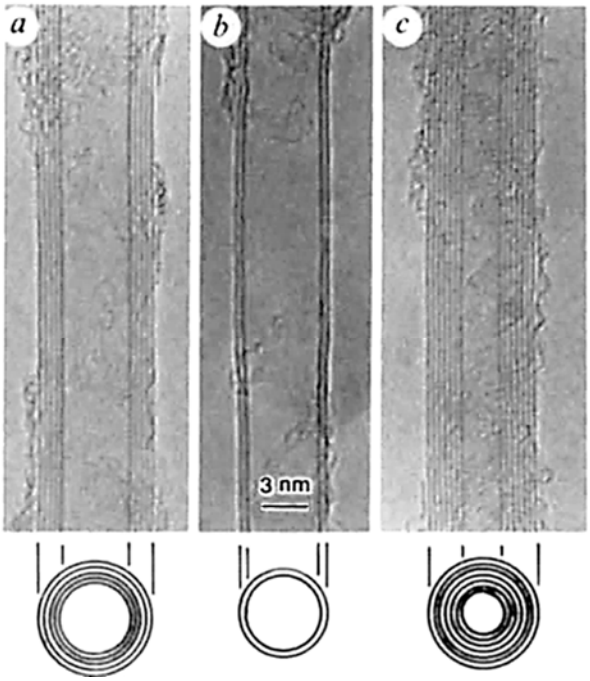


Figure 4 : images en microscopie électronique à transmission (MET) de différents nanotubes de carbone (NTC) et illustrations de leur section transversale respective. (a) NTC multi-parois (MWNTC) présentant cinq parois pour un diamètre externe de 6,7 nm. (b) NTC à double-paroi (DWNTC) de diamètre externe 5,5 nm. (c) MWNTC composés de 7 parois pour un diamètre externe de 6.6nm et interne de 2,2 nm. D'après Iijima (1991).

3.3.2 Ablation laser

La méthode par ablation laser consiste, comme pour la technique précédente, à vaporiser le carbone contenu dans une pastille de graphite ou un composite graphite/métal (Cobalt ou nickel) en fonction du type de NTC désiré (respectivement MWNTC ou SWNTC ; Guo *et al.*, 1995 ; Karthikeyan *et al.*, 2009 ; Maser *et al.*, 1998). Ainsi, l'énergie nécessaire à la vaporisation du carbone n'est plus apportée cette fois par un arc électrique mais par un laser de haute énergie. La réaction se passe toujours sous atmosphère inerte et à haute température. Les atomes de carbone se réarrangent alors majoritairement au niveau de la zone d'impact du laser, formant des SWNTC et MWNTC de bonne qualité structurale[11] et de façon très spécifique (Maser *et al.*, 1998 ; Scott *et al.*, 2001). Ces deux premières techniques se basent ainsi sur la vaporisation des atomes de carbone composant le graphite pour ensuite les réassembler sous forme de NTC. Cependant, bien que produisant des NTC de très bonne qualité structurale, elles ne permettent pas pour le moment une production à l'échelle industrielle (Awasthi *et al.*, 2005). Ceci est principalement lié au fait qu'on ne puisse pas apporter de carbone de façon continue.

3.3.3 Dépôt de Vapeurs Chimiques Catalysé

La synthèse par Dépôt de Vapeur Chimique (DVC ; en anglais : Chemical Vapor Deposition : CVD) aussi appelé dépôt de vapeur chimique catalysé ou dépôt chimique en phase vapeur catalysé (Catalyst Chemical Vapor Deposition : CCVD) est la plus utilisée. A l'heure actuelle, cette technique est la seule pouvant réellement permettre une production de NTC à une échelle industrielle[12] (Awasthi *et al.*, 2005). Elle permet l'obtention de grandes quantités de NTC du fait de la possibilité d'un apport constant en source de carbone (gaz carbonés : éthanol, benzène, éthylène, pyrène…) et éventuellement de catalyseurs durant la synthèse. Le principe du DVC est de décomposer un précurseur carboné (hydrocarbures, monoxyde de carbone, alcools, acétylène…) pour ensuite condenser les atomes de carbone sur des NP métalliques (Co, Fe, Ni) qui catalysent leur déposition ordonnée. Les températures mises en jeu varient en général entre 500 et 1200°C en fonction des couples précurseur(s) carboné(s) / particule(s) métallique(s) choisis (Che *et al.*, 1998). Ce procédé mène à l'obtention à la fois de SWNTC et MWNTC en proportions variables en fonction des systèmes choisis (taille et composition du catalyseur, gaz employé et sa concentration, température). En adaptant le catalyseur (taille et composition), il est possible d'obtenir de façon assez spécifique des NTC ayant un nombre de parois similaires entre eux et ainsi d'obtenir des NTC majoritairement à

[11] NTC dont la paroi présente un agencement des atomes de carbone identique à celle du graphène (à l'inclinaison près). C'est-à-dire composés uniquement de cycles à six carbones (Figures 2 et 3).
[12] Ceci n'est vrai que dans la plupart des cas. Par exemple la synthèse des DWNTC utilisés dans cette étude ne permet actuellement qu'une production à l'échelle du gramme (Flahaut et al., 2003).

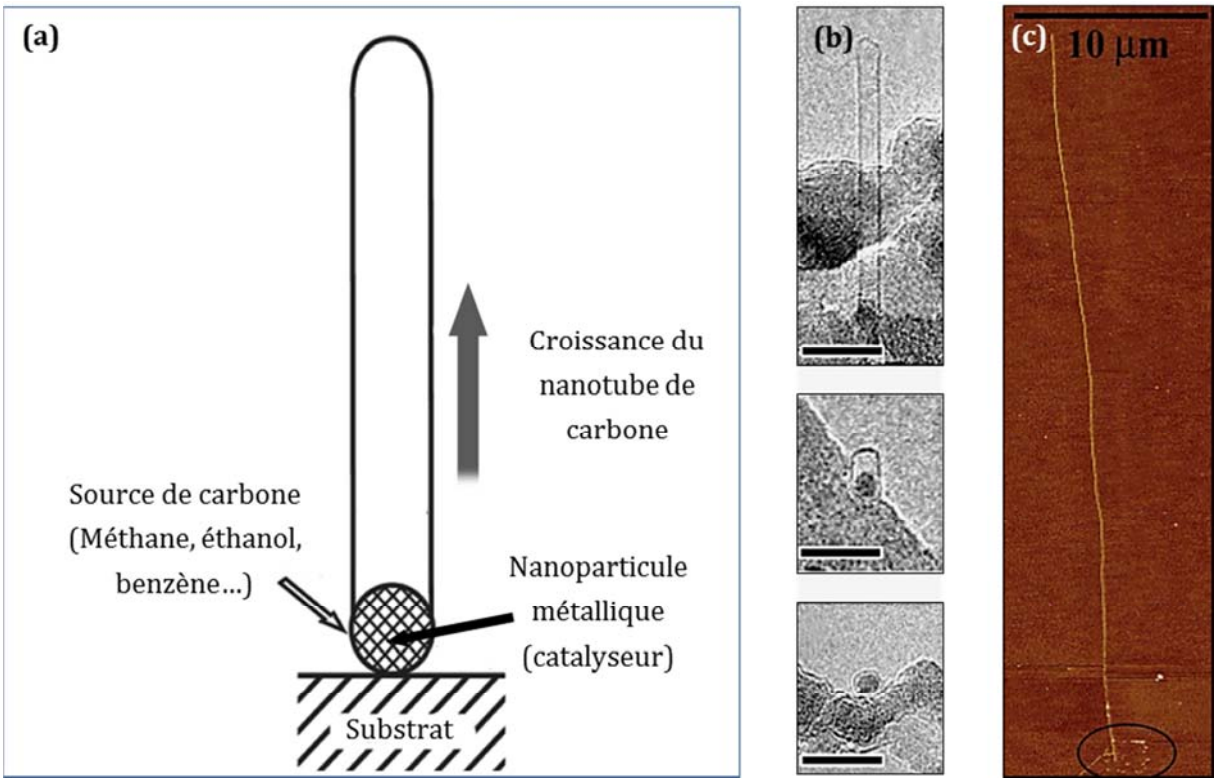


Figure 5 *:* Synthèse de SWNTC par DVC d'après Dai, (2002). (a) Principe de la synthèse sur une nanoparticule isolée. (b) Images en Microscopie Electronique à Transmission (MET) illustrant différentes étapes de croissance d'un SWNTC par ce procédé avec, de bas en haut : nanoparticule métallique (~2nm) enveloppée par une coque de graphene (la future extrémité du SWNTC), début de l'élongation par la base, et stade plus avancé de la synthèse (barre d'échelle = 10nm). (c) Image en microscopie à force atomique d'un SWNTC. Notez la longueur d'une cinquantaine de µm.

mono-paroi (Colomer *et al.*, 2000), double ou triple-paroi (Flahaut *et al.*, 2003 ; Vallés *et al.*, 2007). Ainsi, leur formation pourrait être comparée à la fabrication d'un tube de laine par un tricotin (Figure 5). Les DWNTC et MWNTC utilisés pendant la thèse ont été synthétisés par cette méthode. Cependant, les conditions de synthèse étaient différentes (précurseurs carbonés, particules métalliques, température différentes... Cf. Chapitre 2).

3.4 Purification

La purification des NTC peut être définie comme étant la séparation des NTC des autres entités issues de la synthèse de ces derniers telle que : les particules et NP métalliques, le carbone résiduel allotropique et les résidus carbonés organiques. C'est une étape importante afin d'obtenir des échantillons contenant essentiellement des NTC et, dans le cas de cette thèse, d'étudier spécifiquement l'effet de ces derniers sur les organismes et non d'un mélange NTC / résidus de synthèse (*eg*. Nanoparticules / ions métalliques et résidus carbonés tels que les Hydrocarbures aromatiques polycycliques) qui pourrait mener à une interprétation erronée ou du moins hasardeuse des résultats. La purification des NTC peut être réalisée de façons différentes. Bien que chaque producteur ai développé ses propres

techniques de purification, trois grands types de techniques sont majoritairement utilisés à l'heure actuelle : la purification en phase gazeuse, la purification en phase liquide et la purification par intercalation (Nanowerk, 2014).

La purification en phase gazeuse a été développée pour la première fois par Ebbesen and Ajayan (1992). Ces auteurs ont montré que les NTC pouvaient être purifiés par des gaz oxydants. Ce traitement permet d'éliminer la plupart des impuretés carbonées. Le principe est d'oxyder l'échantillon à haute température en présence d'acide (nitrique HNO_3 et/ou chlorhydrique HCl). Ce traitement provoque une forte oxydation, voire une destruction des NTC présentant des défauts de structure. En revanche, il a peu d'effet sur les NTC présentant peu ou pas de défauts. Ainsi cette technique mène à l'obtention de NTC ayant une excellente qualité structurale. De plus, elle permet de traiter facilement des grosses quantités d'échantillon. Elle présente cependant l'inconvénient de détruire une grande partie des NTC contenus dans l'échantillon de départ.

La purification en phase liquide, quant à elle, requiert différentes étapes. La première consiste en une séparation mécanique par filtration, permettant l'exclusion des grosses particules graphitiques. Cette étape est suivie par une dissolution chimique des fullerènes (dans des solvants organiques) et des résidus de catalyseur et substrats (dans des acides concentrés). Le choix des acides permet une fonctionnalisation ou non des NTC durant cette étape (Cf. § 3.5.1). Elle peut également être couplée à l'utilisation d'ultrasons qui facilite la solubilisation des impuretés. Enfin, des centrifugations et rinçages successifs par microfiltration permettent d'éliminer les résidus des attaques tout en conservant les NTC sur le filtre. Parfois, cette dernière étape est suivie d'une séparation des NTC par chromatographie (Ebbesen, 1997 ; Ebbesen *et al.*, 1994).

Une dernière technique, principalement utilisée pour purifier les NTC provenant de synthèse par arc électrique, consiste à purifier les NTC en intercalant des chlorures de métaux. Cette technique se base sur le fait que les NP et résidus graphitiques sont des structures relativement éparses et peuvent plus facilement êtres intercalés de divers métaux que les NTC, qui sont fortement agglomérés entre eux. Ainsi l'intercalation du chlorure de cuivre, servant de catalyseur d'oxydation avant sa réduction en cuivre métal, permet d'oxyder préférentiellement les NP « libres » en limitant l'attaque des faisceaux et pelotes de NTC. La première étape consiste à tremper l'électrode recouverte du dépôt de NTC dans un mélange de chlorure de cuivre et de potassium et de maintenir le mélange à 400°C durant une semaine. L'échantillon est ensuite rincé dans de l'eau dé-ionisée pour retirer l'excédent de chlorure de cuivre et potassium non intercalé. Le mélange est ensuite

progressivement chauffé à 500°C sous atmosphère d'hélium et d'hydrogène et maintenu à cette température pendant 1h. Cette étape va permettre la réduction en métal des chlorures intercalés. Enfin, l'échantillon est réchauffé sous flux d'air (atmosphère oxydante) jusqu'à 550°C. Le résidu obtenu se compose majoritairement de NTC. Cette méthode présente plusieurs désavantages. Le traitement est particulièrement agressif pour les tubes et entraine une destruction partielle. De plus, l'échantillon peut être contaminé par des résidus des intercalants.

Dans tous les cas, le choix des acides utilisés va permettre de limiter ou au contraire de favoriser la fonctionnalisation par oxydation des NTC. L'HCl présente par exemple un faible pouvoir de destruction des NTC et n'en attaque que modérément la structure externe, limitant ainsi leur fonctionnalisation (C'est cet acide qui a été utilisé pour traiter les NTC utilisés durant ces travaux de thèse). Au contraire, l'HNO_3 va fortement oxyder la surface des NTC, particulièrement en couplant son ajout à des ultrasons. De cette oxydation résulte la fonctionnalisation plus ou moins importante des NTC.

Bien qu'étant efficace pour le retrait des particules métalliques « libres », ces techniques se sont toutefois montrées infructueuses dans le cas des particules métalliques encapsulées dans les NTC ou enrobées de graphite (Pumera, 2007 ; Pumera and Iwai, 2009a, 2009b). Ce type d'impuretés peut toutefois être extrait tout en permettant une séparation contrôlée des NTC en fonction de leurs caractéristiques. Ceci se fait par ultracentrifugation dans un surfactant à gradient de densité, qui permet de séparer les NTC par diamètre et par comportement métallique ou semi-conducteur (Arnold *et al.*, 2006). Il est également possible de séparer ces deux types de NTC par migration par électrophorèse dans un surfactant. On obtient ainsi une strate pour chaque type de NTC qu'il est ensuite possible d'extraire par des agents chimiques (Arnold *et al.*, 2006 ; Krupke, 2003). Les détails de purification des NTC utilisés durant ces travaux de thèse sont donnés dans le chapitre 2 § 2.1.

3.5 Fonctionnalisation et dispersion

3.5.1 Fonctionnalisation

La fonctionnalisation des NTC consiste à modifier leur surface en y ajoutant différents groupements fonctionnels. Deux grands types de fonctionnalisation existent. La première consiste à rompre certaines liaisons covalentes entre les atomes de carbone formant la paroi du NTC, pour ensuite former de nouvelles liaisons avec différents groupements fonctionnels ou molécules. Ce type de fonctionnalisation est le plus souvent obtenu par oxydation des

NTC aboutissant à la formation à leur surface de nombreux groupes carboxyles (COOH). Ce phénomène peut se produire durant les phases de purification des NTC, lors d'utilisation d'HNO_3 ou par traitements aux ultrasons. Ces groupes carboxyles peuvent ensuite être modifiés par exemple par estérification (COO-R) ou amidisation (CONH-R). La fluorination et la substitution nucléophile, la fonctionnalisation électrochimique et photochimique (osmilation), sont d'autres moyens de fonctionnaliser les NTC, offrant une large gamme de possibilités (Balasubramanian and Burghard, 2005). Dans tous les cas, ces fonctionnalisations sont permanentes et destructives d'un point de vue structurel. Aucun des NTC utilisés durant les travaux de cette thèse n'étaient fonctionnalisés de cette manière. Nous ne développerons donc pas plus ici les techniques employées.

Le deuxième type de fonctionnalisation est dit non covalent. Cette fonctionnalisation n'altère pas la structure externe du NTC. Elle consiste en l'adsorption de diverses molécules (*e.g.* surfactants, biomolécules) à la surface des NTC en y formant un dépôt plus ou moins homogène (Liu *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2009 ; Figure 6a-b). Ainsi, cette fonctionnalisation est conservatrice (d'un point de vue structurel) et potentiellement réversible, *via* des traitements chimiques ou cuisson, qui permettent de nettoyer les NTC sans en altérer la structure (des phénomènes d'hystérésis sont toutefois envisageable). Cet « enrobage » permet de donner des propriétés différentes aux NTC [13]. Cette fonctionnalisation est rendue possible par l'hybridation majoritairement de type sp^2, résultant de systèmes π-π, entre les atomes de carbone constituant les NTC (Mu *et al.*, 2014). Les fortes interactions entre les NTC et autres NP carbonées (graphène, fullerènes) avec diverses molécules organiques peut d'ailleurs résulter du même type d'interaction (Hunter and Sanders, 1990; Nakashima *et al.*, 2002; Yang and Xing, 2009, 2009) en plus d'interactions hydrophobes et électrostatiques ou de Van der Waals (Fifield *et al.*, 2004 ; Holzinger *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2003). C'est tout particulièrement le cas avec certaines protéines et des phospholipides. Ce sont les groupes aromatiques composant la paroi des NTC et les résidus aromatiques et groupements amines qui jouent un rôle déterminant dans l'interaction entre ces molécules et les NTC (dans le cas de NTC ne présentant pas de fonctionnalisation covalente (Mu *et al.*, 2014). En effet, si les NTC sont recouverts de matières organiques, il peut se former des ponts cationiques (avec des ions divalents ou trivalents entre les molécules). Ce sont ces différents types d'interactions qui sont responsables de la plus ou moins forte affinité entre les NTC et les organismes, plus particulièrement les membranes plasmiques composées en grande partie de phospholipides et de protéines transmembranaires, péri et extracellulaire (Cf. § 5.1).

[13] En pratique, les expériences de sorption entre les substances hydrophobes montrent une rétention des espèces adsorbées. En termes de chimie environnementale on parle alors de vieillissement (« aging »).

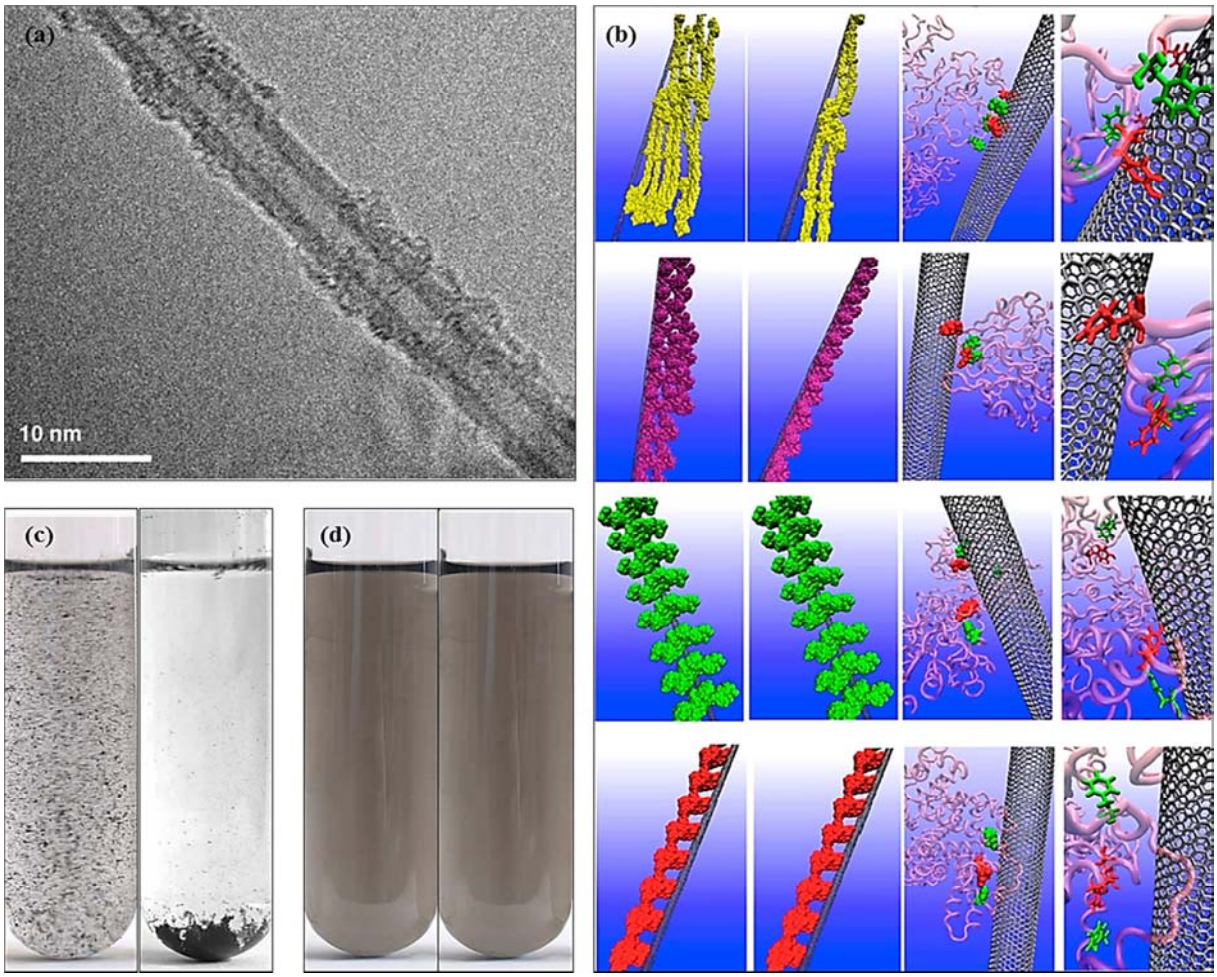


Figure 6 : (a) Image en MET d'un MWNTC fonctionnalisé avec de l'acide alginique (d'après Liu et al., 2006). (b) Illustration de différentes fonctionnalisations non covalentes avec des molécules biologiques (protéines) montrant la modélisation de l'interaction entre, de haut en bas, du fibrinogène bovin, immunoglobuline, transferrine et BSA (Bovine Serum Albumin). Et de gauche à droite après 10mn d'incubation, après 5 h d'incubation, localisation des sites d'interaction préférentiels entre SWNTC (en gris) et protéines les acides aminés impliqués représentés correspondent à la tyrosine (rouge) et la phénylalanine (vert), deux acides aminés aromatiques. Le reste de la protéine est matérialisé en rose. D'après Ge et al. 2011. (c) 10 mg L^{-1} de MWNTC juste après dispersion par ultrasons et après 24h de repos. (d) mêmes conditions que précédemment mais avec ajout de 10 mg L^{-1} de Matière Organique Naturelle (MON) avant dispersion par ultrasons. (Photos c et d : L. Verneuil, EcoLab).

3.5.2 Dispersion et mise en suspension

La dispersion des NTC consiste, comme son nom l'indique, à séparer les NTC les uns des autres. Elle peut être plus ou moins permanente et s'accompagne d'une mise en suspension des NTC. La dispersion des NTC peut être réalisée de façon mécanique (agitation manuelle, ultra-sons, vortex, ultraturax…). Cependant les NTC ont ensuite tendance à se ré-agglomérer rapidement et reformer des amas de NTC via principalement des forces de Van der Waals. Pour éviter cela, les NTC peuvent subir une fonctionnalisation (covalente ou non ; Cf. § 3.5.1) qui va stabiliser la dispersion dans le temps (Figure 6 c-d). Le plus souvent, il est choisi une fonctionnalisation non covalente par ajout de molécules (souvent organiques), permettant la dispersion des NTC en milieu aqueux, ceci leur conférant un caractère hydrophile par

adsorption de ces molécules sur les zones hydrophobes présentes à leur surface. Cette répulsion va pouvoir être également provoquée par des forces électrostatiques. Ces dernières sont également en partie responsables de certaines des interactions observées avec différentes particules métalliques et autres substrats (Jiang *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2005). La stabilité de la dispersion va varier en fonction de la molécule choisie ainsi que de divers paramètres environnementaux (pH, température, concentration en ions... (Mu *et al.*, 2014).

4 Les écosystèmes aquatiques d'eau douce face aux nanotubes de carbone

Les écosystèmes aquatiques continentaux sont définis comme étant les zones aquatiques, permanentes ou temporaires, présentes sur les continents. Ils ne constituent que 2,5% du volume total d'eau sur la planète, le reste étant représenté par les milieux aquatiques halins, soit 97,5%. De plus, la majorité de l'eau douce se trouve à l'état solide (environ 73,4%) dans les calottes glaciaires et à l'état liquide dans le sol (aquifère, lacs et rivières souterraines, paroi de cavernes, terre ; environ 26%). Ainsi, les eaux liquides de surface ne représentent en fait que 0,6% de l'eau douce sur la planète (Lévêque, 1996). Qu'ils soient lotiques (rivières, fleuves, embouchures de fleuves…) ou lentiques (lacs, étangs, mares…), parfois extrêmes (sources hydrothermales, et hyper alcaline, lacs et rivières acides…), les écosystèmes d'eau douce de surface présentent une diversité très importante, liée à des paramètres physicochimiques qui déterminent leurs caractéristiques fonctionnelles. Ces écosystèmes abritent tous de nombreux organismes et jouent un rôle essentiel pour la vie sur les continents. Les écosystèmes continentaux de surface sont caractérisés par une grande interface entre l'air et l'eau ainsi qu'entre l'eau et les sédiments. Ceci est lié à leurs faibles rapports profondeur/surface en comparaison des milieux marins. Cette particularité permet des échanges importants entre ces différents compartiments. Depuis maintenant un siècle et demi, ces écosystèmes ont été fortement modifiés par l'homme d'un point de vue structurel (barrages, déviations…). Leur pollution croissante (rejets agricoles, industriels et ménagers) a également contribué à ces modifications. En effet, ces écosystèmes, en aval des bassins versants, sont essentiellement alimentés par les eaux de ruissellement et d'infiltration. Durant cette étape, ces eaux vont se charger en nutriments, mais également en contaminants. Ces derniers peuvent ensuite se concentrer dans des zones plus aval, pouvant

générer des puits de contaminants plus ou moins re-mobilisables[14]. Les écosystèmes aquatiques vont donc être fortement sujets à l'accumulation des contaminants. C'est particulièrement le cas dans les zones anthropisées (agriculture, urbanisation, industries…), mais il est aujourd'hui admis que tous les fleuves et cours d'eau de la planète présentent des contaminations de plus ou moins grande amplitude. Depuis une vingtaine d'années, les écosystèmes doivent faire face à un nouveau type de polluants : les nanoparticules manufacturées, parmi elles les NTC.

4.1 Les NTC dans les environnements aquatiques : voies de contamination, quantités impliquées et répartition.

Les rejets de NTC dans l'environnement peuvent se faire durant tout leur cycle de vie. C'est-à-dire de leur production jusqu'à leur disparition complète (abrasion, biodégradation, transfert dans d'autres compartiments…), en passant par leur transformation (incorporation dans des produits manufacturés), l'utilisation et le recyclage de ces produits dérivés (dans le meilleur des cas…) et/ou leur rejet dans l'environnement (Gottschalk *et al.*, 2010 ; Piccinno *et al.*, 2012). Il a par exemple été montré que la simple manipulation de SWNTC pouvait engendrer la dispersion de faibles quantités dans l'air ainsi qu'un dépôt sur les gants des manipulateurs (Maynard, 2006 ; Maynard *et al.*, 2004). Du fait des températures élevées nécessaires à la combustion complète des NTC (souvent > 850°C), la phase d'incinération des matériaux contenant des NTC ou contaminés par ces derniers, en constitue une étape déterminante sur leur devenir et leur potentiel rejet dans l'environnement. Une incinération insuffisante peut ainsi conduire à une accumulation de NTC dans les cendres. Toutefois, ces dernières, normalement traitées dans des Installations de stockage de déchets dangereux (ISDD) ne devraient théoriquement pas être rejetées (directement) dans l'environnement (Koelmans *et al.*, 2009). L'usure des matériaux contenant des NTC va probablement représenter une forte part dans le rejet non contrôlé de NTC et plus généralement de NP dans la nature. Comme de nombreux autres polluants, les NTC relâchés dans l'environnement vont ensuite pouvoir être transportés et déposés via différents vecteurs. Les vents et autres turbulences atmosphériques, les précipitations, le ruissèlement, le rejet d'eaux usées et l'épandage de boues de stations d'épuration, ainsi que le déversement accidentel lors de leur manipulation ou leur synthèse, en constituent la majeure partie (Klaine *et al.*, 2008). Une partie des NTC risque de finir dans les milieux aquatiques en aval des bassins versants. La répartition et le comportement de ces NP dans

[14] Ceci va dépendre des temps de demi-vie des contaminants ainsi que du comportement de ces derniers dans le milieu (*eg.* volatilisation, solubilisation, précipitation)

les environnements aquatiques dépendent de nombreux facteurs. Ainsi, leur composition chimique, leur masse, leur concentration, leur surface spécifique, leur distribution de taille, leur charge de surface ou potentiel Zeta[15], ainsi que la nature des dispersants et éventuellement celle des autres matériaux associés (composites), peuvent jouer un rôle sur le comportement et le devenir de NTC dans l'environnement (Klaine *et al.*, 2012, 2008 ; Navarro *et al.*, 2008 ; Schäfer *et al.*, 2013 ; von der Kammer *et al.*, 2012). Dans le cas des NTC, les groupements fonctionnels (covalents ou non) plus ou moins présents à leur surface (Cf. § 3.5.1) jouent également un rôle important dans leur comportement (Kennedy *et al.*, 2008). C'est aussi le cas des substances organiques naturelles (*eg.* acides humiques, acides fulviques, matière organique naturelle, extraits de tourbe), présentes en grandes quantités dans la plupart des écosystèmes aquatiques, qui peuvent également permettre la dispersion et le maintien en suspension des NTC (Cf. § 3.5.2) et en modifier le comportement environnemental (Bouchard *et al.*, 2012 ; Gao *et al.*, 2009 ; Hilding *et al.*, 2003 ; Hyung *et al.*, 2007 ; Yang and Xing, 2009 ; Zhang *et al.*, 2012). Au contraire, certaines biomolécules ou colloïdes peuvent accélérer l'agglomération des NP et permettre leur sédimentation (Quik *et al.*, 2014). Les effets sur le vivant ainsi que le devenir des NTC dans l'environnement risquent fort d'être influencés par ces changements de comportement (Navarro *et al.*, 2008; Nowack *et al.*, 2012; Nowack and Bucheli, 2007; Wick *et al.*, 2007). Les quantités de NTC (manufacturés ou non) présentes dans les différents compartiments environnementaux, ainsi que les quantités annuellement rejetées, restent incertaines et très peu de données sont actuellement disponibles (Gordon *et al.*, 2014). De plus, à notre connaissance, aucune mesure de la concentration en NTC dans des eaux de surfaces naturelles n'a encore été réalisée avec succès. Bien que certaines techniques soient prometteuses (Doudrick *et al.*, 2012), les mesures dans les sédiments ont également été infructueuses dans le cas d'échantillons naturels ou de faibles concentrations (Petersen *et al.*, 2011). Farré *et al.* (2010) sont toutefois parvenus à quantifier trois types de fullerènes dans divers effluents de stations d'épuration en Espagne, montrant des concentrations variant fortement entre les sites (de 0,5 ng L^{-1} à 67 µg L^{-1}). Ces dernières croissaient avec les degrés d'anthropisation, malgré une origine (manufacturée ou production involontaire issue de la combustion) restant inconnue, mais pourrait résulter de la combustion d'énergies fossiles et/ou d'activité industrielle. Ces résultats mettent en avant le fait qu'une quantité non négligeable de NP carbonées non manufacturées issues de l'activité anthropique puisse déjà être présente dans l'environnement.

[15] Charge électrique qu'une particule acquiert, grâce aux ions qui l'entourent, quand elle est en solution.

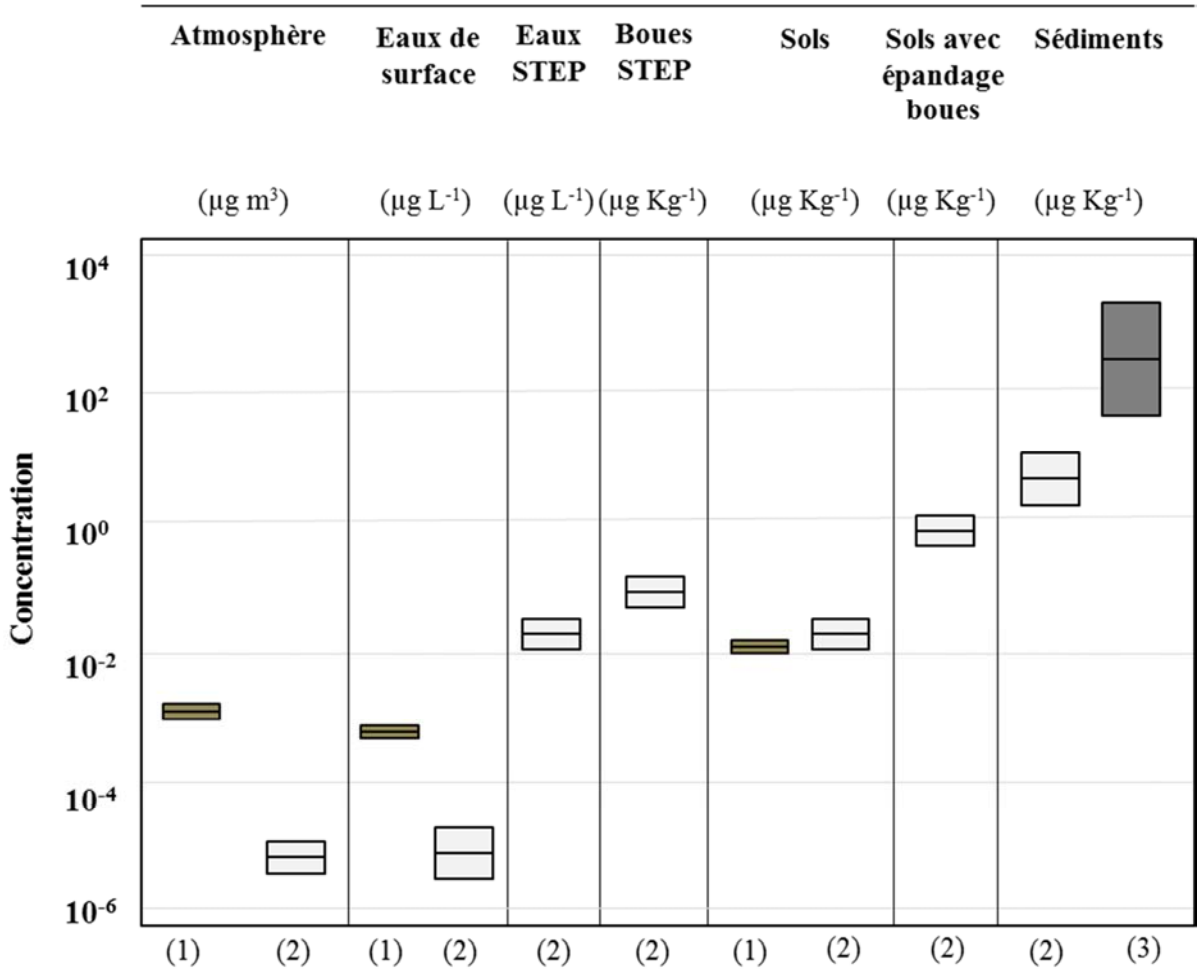


Figure 7 : Concentration en NTC résultats des modèles de : (1) Mueller et Nowack., 2008 (à l'échelle de la Suisse; (2) Gottschalk et al., 2009 (à l'échelle de l'Europe) ; (3) Koelmans et al., 2009 (pour Des lacs à faible et fort taux de sédimentation). Synthèse d'après la revue de Gottschalk et al., 2013

Gottschalk *et al.* (2013) ont recensé de façon exhaustive dix années de recherche visant à quantifier les rejets et les flux de NP manufacturées dans l'environnement. Au final, seulement quatre études se sont intéressées à l'évaluation de la présence des NTC dans les écosystèmes aquatiques (Gottschalk *et al.*, 2009 ; Gottschalk and Nowack, 2012 ; Koelmans *et al.*, 2009 ; Mueller and Nowack, 2008). Un récapitulatif des différents résultats est présenté en Figure 7. Une étude plus récente modélise les mêmes tendances en Europe avec des concentrations en NTC dans l'eau de l'ordre de 0,23 ng L^{-1} et une accumulation dans les sédiments de 0,79 µg/Kg/an (Sun *et al.*, 2014). Ces études ne se basent malheureusement que sur des estimations et n'ont jamais pu être validées expérimentalement par des mesures environnementales. Ce problème extrêmement récurent à l'heure actuelle est lié aux lacunes méthodologiques et technologiques importantes concernant l'analyse quantitative et qualitative des NP, particulièrement dans le cas de concentrations réalistes et en conditions environnementales (Petersen *et al.*, 2011). Cependant, tous les modèles s'accordent à prédire une concentration importante des NTC dans les sédiments, alors que les

concentrations estimées dans la colonne d'eau restent très inférieures. Ceci est lié au renouvèlement permanent de l'eau par le courant (milieux lotiques) et à la sédimentation et agglomération des NTC entre eux, sur et dans les sédiments. Bien que les valeurs exactes ne soient connues, ces différents résultats laissent présager une exposition plus importante des organismes benthiques et fouisseurs aux NTC que des organismes planctoniques (Gottschalk *et al.*, 2013). Une étude en mésocosmes a récemment confirmé cela, révélant que 99% de SWNTC ajoutés au départ (2,5 mg L^{-1}) avaient sédimenté en moins de 48h, pour ensuite s'accumuler dans la partie supérieure des sédiments (Schierz *et al.*, 2014).

4.2 Dégradabilité et Biodégradabilité

La dégradabilité et la biodégradabilité d'une molécule ou ici d'une NP vont être un facteur déterminant pour en évaluer les risques environnementaux. Elles sont par exemple essentielles pour la modélisation des flux de NP dans les écosystèmes, de l'évaluation de leur rémanence ainsi que des stratégies d'exposition pour évaluer leur toxicité. Pourtant, peu d'études ont été menées sur ce sujet. Certains auteurs ont toutefois montré *in vitro* que différentes enzymes comme la myeloperoxydase pouvaient, en présence d'H_2O_2, catalyser la dégradation des NTC. Cette dégradation pourrait être catalysée *in vivo* par des radicaux réactifs intermédiaires de la myeloperoxydase produite par les neutrophiles et des macrophages (Kagan *et al.*, 2010). La biodégradation catalysée de NTC par la peroxydase du raifort[16] (en anglais horse radish peroxydase) a également été obtenue *in vitro* après plusieurs semaines d'incubation en présence de peroxyde d'hydrogène (Allen *et al.*, 2009). Cependant, l'efficacité de ces enzymes a seulement été montrée *in vitro*, dans des conditions particulières (fortes concentration d'H_2O_2, plusieurs semaines d'incubation) et dans le cas de NTC oxydés (*i.*e. dont la surface est partiellement dégradée, Cf. § 3.5.1). Ces travaux, bien qu'essentiels pour la compréhension des voies et mécanismes de biodégradation, ne permettent pas toutefois de rendre compte de la réelle efficacité de ces enzymes *in vivo* et en conditions naturelles. Une étude plus récente visant à évaluer la biodégradabilité des NTC en milieux aqueux et en présence d'un inoculum bactérien n'a montré aucune biodégradation des NTC après un mois d'incubation (Kümmerer *et al.*, 2011). En revanche, Zhang *et al.* (2013) ont plus récemment montré qu'après une longue période de contact, certaines bactéries (potentiellement : *Burkholderia kururiensis*, *Delftia acidovorans*, et *Stenotrophomonas maltophilia*) avaient dégradé des MWNTC radio-marqués, en différents produits intermédiaires allant jusqu'au CO_2 , et ceci uniquement en présence d'une source

[16] Non scientifique : *Armoracia rusticana*

externe de carbone organique via un co-métabolisme. Malgré tout, ces études mettent avant le risque d'une forte rémanence de ce type de NP dans l'environnement.

4.3 Détecter les NTC dans les organismes et l'environnement : un enjeu majeur pour l'évaluation du risque.

A l'heure actuelle, un des problèmes majeurs pour la quantification des NTC dans les organismes et l'environnement réside dans leur limites de détection par les instruments de mesure disponibles (Hristozov *et al.*, 2013 ; Irin *et al.*, 2012 ; Petersen *et al.*, 2011 ; Porter *et al.*, 2007). Plusieurs méthodes ont pourtant été mises en œuvres pour arriver à cette fin. Le Tableau 1 présente chacune d'entre elles en mettant an avant leur intérêt et leurs limites. Dans tous les cas, exception faite de la radiodétection de NTC radioactifs (uniquement expérimental), la plupart d'entre elles ne permettent pas une détection à des concentrations environnementales dans les matrices biologiques ou dans les milieux physiques complexes (sédiments, boues…). De plus, la mise en œuvre de certaines techniques (*e.g.* MET) sont hasardeuses et peuvent facilement mener à de mauvaises interprétations des images et résultats obtenus, ceci lié au fait que des NTC puissent être déplacés à l'intérieur des échantillons durant leur préparation[17] (Bourdiol *et al.*, 2013 ; Petersen *et al.*, 2011). Une autre technique prometteuse pour la quantification de NTC est leur dosage indirect par les résidus métalliques de synthèse qu'ils contiennent (Schierz *et al.*, 2014). Cependant, ceci reste possible uniquement en connaissant la concentration et la nature des métaux utilisés lors de la synthèse (qui peuvent fortement varier en fonction des méthodes), ainsi que les concentrations initiales de ces derniers dans le milieu. Ainsi, aucune technique analytique permettant de détecter et quantifier de façon fiable des NTC en concentration environnementale n'a été développée jusqu'à récemment (von der Kammer *et al.*, 2012). Une nouvelle étude utilisant une méthode de détection de DWNTC dans des organismes, basée sur la relaxation diélectrique de suspensions soumises à un champ électromagnétique pulsé (mesures de permittivité à 5GHz), a permis de diminuer le seuil de détection de DWNTC à 0,02 µg (Bourdiol *et al.*, 2014) et ainsi se rapprocher de concentrations environnementales. Cette technique n'a cependant pas encore été testée sur des échantillons environnementaux tel que des sédiments ou des eaux.

[17] A la fois l'inclusion dans des résines, ainsi que les micro-coupes nécessaires à la préparation d'échantillons biologiques en vue d'observation en MET, peuvent entraîner des NTC sur l'ensemble de l'échantillon et donner des faux positifs pouvant laisser croire à une entrée des NTC dans l'organisme, alors qu'il n'en est rien.

Tableau 1 : Techniques d'indentification et quantification des NTC dans l'environnement (d'après Petersen et al., 2011). Les techniques marquées d'une étoile sont celles qui ont été utilisés durant ces travaux de thèse.

Technique	*Mode opératoire*	*Points forts*	*Limites*
Marquage radioactif	*mesure les émissions beta du carbone 14*	*détecte les CNTs dans toutes les matrices, quantitatif, permet d'évaluer leur dégradation. faibles limites de détection*	*coût élevé, questions de sécurité, disponibilité limitée*
Spectro-fluorimétrie	*détecte l'absorption et l'émission de photons dans une gamme proche de l'infra-rouge*	*limite de détection basse, permet d'examiner la bio distribution avec un microscope*	*test seulement les SWCNT semi-conducteurs dispersés individuellement*
*Spectroscopie Raman **	*détecte les pics caractéristiques des CNT*	*permet la détection de CNT dans les tissus*	*qualitative*
Transmittance optique thermique	*brule des échantillons aqueux et mesure la perte de poids à différentes températures*	*quantitative, peut être utilisé en présence de matière organique dissoute*	*équipement rare, seulement pour des solutions aqueuses*
*Microscopie optique **	*identifie visuellement les gros agrégats de nanoparticules de carbone*	*facilement accessibles dans de nombreux laboratoires d'écologie*	*qualitatif, non spécifique, seulement pour les très gros agrégats*
*Microscopie Electronique à Transmission (MET) **	*visualise l'absorption ou la diffusion d'un faisceau à travers un échantillon*	*haute résolution, identification possible des nanoparticules carbonées en utilisant la spectroscopie de pertes d'énergie des électrons (EELS)*	*les échantillons aqueux requièrent généralement un séchage. L'identification par EELS nécessite une expertise peu courante, la préparation des tissus et la localisation des CNTs dans les échantillons est difficile*
*UV / vis absorbance **	*mesure l'absorbance des échantillons liquides à différentes longueurs d'ondes*	*facilement accessibles dans de nombreux laboratoires d'écologie*	*possibles interférences provenant des composants de l'échantillon (eg. NOM)*
coherent anti-Stokes Raman scattering	*augmente le contraste des différentes fréquences de vibrations dans un échantillon (par rapport au spectre Raman spontané)*	*permet d'identifier des nanoparticules dans les tissus sans préparation préalable des échantillons*	*non spécifique au type de particules, disponibilité limitée*
oxydation chimio-thermique à 375°C	*supprime le carbone organique et inorganique de l'échantillon pour isoler le noir de carbone et tester sa concentration on carbone*	*mesures quantitatives de la concentration en nanotubes de carbone dans les sols*	*faible précision, seulement testé pour des fortes concentrations en CNT*
*Microscopie bi-photonique**	*excite les échantillons avec des photons et en mesure la fluorescence*	*permet de détecter des CNT individualisés dans les tissus*	*disponibilité limitée*
*Microscopie électronique à balayage (MEB) **	*mesure les électrons secondaires émis par l'échantillon*	*permet d'observer la surface des organismes ou de coupes, plus rapide et plus courant que le TEM*	*qualitatif, plus faible résolution que celle du TEM*
imagerie photo-thermique / photo-acoustique	*mesure la chaleur ou le signal acoustique issu de la conversion de l'énergie d'un laser absorbée par l'échantillon*	*détecte la répartition de groupes de CNT dans les tissus à l'aide d'un dispositif de microscopie*	*disponibilité limitée, des coupes fines sont nécessaires, qualitatif*

5 Effets sur les organismes : des risques encore mal connus

Les NP peuvent interagir par différents mécanismes avec les organismes et les biomolécules qui les constituent ou qu'ils produisent. Les effets observés peuvent varier en fonction des différentes caractéristiques des NP, du milieu (microenvironnement) ainsi que de la nature des biomolécules composant ou sécrétées par l'organisme (Figure 8). Plus précisément, les effets des NTC vont particulièrement dépendre : (i) du type de NTC étudié (taille, diamètre et nombre de parois, chiralité, défauts de structure, fonctionnalisation et chimie de surface…), (ii) de la présence, de la nature et de la quantité des résidus métalliques provenant de la synthèse et la transformation (substrats, catalyseurs, air ambiant, sonotrode…), sous forme de NP, ou de la dégradation de ces dernières (formes dissoutes), (iii) des modes de dispersion, (*e.g.* agitation manuelle ou par agitateurs magnétiques : ultraturax, ultrasons : bains, sonotrode, agents dispersants (*e.g.* Sodium Dodecyl Sulfate, Tween 20, Triton X100, acides humiques ou fulviques, matière organique naturelle) souvent couplés à une dispersion mécanique afin d'accélérer et/ou favoriser la dispersion), et enfin : (iv) des impuretés résiduelles issues de la combustion (hydrocarbures, acides carboxyliques; suies et autres particules ou NP carbonées : graphite et graphène, carbone amorphe, fullerènes), souvent négligées, voire occultées dans les études toxicologiques (Lam *et al.*, 2006). De plus, il faut avoir conscience que dans tous les cas, une fois dans l'environnement, les NP vont rapidement êtres recouvertes de nombreuses molécules biologiques. Les interactions et conséquences pour les organismes exposés vont d'ailleurs être plus souvent liées à la présence de cet enrobage plutôt qu'à la nature et aux propriétés des NP elle mêmes. Cet enrobage (fonctionnalisation non covalente) va en effet modifier le comportement des NP et donc leurs effets sur les organismes (Walczyk *et al.*, 2010).

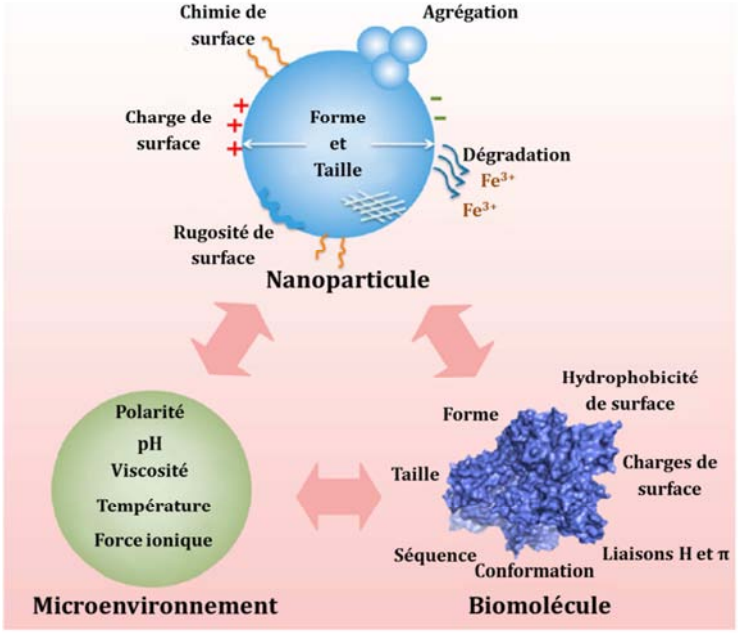


Figure 8 : Facteurs influençant les interactions nanoparticules-biomolécules d'après Mu et al. (2014).

Les tests toxicologiques classiques visant à déterminer la toxicité des NTC à l'échelle de l'organisme, des organes, des tissus, des cellules ou au niveau moléculaire ont déjà permis de mettre en avant une sensibilité généralement plus importante (sur des tests à courts termes : mortalité, croissance, stress oxydant…) chez les invertébrés que chez les vertébrés (Blaise *et al.*, 2008). C'est également le cas pour les organismes aquatiques (*e.g*. *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*), en comparaison avec les organismes terrestres (*e.g*. *Drosophilla melanogaster*, *Eisenia veneta*, *Solanum lycopersicum*). Enfin, la toxicité, ou en tout cas les effets délétères des SWNTC, sont généralement plus importants que ceux des MWNTC (Jackson *et al.*, 2013). Les tests éco-toxicologiques doivent quant à eux s'intéresser à l'évaluation de l'impact environnemental (à l'échelle des populations, des communautés, et des écosystèmes) des NTC tels qu'ils seront présents dans l'environnement (présence de résidus métalliques, inclusion dans des polymères, interaction avec des matrices environnementales…) pour une évaluation pertinente du risque lié à ces matériaux à l'échelle des écosystèmes (Basiuk *et al.*, 2011).

Globalement, les études visant à évaluer les effets des NP à long terme et en conditions réalistes (concentrations en NTC, sur des communautés d'organismes aquatiques ?…) sont rares. Concernant les NTC, la première étude réalisée est celle de Velzeboer *et al.* (2013). Ces chercheurs ont montré qu'après une période de 15 mois d'exposition en conditions naturelles (« caging ») à de faibles concentrations de MWNTC (≥ 2 mg L^{-1} ; toutefois encore bien supérieures à celles estimées par les modèles comme le montre la Figure 7) dans les sédiments, la diversité d'une communauté d'invertébrés benthiques naturelle dulçaquicole (Oligochètes, Hirudinées, gastéropodes, bivalves, arachnides crustacés et insectes) était impactée. Un fait important est que, contrairement à la plupart des résultats d'études toxicologiques, c'était ici la présence des NTC plus que leur concentration qui était à l'origine des variations observées. Une étude plus récente en mésocosmes évaluant le comportement à long terme de SWNTC dans les zones humides, a également montré qu'aucune bioaccumulation quantifiable ne se produisait après une longue période d'exposition (12 mois), que ce soit chez les plantes aquatiques (*Elodea canadiensis*, *Lemna minor*), palustres (*Lobelia elongate*, C*arex lurida*, *Panicum virgatum*, *Juncun effusus*) ou les animaux exposés (*Gambusia holbrookis*) et ceci malgré une ingestion régulière de SWNTC par les poissons durant leur alimentation (Schierz *et al.*, 2014). Dans tous les cas, la plupart des études visant à évaluer les effets des NTC chez différents organismes aquatiques (pélagiques, planctoniques et benthiques) ont montré que l'émergence des nanotechnologies présente un risque, particulièrement pour le compartiment benthique, du fait d'une sédimentation

rapide et importante des nanoparticules (Blaise *et al.*, 2008 ; Jackson *et al.*, 2013 ; Schierz *et al*. 2014). La plupart des auteurs s'accorde également à dire que l'évaluation des effets des NP doit se faire par une meilleure compréhension de la relation structure des NP / effet sur les organismes, qui semblent être un point clé de la nano-toxicologie (Winkler *et al.*, 2013). Il a de plus été montré que la dispersion des NTC (par ces substances ou d'autres), en plus d'influencer leur comportement environnemental, peut fortement modifier leur effets (toxiques ou du moins délétères) sur le vivant (Bourdiol *et al.*, 2013 ; Edgington *et al.*, 2010; Mouchet *et al.*, 2011 ; Schwab *et al.*, 2011). Un autre risque lié aux NP carbonées dans l'environnement réside dans leur pouvoir de concentration et de potentialisation des effets, *via* des phénomènes d'adsorption et désorption de différents métaux sous forme nano particulaire ou ionique, ainsi que divers polluants organiques persistants (Baun *et al.*, 2008 ; Kah and Hofmann, 2014 ; Li *et al.*, 2003a, 2003b, 2002; Navarro *et al.*, 2008 ; Tuzen *et al.*, 2008). De ce mécanisme pourrait découler une potentialisation des effets de ces polluants, particulièrement en cas d'entrée dans les organismes.

5.1 Interaction à l'échelle cellulaire

Comprendre les interactions entre NP et organismes à l'échelle cellulaire est un point clé pour l'évaluation des effets sur le vivant. Cette partie présente les différentes interactions connues entre les NTC et différents compartiments cellulaires, ainsi que les conséquences possibles pour la cellule, ceci en partant de la zone péri-cellulaire en allant jusqu'au noyau.

5.1.1 Avec les biomolécules extracellulaires

Les cellules produisent de nombreuses molécules qui vont être excrétées. Ces substances, en fonction de leur nature et leur structure, vont pouvoir remplir différents rôles.

Les substances extracellulaires sont principalement constituées de protéines et de glucides, ou molécules assimilées (peptides, polypeptides) et hybrides (glycoprotéines). Ce sont des molécules non constitutives de la membrane, que l'on appelle plus communément mucus chez les animaux et Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) chez les organismes unicellulaires tels que les algues. Elles vont assurer diverses fonctions dans le maintien d'un microenvironnement péri-cellulaire propice pour la vie des cellules (détaillé ultérieurement Cf. § 6.2).

Du fait de leur nature, nombreuses de ces molécules vont pouvoir interagir avec les NP (Hajipour *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2012). Les NTC vont préférentiellement interagir avec les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) via des interactions π-π et hydrophobes (Ge *et al.*, 2012, 2011 ; Figures 6, 8).

C'est d'ailleurs des structures cycliques, aromatiques, présentes chez les glucides et les acides humiques et fulviques qui sont impliquées dans l'interaction entre ces divers composés organiques et les NTC (Hyung *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2003). Elles peuvent contribuer à l'agglomération des NP hydrophobes et ces dernières vont en modifier la cinétique d'assemblage, majoritairement régie par des interactions hydrophobes (Chen *et al.*, 2011, 2013). Ces SPE et mucus pourraient également être impliqués dans la protection contre les NTC et autres NP, en en facilitant l'agglomération (Resende *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2010). Les travaux présentés ultérieurement dans cette thèse ont d'ailleurs été focalisés sur ce point.

5.1.2 Avec la membrane plasmique

Chez les métazoaires[18], la membrane plasmique (aussi appelée membrane cellulaire) va constituer la seule barrière entre le contenu intracellulaire et les milieux extérieurs. Elle est constituée d'une bicouche lipidique (phospholipides principalement) dans laquelle sont implantées différentes molécules, dont certaines présentent des compositions et structures comparables à celle des SPE (*e.g*. protéines, oligosaccharides et polysaccharides, glycolipides). Ces substances constitutives de la membrane plasmique, (Figure 9), présentent des extensions externes et sont impliquées dans différents processus dont la communication intercellulaire, l'adhésion entre cellules et le captage de nutriments. Ces dernières peuvent également constituer des récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance de molécules, particules et autres corps étrangers (*e.g*. virus et bactéries) et participer à leur phagocytose, leur pinocytose, leur transit cellulaire (via la formation d'endosomes) ou leur exclusion *via* la membrane plasmique (Figure 9, 10). Ainsi, ces différentes molécules peuvent interagir de façon plus ou moins forte avec les NTC et autres NP (Kam and Dai, 2006, 2005 ; Kam *et al.*, 2006 ; Mu *et al.*, 2014). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas clairement établis et puissent dépendre de la nature des NP considérés, ces molécules et plus globalement la membrane plasmique ont un rôle important dans l'internalisation éventuelle des NTC et autres NP, ainsi que leur transport intracellulaire (Moore, 2006 ; Walczyk *et al.*, 2010). Les NTC peuvent également induire des modifications de ces molécules membranaires et, par divers mécanismes, en perturber le fonctionnement (Nel, 2006 ; Nel *et al.*, 2009). Kostarelos *et al.* (2007), s'intéressant au

[18] Organismes pluricellulaires, présentant des tissus plus ou moins spécialisés, souvent mobiles et, dans la grande majorité des cas, hétérotrophes. Ce clade représente donc les animaux au sens strict (taxon : Animalia d'après la classification actuelle). Certains métazoaires vivent en symbiose avec des algues (*e.g*. de nombreux coraux, certaines méduses et éponges, et l'amphibien *Ambystoma maculatum*) ou des Kleptoplastes (*e.g*. *Elysia chlorotica*). Ils sont ainsi partiellement, voire dans certains cas, totalement autotrophes.

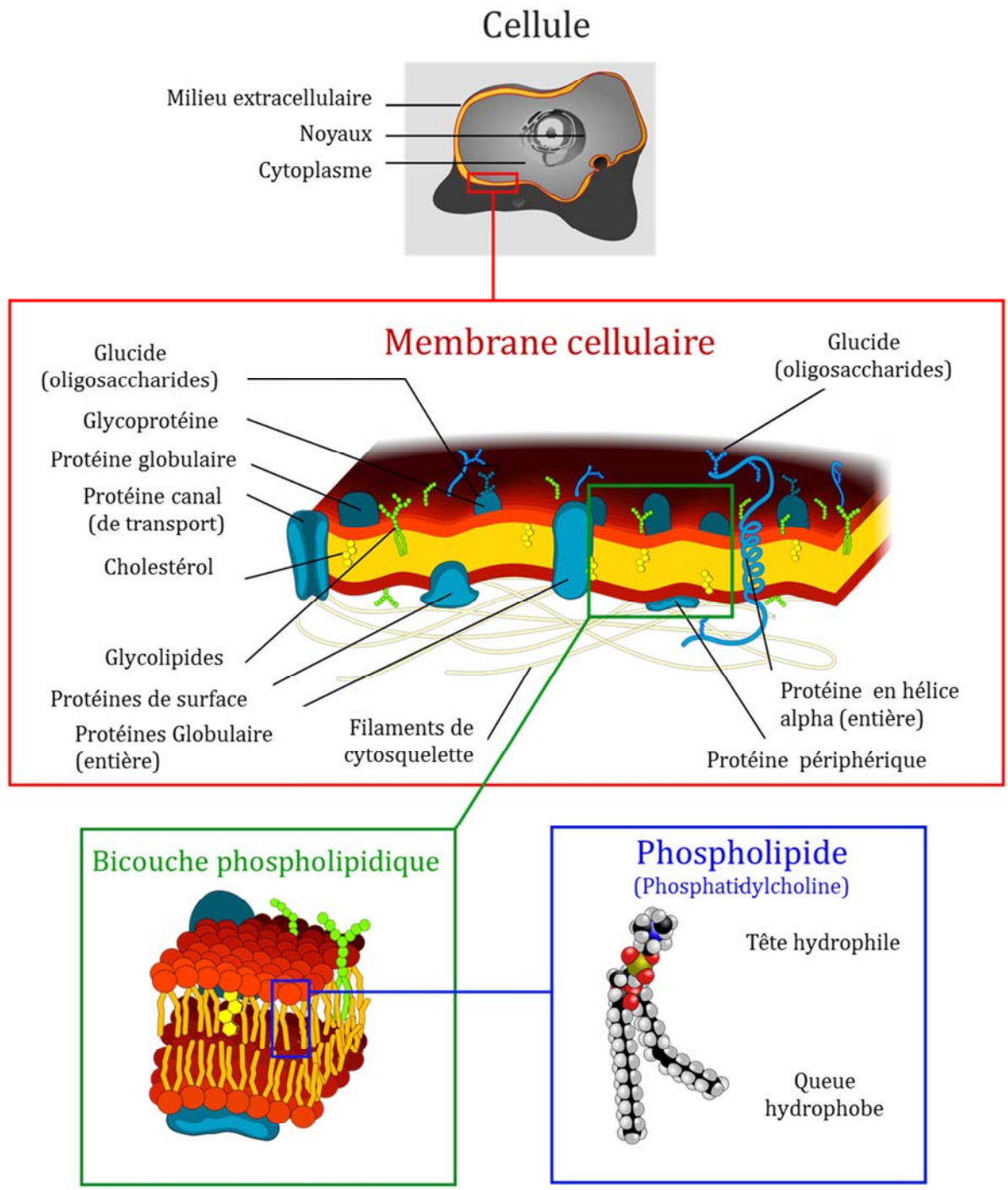


Figure 9 : Schéma de l'organisation de la membrane plasmique d'une cellule animale. On peut observer différentes structures extracellulaires avec lesquelles les NTC peuvent potentiellement interagir. Les membranes végétales possèdent une structure similaire mais sont recouvertes d'une paroi poreuse traversée par diverses molécules (*eg.* protéines) par laquelle peuvent transiter diverses molécules et potentiellement particules entre l'extérieure de la cellule et le milieu intracellulaire ou du moins la membrane plasmique (Mariana Ruiz (LadyofHats, modifier par Dhatfield, source Wikipédia : http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane; CC BY-SA 3.0).

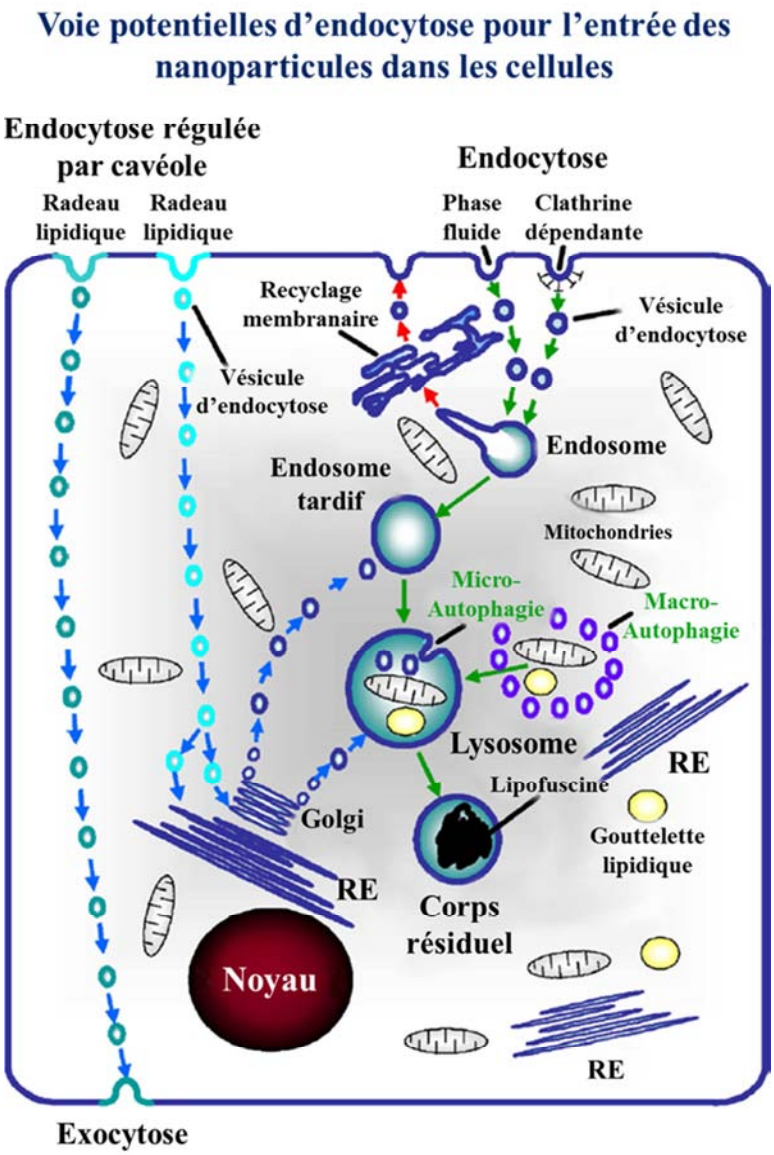


Figure 10 : Voies d'endocytose pouvant permettre aux nanoparticules d'entrer dans la cellule. L'endocytose peut se faire via des mécanismes régulés (clathrine-dépendante) (cavéoline-dépendante) ou d'endocytose en phase fluide. L'endosome formé va ensuite être transféré dans le cytoplasme, puis va pouvoir maturer et fusionner avec un lysosome. L'endosome issu d'endocytose cavéolaire va circuler via une translocation avec le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi avant d'être redirigé ou non vers des endosomes tardifs ou directement vers les peroxysomes. Il peut aussi être évacué par exocytose. D'après Moore (2006).

potentiel d'entrée dans les cellules de NTC, ont montré une perméabilité générale (indépendante de la fonctionnalisation) de la membrane pour différents types cellulaires. Shi *et al.* (2011) ont également mis en évidence chez des cellules hépatiques un mécanisme assimilable à de la phagocytose *via* des liaisons entre les NTC et des récepteurs membranaires, ces liaisons ne semblant se produire qu'avec des NTC fermés à leurs extrémités (demi-fullerènes au bout). Les NTC ouverts aux extrémités, quant à eux, semblaient adhérer à la membrane plasmique avec des interactions de Van der Waals, sans pour autant pénétrer dans les cellules.

5.1.3 Avec la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une caractéristique des eucaryotes photosynthétiques (ou l'ayant été[19]) et des procaryotes (bactéries et cyanobactéries), ainsi que certains archées. Cette structure peut avoir différentes fonctions. Elle constitue à la fois un élément de rigidité cellulaire et une barrière physique entre le milieu extérieur et la cellule. La paroi recouvre la membrane plasmique qui, *via* la pression exercée par le cytoplasme et plus particulièrement la vacuole, y est plaquée dessous. Elle a un rôle de filtre contre les particules (nano ou pas), bactéries pathogènes et virus. Elle permet également de laisser passer sélectivement les molécules *via* à la fois des phénomènes physiques (passoire) et chimiques (charges de surfaces). Chez les plantes, algues vertes et algues rouges, cette paroi est principalement constituée de cellulose et parfois de lignine (dans le cas des arbres et des cellules de leur système circulatoire). Chez les microorganismes eucaryotes photosynthétiques, cette paroi peut également être constituée de cellulose associée à d'autres polysaccharides (*e.g*. pectines), xylanes et mananes. C'est par exemple le cas des algues vertes. Elle peut également être formée de silice amorphe (*e.g.* Diatomées, chrysophycées) ou de calcaire (*e.g*. coccolithophores). Chez les bactéries et les archées, elle est constituée de protéines, de peptidoglycanes et de phospholipides. Chez les algues et les végétaux, bien que perméable, au moins sur certaines zones, elle constitue une protection importante pour la membrane. L'efficacité des parois à résister aux NTC va également pouvoir dépendre à la fois de sa composition chimique et de sa structure : il est donc difficile de faire des généralités. Cependant, différentes études s'intéressant aux effets de NTC chez les bactéries et les algues vertes ont montré que leur paroi cellulaire pouvait être altérée (Ahmed *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2008a, 2008b) par des interactions de Van der Waals (comme c'est le cas pour la membrane plasmique des organismes sans paroi cellulaire) et des forces hydrauliques (Chen *et al.*, 2010). Le perçage et/ou la traversée de la paroi et de la membrane sous-jacente ont également été observés en MET chez *Chlorella* sp. (Long *et al.*, 2012). Cela peut avoir des conséquences dramatiques pour les cellules concernées, en provoquant un relargage du contenu cellulaire, et une surproduction de Radicaux Oxygénés Libres (ROL, Cf. § 2.4.4) pouvant mener à divers disfonctionnements cellulaires, nécroses ou apoptoses (Olivi *et al.*, 2013) voire des effets génotoxiques (Porter *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2007).

[19] De nombreuse plantes parasites ont perdu leur activité photosynthétique. C'est par exemple le cas de la Latrée clandestine (*Latrea clandestina*), de l'orobanche (*Orobanche lutea*) ou de certaines cuscutes (*cuscuta sp*). Certaines orchidées ont également développées un mode de vie saprophyte et ne font plus la photosynthèse (*e.g*. *Neottia nidus-avis*)

5.1.4 Avec le cytosquelette

Le cytosquelette est une structure complexe présente chez toutes les cellules eucaryotes. Il joue un rôle essentiel pour la cellule. Il participe à la fois à la structure et à la rigidité cellulaire, au transport de vésicules, d'ions (*via* des vésicules) et d'organites dans le cytoplasme. Il est également impliqué lors de la division cellulaire à la fois dans la migration des chromosomes durant les mitoses et la méiose, ainsi que lors de la cytodiérèse et de l'apoptose (Janmey, 1998). La perturbation du cytosquelette est souvent observée suite à une exposition à divers pesticides (Debenest *et al.*, 2010) et métaux lourds (Bánfalvi, 2011). Différentes études ont montré que la présence de NTC pouvait induire des perturbations du cytosquelette entraînant un disfonctionnement des centrosomes durant la division cellulaire (Sargent *et al.*, 2012, 2009). Une réorganisation anormale des microfilaments d'actine a également été mise en avant en présence de NTC (Holt *et al.*, 2012 ; Shams *et al.*, 2014). Ceci est directement lié à une interaction entre les NTC et les monomères d'actine et de tubuline et avec leurs polymères (microtubules, et microfilament d'actine). Bien qu'à notre connaissance, aucune étude n'ait été menée sur les filaments intermédiaires[20], leur perturbation par les NTC est aussi envisageable. Dans tous les cas, il est évident que les perturbations du cytosquelette par les NTC vont pouvoir causer des disfonctionnements à l'échelle cellulaire.

5.1.5 Avec l'ADN : interaction directe et épigénétique

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule inhérente à la vie. Il est, à l'heure actuelle, présent chez tous les êtres vivants[21] (si l'on ne considère pas les virus) et est le support de l'information génétique. Les NTC, de par leurs propriétés, peuvent interagir avec cette macromolécule.

Premièrement, de façon indirecte, en induisant une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène : les Radicaux Libres Oxygénés (RLO ou ROS en anglais pour Reactive Oxygen Species), conduisant à un stress oxydant. Ces RLO (ion super oxyde $\cdot O_2^-$, radical hydroxyde $HO\cdot$, ion hydroxyle OH^- et enfin le Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui en est un produit intermédiaire…), s'ils ne sont pas correctement pris en charge par des enzymes de

[20] Les filaments intermédiaires sont, comme leur nom l'indique, de diamètre intermédiaire (entre 8 et 12 nm) à celui des filaments d'actine (~ 7 nm) et des microtubules (~ 20 nm). Ils sont beaucoup plus stables que les deux autres et leur structure est dépendante du type cellulaire. Ils pourraient être assimilés à la charpente cellulaire. D'un point de vue structural, ils sont composés de protéines fibrillaires, alors que les filaments d'actines et microtubules sont composés de protéines globulaires. Enfin, il semble qu'ils ne soient présents que chez des organismes pluricellulaires et participent d'ailleurs aux jonctions entre cellules via leurs liaisons avec les desmosomes.

[21] Il est en général admit qu'un être vivant est une entité constituée de cellules (au moins une). Un être vivant naît, grandit, se nourrit, produit des déchets par son activité métabolique, se reproduit et meurt.

détoxication ou confinés dans des organites dédiées (peroxysomes, lysosomes), peuvent par exemple provoquer des cassures au niveau de l'ADN. Ces cassures, si elles ne sont pas réparées par la cellule, peuvent être à l'origine d'anomalies génétiques (mutations…), qui peuvent entre autres entraîner la mort des cellules (apoptose ou nécrose ; Lindberg *et al.*, 2013 ; Petersen and Nelson, 2010). Ces effets sur l'ADN sont définis comme clastogènes. La perturbation du cytosquelette, et notamment des microtubules, par les NTC ou les RLO qu'ils induisent, peut également induire des anomalies nucléaires (micronoyaux, mauvaise localisation...). Ceci est lié à une perturbation de la migration des chromosomes lors de la mitose qui peut mener à une aneuploïdie. On parlera alors d'effets aneugènes.

L'interaction directe entre les NTC et la double hélice d'ADN a été montrée de façon expérimentale à plusieurs reprises (Hughes *et al.*, 2007 ; Mu *et al.*, 2014 ; Zheng, 2003). A notre connaissance, aucune étude n'a permis de montrer l'internalisation des NTC dans le noyau, bien qu'il en soit souvent observé en périphérie en cas d'entrée dans la cellule (Lindberg *et al.*, 2013 ; Sargent *et al.*, 2012 ; Singh *et al.*, 2009). Ceci laisse penser que la membrane nucléaire protège efficacement l'ADN des NTC, du moins hors période de division cellulaire. En revanche, la présence de NTC en périphérie du noyau, zone privilégiée pour la traduction des molécules d'ARN en protéines, interroge sur les conséquences pour l'ARN et pour sa traduction. Les dérèglements de l'expression génétique et de la communication cellulaire, parfois observés en cas d'internalisation de NTC, pourraient être directement liés à des interactions avec l'ARN, les ribosomes et des protéines (Alpatova *et al.*, 2010 ; Kam and Dai, 2005). Enfin, cette répartition péri-nucléaire peut favoriser l'interaction des NTC avec l'ADN, les fuseaux mitotiques, les centromères, et les histones, lors de la division cellulaire (Sargent *et al.*, 2012).

5.2 Effets des NTC chez les algues unicellulaires

Les algues unicellulaires[22], sont responsables d'environ 45% de la production primaire mondiale (Field, 1998). Malgré leur rôle essentiel pour la vie telle que nous la connaissons sur Terre, l'effet des polluants nano-particulaires sur ces organismes est bien moins étudié à l'heure actuelle que pour d'autres organismes. C'est particulièrement le cas pour les NTC (von Moos and Slaveykova, 2013) où les premières études remontent seulement à 2010. Dans cette partie, nous allons nous intéresser spécifiquement aux effets des NTC chez les

[22] Organismes microscopiques (exception faite de l'acétabulaire : *Acetabularia* sp, formant un tube de plusieurs centimètres de haut terminé par un disque reproducteur d'environ 1cm de diamètre), photosynthétique (exception faite de certaines, hétérotrophes, parasitant des animaux) formant un groupe polyphylétique.

algues unicellulaires. L'état actuel des connaissances dans ce domaine y est présenté tout essayant de mettre en avant les nombreuses incertitudes et lacunes qui demeurent.

L'effet des substances solubles ou particulaires peut être évalué par l'étude de l'inhibition ou la diminution de croissance qu'elle cause ou en l'occurrence dans le cas des algues unicellulaires, sur le ralentissement de l'accroissement des populations ou communautés exposées. L'effet sur la croissance peut ainsi être déterminé par différents indicateurs tels que le taux de croissance de la culture, le taux de division cellulaire ou le temps de doublement de la population. Cette inhibition de croissance est généralement exprimée en CI_{50}[23] ou CE_{50}[24]. Les CE_{50}, dans le cas d'algues vertes unicellulaires, sont le plus souvent calculés à partir des effets observés après 96h d'exposition. Cependant, ce temps d'exposition peut varier pour s'adapter à la vitesse de croissance de la population, ainsi qu'à la durée de la phase exponentielle de croissance (dans les conditions de culture choisies). Dans le cas des organismes unicellulaires, la quantité de cellules composant la population peut être déterminée par cytométrie de flux (hemo-cytomètre), par mesure de la quantité de Chlorophylle-a (spectrométrie) ou par numération en cellules de comptage (Malassez, Neubauer…).

L'ensemble des études traitant des effets des NTC sur la croissance des algues unicellulaires met en avant une inhibition de croissance en présence de NTC. Les différentes études menées principalement sur des algues vertes (chlorophycées) ont mis en avant des EC_{50} dans une gamme comprise entre 0,1 mg L^{-1} et 100 mg L^{-1}, concentration bien supérieures à celles estimées dans les milieux naturels (Cf. Figure 7). Trois facteurs semblent particulièrement influencer les effets observés : (i) le type de NTC (SWNTC ; MWNTC, diamètre et surface spécifiques), (ii) leur fonctionnalisation (covalente ou non) et/ou leur dispersion et (iii) la présence de résidus métalliques de synthèse. Ainsi, une inhibition de croissance accrue est observée avec l'augmentation de la dispersion des NTC et la diminution de leur diamètre, diminution du nombre de parois et augmentation de la surface

[23] CI_{50} : Concentration Inhibitrice médiane. Mesure l'efficacité d'une substance à inhiber une fonction biologique (IC_{50} en anglais pour : half maximal Inhibitory Concentration). En d'autres termes, la valeur de la CI_{50} indique la quantité de produit nécessaire pour inhiber 50% d'une fonction biologique (croissance photosynthèse, vitalité…).

[24] CE_{50} : Concentration induisant une réponse à mi-chemin entre le témoin et le plus fort effet observé (qu'il soit négatif ou positif) pour un temps donné (souvent durant la phase exponentielle de croissance de la culture contrôle). Il représente ainsi la concentration où l'effet est à 50% de son maximum (EC_{50} en anglais pour : half maximal Effective Concentration). Quand les conditions expérimentales le permettent, il peut aussi exprimer la valeur pour laquelle on observe une réponse de 50% de la population (*e.g.* la dose de traitement qui va sauver 50% de patients atteints d'une maladie ; on pourrait parler de réponse « tout ou rien »). La CE_{50} reste toutefois le plus souvent utilisée en équivalent de l'IC_{50}. En général ce temps d'exposition est déterminé dans la phase exponentielle de croissance de la culture contrôle.

spécifique (Jackson *et al.*, 2013). Malgré cela, les valeurs de toxicité observées restent toutefois bien supérieures à celles obtenues pour divers pesticides, métaux et autres produits reconnus comme toxiques. Les espèces d'algues considérées semblent également répondre de façon plus ou moins importante, comme l'ont montré Schawb *et al.* (2011) chez deux algues vertes : *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata.* La première était plus impactée que la seconde, et ceci que les MWNTC utilisés soient bruts ou dispersés avec de la MON. D'autres auteurs, utilisant cette fois deux algues marines, une diatomée (*Navicula* sp.) et une haptophyte (*Isochrysis* sp.) sont arrivés à la même conclusion : la diatomée était plus résistante que l'haptophyte (Miranda *et al.*, 2012). Malheureusement, les NTC évalués sont très souvent d'origines différentes et rendent difficile la comparaison des résultats. Cependant, certaines généralités ressortent. C'est sur ces dernières que nous allons maintenant nous concentrer.

Les études sur la toxicité des NTC chez différentes algues (et plus globalement sur différents organismes) soulignent toujours l'effet important de leur dispersion. Certaines études montrent une augmentation des effets négatifs en cas de dispersion (Kwok *et al.*, 2010; Schwab *et al.*, 2011) ; alors que d'autres, au contraire, mettent en avant leur diminution (Wei *et al.*, 2010 ; Youn *et al.*, 2012). La dispersion va augmenter la surface spécifique des NTC et donc la surface potentielle d'interaction avec les organismes. Cependant, la nature du dispersant, dans le cas d'une dispersion chimique non covalente (Cf. § 3.5.1) va jouer un rôle important, présentant parfois des effets toxiques et d'autres fois des effets bénéfiques (cas de la GA et de la MON) probablement liés à leur nature anti-oxydante (Bourdiol *et al.*, 2013 ; Schwab *et al.*, 2011 ; Youn *et al.*, 2012). Elle va également contrebalancer l'agglomération des NTC entre eux et potentiellement modifier les interactions avec les organismes (Navarro *et al.*, 2008).

5.2.1 Toxicité directe des NTC et des résidus métalliques de synthèse : Mortalité et intégrité de la chaine photosynthétique,

La toxicité directe d'une substance ou d'une particule chez les organismes unicellulaires photosynthétiques est souvent évaluée de manière performante par les mesures de la viabilité (perméabilité membranaire à certaines molécules) et des dysfonctionnements photosynthétiques. Il a rarement été montré de mortalité ou d'effets sur les photosystèmes causés directement par des NTC chez les algues. La présence importante de résidus métalliques de synthèse (cobalt, molybdène, aluminium, nickel…) sous forme dissoute ou particulaire serait d'ailleurs en grande partie responsable de la perte de viabilité observée, souvent associée à l'induction d'un stress oxydant après exposition à des NTC non purifiés.

Par exemple, certains de ces métaux, comme le fer, amplifieraient le processus car catalysant la réaction de Fenton[25] générant ainsi des ions hydroxyles (•OH, Betts *et al.*, 2013 ; Ge *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2007). Ces travaux mettent en avant l'importance d'une évaluation directe (*e.g*. exposition aux solutions après retrait préalable des NTC par filtration ou ultracentrifugation), ou indirecte (*e.g*. dosages), de la part de toxicité attribuable aux résidus de synthèse et non directement aux NTC. Certaines études, menées avec des MWNTC correctement purifiés et ne contenant que de très faibles quantités de métaux, ont montré que la contribution de ces résidus de synthèse était négligeable (Schwab *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010). De plus, Schwab *et al.* (2011) n'ont pas observé de toxicité directe, que ce soit en terme de mortalité ou d'intégrité des photosystèmes. Matorin *et al.* (2010) et Wei *et al.* (2010) ont en revanche observé une perturbation du fonctionnement de ces derniers en présence de MWNTC. Wang and Yang (2013) ont également montré que la composition pigmentaire (chlorophylles et caroténoïdes) de l'algue *Chromochloris zofingiensis* était fortement altérée par la présence de SWNTC. Enfin, contrairement à la plupart des polluants « classiques » (métaux, pesticides…) avec lesquels l'inhibition de croissance est directement reliée à la toxicité, les NTC peuvent inhiber ou ralentir la croissance sans pour autant induire de toxicité.

5.2.2 Interaction avec la paroi et Internalisation : conséquences pour l'algue

Dans certains cas, cette cytotoxicité semble liée à l'internalisation des NTC dans les algues, comme cela a déjà été montré sur différents types cellulaires (Chen *et al.*, 2010 ; Kostarelos *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés d'une part en microscopie photonique sur une diatomée (*Navicula* sp.) et une micro-algue marine unicellulaire (haptophyte : *Isochrysis* sp), et d'autre part en MET sur des algues vertes (Basiuk *et al.*, 2011 ; Beigbeder *et al.*, 2008 ; Miranda *et al.*, 2012 ; Pereira *et al.*, 2014). Ces auteurs ont également observé de la mortalité, associée à des changements morphologiques. Dans le cas de *Navicula* sp. et *Isochrysis* sp. , des nécroses cellulaires et des pycnoses, associées à une augmentation importante de l'activité phosphatase acide et lactase déshydrogénase ont été observées[26]. Malheureusement, la microscopie photonique à fond clair, de par sa faible résolution et de par la présence de pigments, rend difficile l'observation d'une quelconque internalisation des NTC. De même, nous l'avons vu précédemment, l'utilisation du microtome peut

[25] Réaction d'oxydation de Fer ($Fe^{2+}_{(aq)} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{(aq)} + OH^-_{(aq)} + \cdot OH$) aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles (·OH), très oxydants et pouvant causer de la toxicité. Cette réaction peut donc se produire dans les peroxysomes ou dans le milieu extracellulaire en cas de forte production d'H_2O_2 par la cellule.

[26] Les causes réelles de la toxicité des NTC utilisés pour cette étude (Miranda et al., 2012) n'ont pas été caractérisées et l'origine réelle (NTC ou métaux) de la toxicité observée est incertaine.

engendrer des problèmes de contamination lors de la réalisation des coupes fines. En effet, le diamant peut entraîner des NTC présents à l'extérieur des cellules vers l'intérieur et ainsi fausser les interprétations (Bourdiol *et al.*, 2013 ; Petersen *et al.*, 2011). Ainsi, ces deux techniques restent trop approximatives et donc subjectives pour permettre de conclure à une entrée des NTC dans les algues. Il est donc important de coupler à ces analyses des techniques de confirmation telles que la microscopie RAMAN[27], la microscopie à fluorescence[28] ainsi que la microscopie bi-photonique[29] (TPEM pour l'anglais Two photon exitation microscopy ; Cf. § 4.3), qui n'ont encore, à notre connaissance, jamais été mises en œuvre pour les études concernant l'effet des NTC chez les algues.

5.2.3 Ombrage et agglomération

La plupart des études s'intéressant au effets des NTC sur les algues unicellulaires ont mis en en évidence deux éléments importants expliquant en grande partie les inhibitions de croissance observées : (i) l'ombrage et (ii) l'agglomération des NTC aux cellules (Long *et al.*, 2012 ; Schwab *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2010). Ces phénomènes peuvent en grande partie expliquer les inhibitions de croissance observés sans induction de toxicité (mortalité, inhibition des photosystèmes II…). Les NTC, de par leur fort pouvoir obscurcissant en suspension, vont conduire à un effet « d'ombrage » qui va être d'autant plus important que les NTC sont dispersés dans l'eau et/ou agglomérés autour des algues. Cette agglomération sur les cellules, en plus de l'auto-agglomération des NTC en l'absence d'agent dispersant, peut être favorisée par les interactions directes entre les NTC et la paroi cellulaire. Ces interactions peuvent causer des altérations de cette dernière, voire sa rupture (Long *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2010). Cette agglomération et adhérence aux algues pourrait être favorisée par la présence de biomolécules à la surface de ces dernières (Wei *et al.*, 2010). L'estimation et la compréhension des mécanismes (*eg*. cinétique d'adhérence, bio-chimique, réponse des organismes) associés à cette agglomération des NTC aux cellules et à l'ombrage causé ont particulièrement intéressé les travaux de cette thèse. C'est entre autre cela qui a motivé le choix d'organismes modèles formant des biofilms.

[27]Consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser le spectre de la lumière diffusée. Elle exploite le phénomène physique selon lequel un milieu (ici les NTC) modifie la fréquence de la lumière incidente. Ce décalage résultant d'un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu, donne des informations sur la structure et la composition du substrat (http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_Raman).

[28] Technique utilisant un microscope optique exploitant la fluorescence d'un objet et/ou de fluorophores, au lieu de l'observation classique par Réflexion et absorption de la lumière visible

[29] Similaire à la microscopie confocale, mais se basant sur le principe d'absorption bi-photonique mis en avant par Maria Göppert-Mayer (prix Nobel 1963). Il résulte du fait que plusieurs photons peuvent être absorbés simultanément par une molécule. L'énergie de chacun des photons va alors s'additionner (diminution de longueur d'onde). Cela va permettre d'exciter une molécule ou particule spécifiquement au point de rencontre des deux photons.

6 Les biofilms aquatiques photo-autotrophes

6.1 Composition et diversité

Les biofilms photo-autotrophes environnementaux résultent de l'accumulation de microorganismes, de cations multivalents, de particules biogéniques et inorganiques ainsi que de colloïdes et de substances dissoutes, et enfin de substances polymériques extracellulaires assurant la cohésion de l'ensemble (Flemming and Wingender, 2010, 2001 ; Wingender *et al.*, 1999). Les microorganismes aquatiques qui le composent sont, pour la grande majorité, benthiques[30]. Ces microorganismes, qu'ils soient eucaryotes (*e.g*. algues vertes, diatomées, champignons, nématodes…) ou procaryotes (archées et eubactéries : bactéries et cyanobactéries), se regroupent et se multiplient sur divers substrats, biologiques (macrophytes, bois morts…) ou minéraux (roches, sable, sédiments…) formant des communautés parfois très complexes (Dodds, 2010 ; Hoek and Jahns, 1995 ; Stevenson *et al.*, 1996). Faiblement mobiles, les organismes benthiques se déplacent en glissant, en rampant sur le support colonisé ou en nageant dans l'eau interstitielle du biofilm. Les biofilms photo-autotrophes sont présents dans les milieux aquatiques terrestres et marins. Ils ont la particularité de se développer dans les zones photiques (également appelée euphotique) c'est-à-dire les zones humides ou aquatiques (lethiques ou lotiques) où la lumière incidente est suffisante pour permettre la photosynthèse. Ils sont caractérisés par une forte présence de microorganismes photosynthétiques (producteurs primaires) qui peuvent parfois représenter plus de 30% à 40% de leur biomasse. Ces biofilms peuvent être responsables de l'essentiel de la production primaire des milieux lotiques (Stevenson *et al.*, 1996). Leur organisation et composition est fortement dépendante de nombreux paramètres abiotiques comme biotiques : entre autres, la luminosité, la température, le pH, la composition et concentrations en nutriments, la disponibilité en oxygène, l'hydrodynamisme, la compétition pour les ressources, ainsi que la nature du substrat (Hoek and Jahns, 1995 ; Stevenson *et al.*, 1996). La saisonnalité joue également un rôle important dans la composition et la biomasse des biofilms photo-autotrophes et peut faire grandement varier cette dernière au cours de l'année (Artmann *et al.*, 2003). Bien qu'il existe quelques exceptions, en climat tempéré, les biofilms photo-autotrophes sont dominés par les algues

[30] On peut également retrouver dans les biofilms photo-autotrophes quelques microorganismes planctoniques (flottant en temps normal dans la colonne d'eau). C'est particulièrement le cas dans les milieux aquatiques de régimes lentiques, qui favorisent leur sédimentation. Certains organismes sessiles (immobiles et fixés à un support), comme par exemple de nombreuses algues vertes filamenteuses, peuvent également rentrer dans la composition des biofilms phototrophes.

vertes de la fin du printemps jusqu'à la fin de l'été. Ces dernières profitent du réchauffement de l'eau, de la forte présence en nutriments après les crues de printemps, ainsi que l'accroissement de la luminosité. Elles sont ensuite relayées, à la fin de l'été jusqu'au milieu de l'automne, par les cyanobactéries. Ces dernières préfèrent les températures d'eau élevées et sont favorisées par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (comme le font les bactéries présentes au niveau du système racinaire des Fabacées), devenant très compétitives lors de la diminution des quantités de nutriments azotés résultant du développement antérieur des algues vertes. A la fin de l'automne, quand les températures et la luminosité baissent, en plus de l'augmentation des débits d'eau, favorisant leur dissolution et la libération de silice[31], les diatomées vont alors prendre le dessus et ceci jusqu'au milieu du printemps (Leitão and Couté, 2005). Ces microorganismes benthiques, aussi nommés « benthos », sont responsables de la cohésion des biofilms en produisant une grande quantité et diversité de SPE. Ces SPE vont pouvoir jouer, nous allons le voir, un rôle important dans l'interaction entre le biofilm et les NTC.

6.2 Les substances polymériques extracellulaires

Les substances polymériques extracellulaires (SPE) sont définies comme étant des bio-polymères organiques d'origine microbienne responsables de l'agglomération entre cellules, particules et substrat (Flemming and Wingender, 2010 ; Wingender *et al.*, 1999). Elles sont produites par la plupart des microorganismes en plus ou moins grandes quantités. Ces substances, encore parfois nommées « mucus » (en rapport à leur équivalent produit par les muqueuses[32] des animaux), sont constituées de molécules hydratées à forts poids moléculaire présentant souvent de nombreuses charges. Les SPE sont souvent considérées, comme majoritairement, voire exclusivement, composées de polysaccharides[33]. Les termes polysaccharides extracellulaires (Extracellular PolySaccharides) ou Exo-PolySaccharides, sont d'ailleurs parfois utilisés pour désigner les SPE (Wingender *et al.*, 1999). En fait, les polysaccharides ne représentent qu'entre 40% et 95% de masse des SPE (en fonction des espèces productrices et des conditions environnementales). Les protéines, quant à elles, peuvent représenter jusqu'à 60% de leur contenu et ainsi constituer une part importante,

[31] En milieu lotique, ce phénomène est lié à l'augmentation de la pluviométrie et du débit permettant une remise en suspension et une dissolution des roches et sédiments composant le lit des rivières. En milieu lentique, le brassage et mélange de l'eau est assurée par les vents et les variations de températures en surface. Ceci va à la fois favoriser les échanges gazeux entre air et eau mais également mener à une ou plusieurs inversions des strates d'eau au cours des saisons (majoritairement monomictiques ou dimictiques en région tempérées).

[32] Tissus spécialisés dans la sécrétion de mucus chez les animaux.

[33] Dans les études traitant du sujet, c'est malheureusement souvent cette seule fraction qui est analysée.

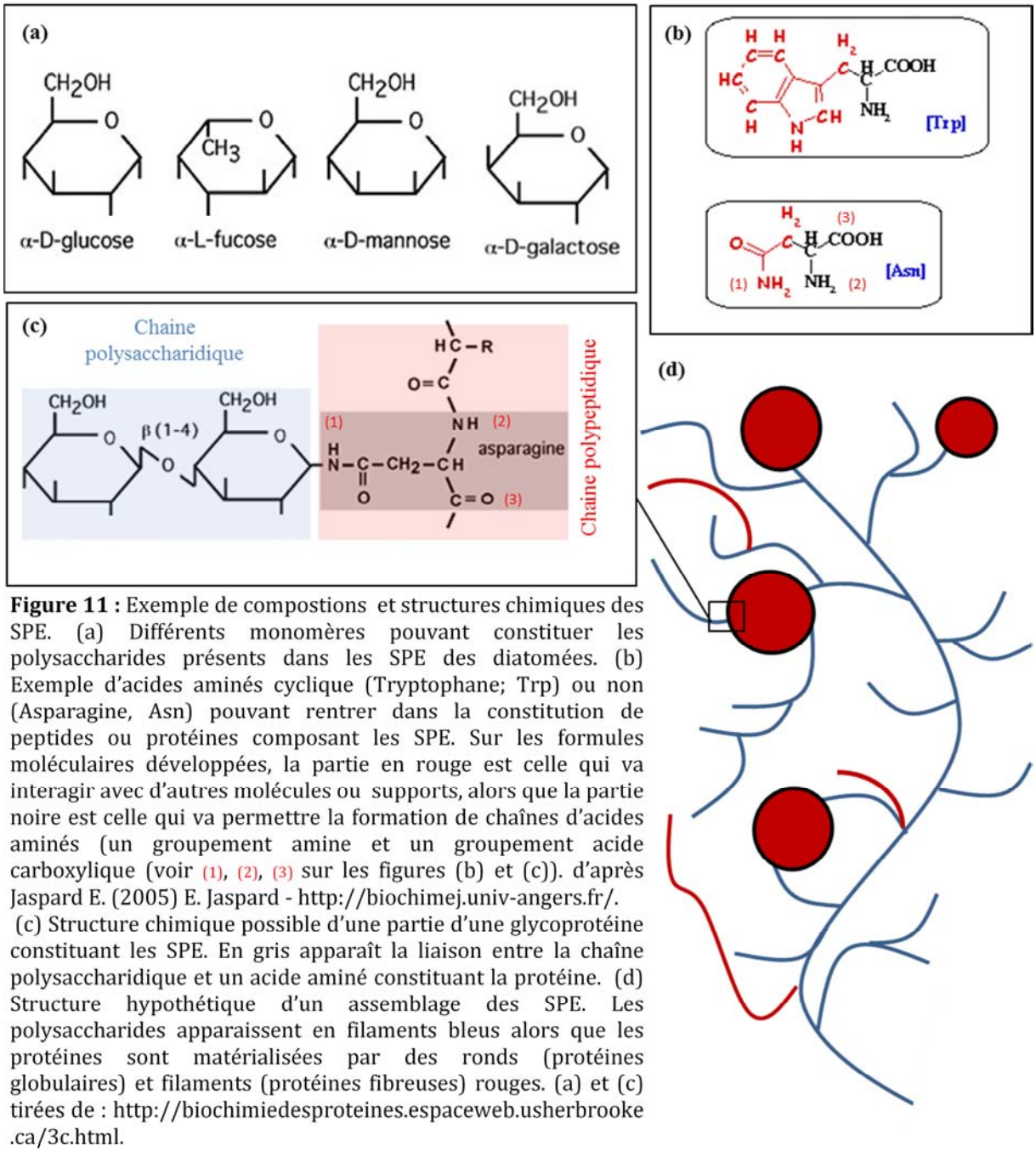


Figure 11 : Exemple de compostions et structures chimiques des SPE. (a) Différents monomères pouvant constituer les polysaccharides présents dans les SPE des diatomées. (b) Exemple d'acides aminés cyclique (Tryptophane; Trp) ou non (Asparagine, Asn) pouvant rentrer dans la constitution de peptides ou protéines composant les SPE. Sur les formules moléculaires développées, la partie en rouge est celle qui va interagir avec d'autres molécules ou supports, alors que la partie noire est celle qui va permettre la formation de chaînes d'acides aminés (un groupement amine et un groupement acide carboxylique (voir (1), (2), (3) sur les figures (b) et (c)). d'après Jaspard E. (2005) E. Jaspard - http://biochimej.univ-angers.fr/.
(c) Structure chimique possible d'une partie d'une glycoprotéine constituant les SPE. En gris apparaît la liaison entre la chaîne polysaccharidique et un acide aminé constituant la protéine. (d) Structure hypothétique d'un assemblage des SPE. Les polysaccharides apparaissent en filaments bleus alors que les protéines sont matérialisées par des ronds (protéines globulaires) et filaments (protéines fibreuses) rouges. (a) et (c) tirées de : http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3c.html.

voire majoritaire, des SPE. Des traces de lipides et ADN peuvent également être présentes (Flemming and Wingender, 2010 ; Gerbersdorf *et al.*, 2009). Ainsi, principalement composés de protéines et de carbohydrates polymérisés (ou polysaccharides), les SPE forment un maillage tridimensionnel dense et complexe (Flemming and Wingender, 2001 ; Liang *et al.*, 2010 ; Santschi *et al.*, 1998 ; Figure 11). Ces SPE représentent le plus souvent entre 40% et 90% de la biomasse des biofilms (Baines and Pace, 1991 ; Christensen and Characklis, 1990 ; Nielsen *et al.*, 1997). Les SPE sont de plus en grande partie responsables de la structure, de l'intégrité fonctionnelle, ainsi que la cohésion des biofilms et en déterminent une grande part des propriétés physicochimiques et biologiques. Elles jouent également un rôle important dans la cohésion et la stabilité des sédiments sur lesquels les biofilms se

développent. Les SPE peuvent avoir différents rôles pour les organismes qui les sécrètent comme : la protection physique contre l'abrasion particulaire et chimique (*e.g*. contre les métaux lourds ; Martins *et al.*, 2008), la séquestration des particules naturelles et de certains biocides, le captage de nutriments et d'enzymes, l'adhérence des organismes au substrat, ainsi que leur déplacement (Flemming and Wingender, 2010). Les SPE participent également à la communication extracellulaire au sein du biofilm (quorum sensing). Enfin, de nombreux microorganismes utilisent les SPE comme réserves extracellulaires et sources de nutriments organiques (Flemming and Wingender, 2010, 2001 ; Wolfstein and Stal, 2002). La sécrétion de SPE va être caractérisée d'un point de vue cytologique, par une structuration cellulaire particulière présentant entre autres un réticulum endoplasmique lisse et granuleux, ainsi qu'un appareil de golgi très développés, comme c'est le cas pour les cellules sécrétant du mucus. Ceci va permettre une synthèse et une maturation rapide des protéines, glycoprotéines et polysaccharides, constituants majeurs des SPE.

Les SPE sont souvent caractérisées en fonction de leur solubilité dans l'eau (SPE solubles, colloïdes[34], SPE liés aux substrats (Brouwer *et al.*, 2005 ; De Brouwer *et al.*, 2002 ; De Brouwer and Stal, 2002 ; de Deckere *et al.*, 2001) ou de leurs caractéristiques fonctionnelles (liaisons faibles ~ solubles, hydrophobes, ioniques ; Marcato-Romain *et al.*, 2012 ; Ras *et al.*, 2011, 2008). Ces différentes fractions peuvent présenter des compositions et des assemblages très différents en fonction des organismes qui les secrètent et des conditions environnementales. Par exemple, les polysaccharides sécrétés par une espèce benthique de diatomées du genre *Nitzschia*, sont composés de rhamnose, galactose, glucose, xylose/mannose, acide galacturonique et acide glucuronique. De plus, alors que la phase hydrosoluble est principalement constituée d'acide glucuronique, la phase fortement liée au substrat et organisme est majoritairement composée de glucose (De Brouwer and Stal, 2002). De ces différents assemblages résultent différents rôles que les SPE peuvent jouer (adhérence, réserves nutritives extracellulaire…), un assemblage pouvant remplir différentes fonctions (Brouwer *et al.*, 2005 ; De Brouwer *et al.*, 2002). Pour les organismes consommateurs de biofilms (brouteurs), ces SPE, riches en carbone et en azote, vont constituer une source de nourriture importante et jouer un rôle essentiel pour de nombreuses chaînes alimentaires. Les diatomées benthiques en produisent en grosses

[34] Les colloïdes ou solutions colloïdales sont des mélanges (liquides, gels) qui contiennent des particules en suspension. Ces particules, ou objets colloïdaux, ont une taille supérieure aux molécules qui les constituent mais sont suffisamment petites pour que le mélange reste homogène. D'après la définition officielle, leur taille est comprise entre un nanomètre (10^{-9} m) et une dizaine de micromètres (soit 10^{-5} m). Des produits industriels tels qu'un parfum sans alcool, une peinture à l'eau ou encore une sauce vinaigrette, ainsi que des produits naturels tels que le lait, sont des exemples de solutions colloïdales. […] (Roux, 2014).

quantités, et étant majoritaires dans les biofilms durant une longue période de l'année, vont jouer un rôle particulièrement important dans cette fonction. Pour toutes ces raisons ce sont donc des diatomées benthiques, organismes producteurs de biofilms, que nous avons choisis pour tenter de comprendre les interactions possibles avec les NTC et les biofilms (organismes et SPE produites). Les possibles interactions avec les biofilms vont également pouvoir apporter des réponses au rôle qu'ils peuvent jouer sur le transfert des NTC le long des chaînes trophiques aquatiques.

7 Les diatomées

7.1 Systématique

Les diatomées ou bacillariophycées parfois nommées diatomophycées, sont des organismes eucaryotes unicellulaires. Elles font partie des bicontés (à deux flagelles, au même titre que la lignée verte[35]). Elles appartiennent au Règne des chromoalvéolés, qui pourrait être amené à se scinder en deux règnes distincts : les Acrobia (chromistes ou lignée brune mais excluant les Straménopiles) et le groupe SAR (ou Harosa) comprenant les phylum des : Straménopiles, des Alvéolés et des Rhizariens (Burki *et al.*, 2007). C'est au phylum des Straménopiles, aussi appelé les hétérocontés, qu'appartient l'embranchement des diatomées (Bacillariophyta). Il se caractérise historiquement par l'existence d'une cellule à deux flagelles différentes à au moins un moment de leur cycle de vie (un lisse similaire à celui des spermatozoïdes et l'autre plumeux, recouvert de petites digitations : les mastigonèmes). Les diatomées font partie du seul embranchement photosynthétique des straménopiles : les Ochrophytes (= la lignée brune selon Lecointre et Le Guyader (2006) qui ont la particularité de présenter de la chlorophylle *a* et chlorophylle *c*, ainsi que des pigments de la famille des xanthophylles (diatoxanthine, diadinoxanthine, fucoxanthine) et du β-carotène (ces deux derniers étant à l'origine de leur couleur brune (Reviers *et al.*, 2002). Les diatomées font partie de l'embranchement des Bacillariophyta et du sous-embranchement des Diatomeae regroupant les Bolidophyceae (algues brunes unicellulaires) et les Bacillariophyceae (les diatomées). Ces dernières sont caractérisées par la présence d'une paroi siliceuse formant deux valves et recouvrant le plus souvent la totalité de la cellule. Bien que cette approche soit aujourd'hui très critiquée car se basant uniquement sur quelques critères

[35] La lignée verte est un groupe phylogénétique qui regroupe tous les organismes ayant effectué une endosymbiose avec une cyanobactérie (procaryote), qui est par la suite devenu leur chloroplaste. C'est le cas des plantes et algues vertes (= les chlorobiontes) les glaucophytes et les rhodobiontes (algues rouges). (Reymond et Jauzein 2007 ; http://www.tela-botanica.org). Elles diffèrent donc des autres algues, qui ont effectué une endosymbiose avec une algue (eucaryote) de la lignée verte (Annexes 3, 3bis et 4)

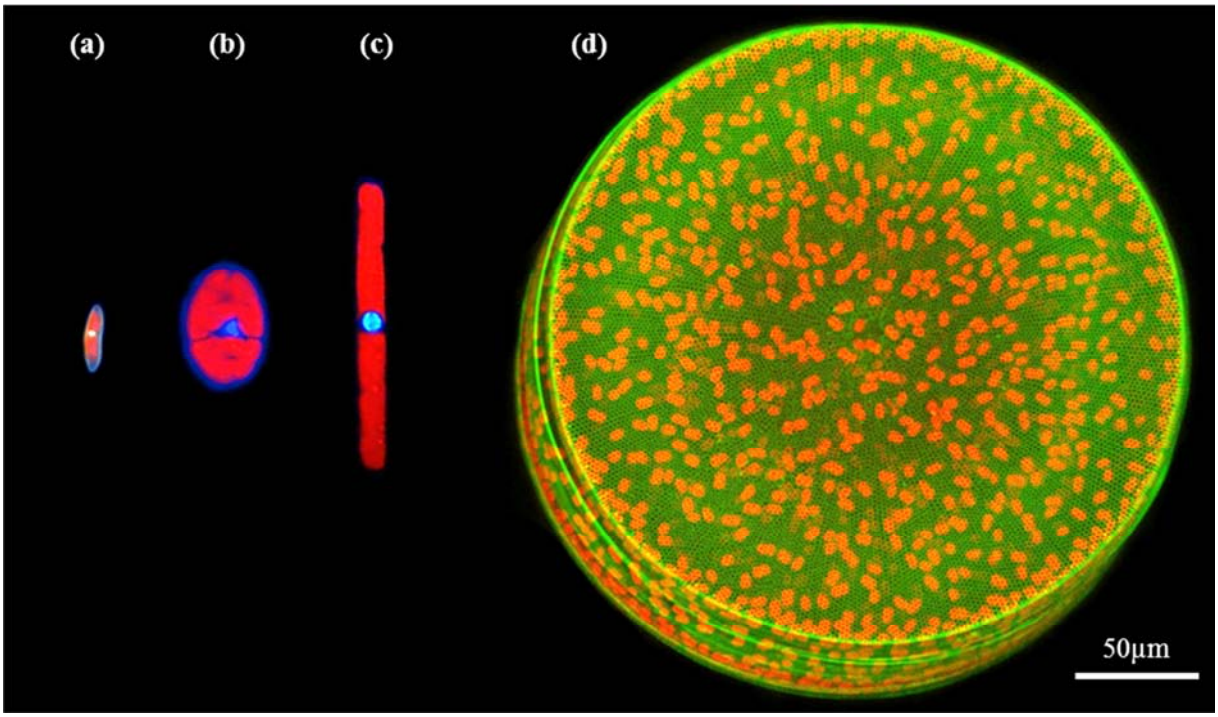


Figure 12 : Vue en microscopie a épi-fluorescence de (a) *Nitzchia palea*, (b) *Cocconeis placentula*, (c) *Nitzschia linearis* (Photos a, b, c : L.Verneuil, EcoLab). Et en microscopie confocale de (d) *Coscinodiscus wailesii* (J. Michels, GEOMAR ; http://www.geomar.de/). Les chloroplastes apparaissent en rouge. Les figures (a-c) permettent de visualiser les noyaux des cellules en position centrale (bleu). Notez la présence d'un Pyrenoïde au centre de chaque plaste de *C. placentula*.(c). Sur la figure (d), le frustule apparaît en vert et les chloroplastes en rouge.

phénotypiques[36], la phylogénie des diatomées est encore fortement basée sur la forme et l'ornementation de cette paroi siliceuse également appelée frustule (Mann, 1999). Les diatomées sont réparties en trois familles : Les Coscinodiscophyceae (diatomées centriquess, à symétrie radiale), les Fragilariophyceae (à symétrie bilatérale, aussi appelées diatomées pennées, sans raphé = araphidées) et les Bacillariaceae (diatomées pennées avec raphé sur une valve (monoraphidées) ou les deux valves (bi-raphidées) (http://tolweb.org/tree/). Le registre fossile permet d'estimer leur apparition il y a environ 250 millions d'années, avec une forte expansion il y a 100 millions d'années (Raven *et al.*, 2000). A l'heure actuelle il existe plus de 100 000 espèces répertoriées réparties sur environ 250 genres. Certains estiment à plus de 1 000 000 le nombre d'espèces tout habitats confondus (Hoek and Jahns, 1995 ; Norton *et al.*, 1996).

7.2 Biologie des diatomées : Caractéristiques, structure cellulaire et cycle de vie

Les diatomées sont des organismes présentant une taille allant de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres (Figure 12). Elles peuvent être solitaires ou former des

[36] Caractères observables chez un individu. Ils vont dépendre à la fois du génotype (information génétique d'un individu) et des conditions environnementales (qui vont pouvoir réguler l'expression des gènes) dans lesquelles vit l'individu.

colonies. La grande majorité d'entre elles présente une paroi siliceuse[37] composée de silice opaline polymérisée (SiO_2-nH_2O) : le frustule. Ce dernier est composé de deux valves imbriquées l'une dans l'autre, à la façon d'une boite de pétri, et solidarisées par une ou plusieurs ceintures connectives elles-mêmes plus ou moins silicifiées, nommées *cingulum*. Le tout est recouvert d'une fine couche de composés organiques (glucidique et protéiques). Eucaryotes, elles présentent toutes un noyau situé en position centrale (hors phase de division cellulaire). Ce dernier est délimité par une membrane poreuse fusionnée en certains points avec le réticulum endoplasmique.

Les diatomées possèdent également tous les organites[38] propres aux cellules eucaryotes tels que les mitochondries, l'appareil de golgi, les réticulums endoplasmiques lisses et granuleux, les endosomes et peroxysomes ainsi qu'un cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires et microfilaments d'actine), le tout contenu dans le cytoplasme. Comme tous les organismes eucaryotes photosynthétiques, les diatomées contiennent des chloroplastes. Les formes pennées présentent le plus souvent deux chloroplastes pariétaux, volumineux, de part et d'autre du noyau, et plaqués sur la membrane par une vacuole. Les formes centrales présentent plus généralement une multitude de petits chloroplastes discoïdes répartis dans le cytoplasme ou également plaqués sur la membrane. Dans la grande majorité des cas, les chloroplastes sont issus d'une endosymbiose secondaire, c'est à dire de la phagocytose d'une algue verte ou rouge et non pas, comme c'est le cas pour la lignée verte, d'une cyanobactérie (Cf. § 3.1).

Les diatomées ont un cycle de vie haplodiplophasique avec une forte prédominance de la phase diploïde (2n). La forme haploïde (n) se restreint aux gamètes et ne dure que quelques heures (le temps de la rencontre et la fusion des gamètes). La forme diploïde (la diatomée) se multiplie ensuite par mitoses successives. Cette division cellulaire est caractérisée dans la grande majorité des cas par la conservation, par chacune des cellules filles, d'une des deux valves du frustule de la cellule mère (Figure 13a). La nouvelle valve, toujours de taille inférieure, est alors synthétisée par chaque cellule fille durant la cytodiérèse. Ainsi, une des deux cellules filles aura une taille légèrement inférieure à la cellule mère, alors que l'autre sera identique. Au fil des générations apparaît alors une disparité de taille entre les cellules (Figure 13a, d). En atteignant une taille critique (entre 20% et 40% de la taille maximale), les diatomées vont pouvoir rentrer dans une phase de reproduction sexuée (Figure 13b-c ; Chepurnov *et al.*, 2004 ; Trobajo *et al.*, 2006). Les modes de reproduction sexuée des

[37] Certaines diatomées symbiotiques d'éponges de grands foraminifères marins y sont abritées sous forme de zooxanthelles ; dans ce cas elles ne présentent pas de frustule.

[38] Différentes structures cellulaires spécialisées dans une fonction. Leur nom provient d'une analogie avec les organes (tissus rassemblés entre eux et assurant une fonction précise dans l'organisme) de nombreux organismes pluricellulaires.

diatomées sont encore pour la plupart mal connus et très diversifiés, que ce soit entre espèces, ou même entre lignées d'une même espèce (Royal Botanic garden Edinburgh, 2014).

Dans le cas des diatomées centriques (Figure 13b), la reproduction sexuée est le plus souvent allogame[39] et se fait par oogamie[40] (= anisogamie) avec des gamètes mâles (souvent quatre), flagellés (un flagelle plumeux = mastigonème) différents du gamète femelle (l'oosphère), immobile. Cette reproduction est induite par des facteurs environnementaux (luminosité, photopériode, température…) lorsqu'une taille critique est atteinte. Le plus souvent allogame, certains cas d'autogamie (fusion de deux noyaux haploïdes à l'intérieur de la cellule sans qu'il y ait eu de division cellulaire) ont cependant été recensés (Mann, 1999).

Chez les diatomées pennées (Figure 13c-d), la reproduction est isogame[41] dans la majorité des cas et les gamètes sont non flagellés. Une méiose se produit à l'intérieur du frustule donnant naissance à quatre noyaux haploïdes dans la même cellule. Seul un ou deux noyaux sur les quatre sont viables. Ensuite la cellule peut ou pas se diviser en deux. La reproduction pourra ensuite se faire par allogamie[42], autogamie[43] ou par pédogamie[44], en fonction des espèces (Trobajo *et al.*, 2006) et, dans certains cas, des lignées d'une même espèce (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Chepurnov and Mann, 1999, 1997, 2000). Cependant, des gamètes mâles présentant une ou plusieurs structures impliquées dans le déplacement et la capture de l'oosphère ainsi que dans l'adhérence au substrat, ont été récemment mis en évidence chez une diatomée araphidée (Sato *et al.*, 2011). Cette étude a également montré qu'en cas de proximité entre deux cellules, l'induction de la production de gamètes pouvait être induite par la sécrétion d'hormone(s) par l'un puis l'autre des partenaires.

7.3 Ecologie et rôle écologique

Les diatomées sont des organismes ubiquitaires que l'on retrouve dans la zone photique de tous les milieux aquatiques à l'exception de certains milieux extrêmes (zone hyper-halines, hydrothermales, hyper-acides ou hyperalcalins), qu'ils soient continentaux, saumâtres ou marins, lotiques, lentiques, pérennes ou temporaires. On peut aussi les retrouver dans les zones humides telles que les sols, mousses ou encore les parois des cavernes (Prygiel and

[39] Reproduction entre deux individus différents
[40] Fusion de deux gamètes de taille, forme et/ou comportement différents (souvent un gros immobile et un petit flagellé).
[41] Les deux gamètes sont de forme et de taille semblables.
[42] Fécondation entre deux gamètes provenant d'individus différents.
[43] Autofécondation entre deux noyaux d'une même cellule.
[44] Donne deux cellules filles comportant chacune deux noyaux haploïdes qui vont ensuite fusionner pour former un zygote puis une auxospore.

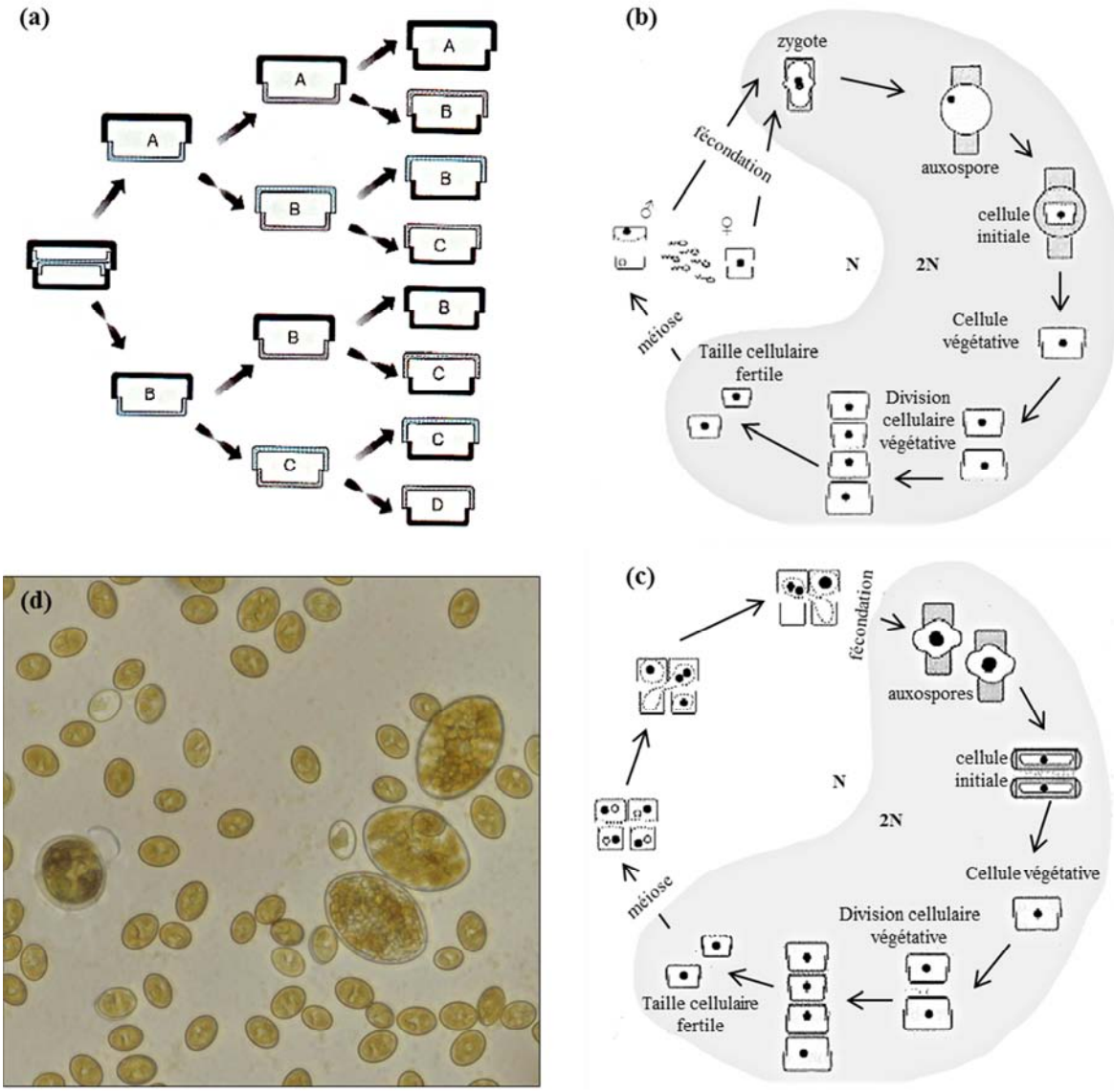


Figure 13 : Cycles de vie des diatomées. (a) Cycle de reproduction végétative (asexuée) par mitose successive. On peut remarquer la réduction de taille des cellules filles ayant hérité de la valve inferieure (chaque taille porte une lettre : « A » pour la plus grande et « D » pour la plus petite. (b) Exemple d'un cycle de vie avec reproduction sexuée d'une diatomée centrique. (c) Exemple d'un cycle de vie avec reproduction sexuée d'une diatomée pennée. Source : Florida International University (http://www.jochemnet.de/fiu/bot4404/BOT4404_19.html).(d) Photo en microscopie photonique d'une culture de *Cocconeis placentula* durant une phase de reproduction sexuée ; on peut voir une oxospore sur la gauche (cellule ronde) et les cellules, une fois le frustule reformé, après 1,5 cycle de division cellulaire. On peut également remarquer la disparité de taille entre les différentes cellules présentes, illustrant bien la Figure (a). (Isolement de la souche, mise en culture et photo, L. Verneuil, EcoLab).

Coste, 2000). Les diatomées centriques (*e.g*. *Cyclotella*, *Stephanodiscus…*), à l'exception de certaines formes coloniales (*e.g*. *Melosira* sp.), sont planctoniques et principalement présentes dans les milieux lentiques ou lotiques à faible courant. Certaines formes araphidées, souvent coloniales telles que les *Fragilaria* et *Asterionella*, ont également une vie planctonique. Les diatomées pennées, quant à elles, qu'elles soient mono-raphidées ou bi-raphidées, sont en grande partie benthiques et majoritaires dans les zones lotiques à fort courants, comme les zones amont des bassins versants. La structure et la composition des

communautés benthiques sont fortement liées à la nature du substrat, ainsi qu'aux conditions physico-chimiques du milieu...

La grande majorité des diatomées, est photo-autotrophe (photosynthétique). Certaines d'entre elles peuvent également utiliser différentes sources de carbone organique pour assurer leur développement : on parle alors de mixotrophie (Chu *et al.*, 1996; Lebeau and Robert, 2003). Quelques espèces arrivent même à survivre et à se diviser de façon totalement hétérotrophe (en l'absence de lumière et en utilisant un substrat carboné) durant plusieurs jours (Hellebust and Lewin, 1977 ; Lebeau and Robert, 2003). Enfin, de rares espèces marines vivent en symbiose avec des grands foraminifères et éponges et ne présentent pas de frustules (Raven *et al.*, 2000).

On estime que la production primaire mondiale est assurée à plus de 25% par les diatomées (Scala and Bowler, 2001). Elles assurent également ~ 40% de la production primaire marine (Falkowski, 2004, 1994). Les diatomées benthiques font partie des principaux producteurs de SPE, avec les bactéries. Ces SPE, vont aussi constituer une source d'alimentation importante pour de nombreux organismes consommateurs de biofilms photo-autotrophes tels que des larves d'insectes (*e.g*. Divers chironomidés), des mollusques (*e.g*. Physes, limnées, planorbes), et certains poissons (*e.g*. Le Toxostome : *Chondrostoma toxostoma*). Ainsi, les diatomées et autres organismes producteurs de SPE, vont avoir un rôle important dans régulation de la nutrition de nombreux organismes pélagiques et benthiques (Flemming and Wingender, 2001 ; Stevenson *et al.*, 1996).

7.4 Un allier de longue date en Eco-toxicologie et toxicologie environnementale

Les diatomées ont montré à maintes reprises leur utilité en tant que bio-indicateurs[45] de la pollution trophique et de la qualité des eaux (physicochimique). Elles sont d'ailleurs utilisées dans différents indices normalisés, comme par exemple l'Indice de Polluo-Sensibilité (Coste in CEMAGREF, 1982) (IPS), l'Indice Biologique Diatomée (IBD, Prygiel and Coste, 2000) ou le Trophic Diatoms Index (TDI, Kelly and Whitton, 1995). De plus récentes études mettent également en avant leur potentiel comme bio-indicateur de la pollution par des pesticides (Debenest *et al.*, 2010, 2009, 2008 ; Wood *et al.*, 2014) ou par des métaux lourds (Cantonati *et al.*, 2014 ; Medley and Clements, 1998 ; Zhang and Liu, 2014). Les diatomées permettent également d'évaluer les effets de ces différents polluants (métaux lourds et pesticides) à l'échelle cellulaire (*e.g.* croissance, métabolisme, photosynthèse, effets

[45] Définition d'un bio-indicateur : espèce vivante qui, par sa présence ou son absence, son abondance ou sa rareté, permet d'apprécier le degré de pollution de l'eau, de l'air (Larousse, 2014) ou du sol.

génotoxiques[46] et effets tératogènes[47] ; Debenest *et al.*, 2010 ; Falasco *et al.*, 2009).

8 Objectifs de la thèse

Les NTC sont d'ores et déjà vendus à l'international et destinés à des applications à grande échelle. Cette utilisation croissante risque de provoquer le rejet de NTC dans l'environnement. Pourtant, cette introduction a permis de prendre conscience des lacunes actuelles dans le domaine de la nano-écotoxicologie. Tester la toxicité des NTC dans une optique d'évaluation réaliste des risques environnementaux associés aux NTC semble donc particulièrement pertinent. C'est particulièrement le cas des risques encourus par les organismes du compartiment primaire des chaines trophiques et le devenir des NTC dans l'environnement sont encore mal connus. Les travaux effectués durant cette thèse ont dans la mesure du possible été orientés dans ce sens.

Afin de mieux évaluer les risques liés aux NTC, il est important de diversifier les modèles et études, ceci non seulement en étudiant les effets à l'échelle des individus, des populations et des communautés, mais également en prenant conscience de leurs conséquences sur les écosystèmes. Leurs effets réels et conséquences à l'échelle globale pourront alors mieux être évalués. Ici, nous avons fait le choix d'évaluer les effets de deux types de NTC (DWNTC et MWNTC) et leur comportement vis à vis d'un biofilm de diatomées. Pour cela, deux espèces de diatomées communes appartenant au genre très répandu des *Nitzschia* ont été choisies. Bien que pour le moment très rarement utilisées en nano-toxicologie environnementale et nano-écotoxicologie les diatomées benthiques, de par leur diversité, leur importance écologique, ainsi que leur facilité de culture, se sont présentées ici comme un modèle de choix pour étudier les effets et conséquences d'une exposition aux NTC sur des organismes benthiques de rivière (probablement les plus exposés Cf. § 2.1), mais également pour évaluer leurs rôles sur le comportement et le devenir des NTC à l'échelle des écosystèmes.

Le but de ce travail était d'évaluer les effets des NTC sur deux espèces de diatomées, à la fois à l'échelle des individus et celle des populations. Cette approche est primordiale, d'une part pour estimer la toxicité et les effets des NTC sur ces organismes, mais également pour mettre en place une stratégie pertinente et, sur certains aspects, novatrice pour la compréhension ultérieure des mécanismes associés. Du fait des contraintes liées à l'étude

[46] Phénomène compromettant l'intégrité physique et/ou fonctionnelle du génome.

[47] Induction d'anomalies morphologiques. Elle peut être la résultante d'effets génotoxiques mais également de nombreux disfonctionnements cellulaires (perturbation du cytosquelette, de la communication intracellulaire…)

des effets des NTC et plus globalement des NP (opacification du milieu, agglomération, comportement environnemental…), cette étape a nécessité la mise au point de dispositifs et de stratégies d'exposition pertinents d'un point de vue environnemental, tout en limitant un maximum les contraintes associées (temps, place disponible, coûts…). Pour cela, une miniaturisation et optimisation des dispositifs expérimentaux classiquement utilisés a été nécessaire et réalisée, d'une part pour s'adapter au mieux à l'écologie des organismes benthiques tout en facilitant les manipulations et d'autre part en limitant les quantités de NTC nécessaires pour les expériences.

Un deuxième objectif de la thèse était d'évaluer le potentiel d'entrée des NTC dans les diatomées, ainsi que leur accumulation sur et dans les biofilms, ceci *via* l'étude des interactions fréquemment observées entre les organismes et les NTC. Pour cela une attention particulière a été portée sur l'évaluation et la caractérisation des mécanismes liés à cette interaction en se focalisant à la fois sur les interactions NTC/SPE et NTC/Frustule. Différentes techniques permettant la détection des NTC dans des algues et dans les biofilms qu'elles forment ont été utilisées. Pour cela, de nombreuses approches, principalement microscopiques et biochimiques, ont été mises en œuvre et évaluées afin de prendre conscience des avantages et inconvénients de chacune d'entre elles, de leurs points forts et de leurs limites L'étude de cette interaction a également apporté des éléments de réponse sur le rôle qu'elle pouvait jouer sur les effets des NTC chez des organismes benthiques au cours du temps.

A final, cette étude avait pour but :

- une meilleure évaluation des effets des NTC chez des diatomées benthiques,
- de comprendre le rôle que les EPS pouvaient jouer sur ces effets,
- d'évaluer le rôle que les biofilms photo-autotrophes pouvaient jouer sur le devenir des NTC dans l'environnement et le long de chaines trophiques.

Références Bibliographiques

Ahmed, F., Santos, C.M., Vergara, R.A.M.V., Tria, M.C.R., Advincula, R., Rodrigues, D.F., 2012. Antimicrobial Applications of Electroactive PVK-SWNT Nanocomposites. Environ. Sci. Technol. 46, 1804–1810. doi:10.1021/es202374e

Aitken, R.J., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. Occup. Med. 56, 300–306. doi:10.1093/occmed/kql051

Ajayan, P.M., Zhou, O.Z., 2001. Applications of Carbon Nanotubes, in: Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., Avouris, P. (Eds.), Carbon Nanotubes. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 391–425.

Allen, B.L., Kotchey, G.P., Chen, Y., Yanamala, N.V.K., Klein-Seetharaman, J., Kagan, V.E., Star, A., 2009. Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes. J. Am. Chem. Soc. 131, 17194–17205. doi:10.1021/ja9083623

Alpatova, A.L., Shan, W., Babica, P., Upham, B.L., Rogensues, A.R., Masten, S.J., Drown, E., Mohanty, A.K., Alocilja, E.C., Tarabara, V.V., 2010. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: Effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions. Water Res. 44, 505–520. doi:10.1016/j.watres.2009.09.042

Aqel, A., El-Nour, K.M.M.A., Ammar, R.A.A., Al-Warthan, A., 2012. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. Arab. J. Chem. 5, 1–23. doi:10.1016/j.arabjc.2010.08.022

Arnold, M.S., Green, A.A., Hulvat, J.F., Stupp, S.I., Hersam, M.C., 2006. Sorting carbon nanotubes by electronic structure using density differentiation. Nat. Nanotechnol. 1, 60–65. doi:10.1038/nnano.2006.52

Artmann, U., Waringer, J.A., Schagerl, M., 2003. Seasonal dynamics of algal biomass and allochthonous input of coarse particulate organic matter in a low-order sandstone stream (Weidlingbach, Lower Austria). Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters 33, 77–91. doi:10.1016/S0075-9511(03)80037-3

Ávila, A.F., Lacerda, G.S.R., 2008. Molecular mechanics applied to single-walled carbon nanotubes. Mater. Res. 11, 325–333. doi:10.1590/S1516-14392008000300016

Awasthi, K., Srivastava, A., Srivastava, O.N., 2005. Synthesis of Carbon Nanotubes. J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 1616–1636. doi:10.1166/jnn.2005.407

Baines, S., Pace, M., 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. Limnol. Oceanogr. 36, 1078–1090. doi:10.4319/lo.1991.36.6.1078

Balasubramanian, K., Burghard, M., 2005. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. Small 1, 180–192. doi:10.1002/smll.200400118

Bánfalvi, G., 2011. Cellular effects of heavy metals. Springer, Dordrecht; New York.

Basiuk, E.V., Ochoa-Olmos, O.E., De la Mora-Estrada, L.F., 2011. Ecotoxicological Effects of Carbon Nanomaterials on Algae, Fungi and Plants. J. Nanosci. Nanotechnol. 11, 3016–3038. doi:10.1166/jnn.2011.3767

Baun, A., Sørensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B., Koch, C.B., 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. Aquat. Toxicol. 86, 379–387. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.019

Bazerman, C., De los Santos, R.A., 2005. Measuring Incommensurability: Are Toxicology and Ecotoxicology Blind to What the Other Sees, in: Rhetoric and Incommensurability. Randy Allen Harris, West Lafayette, Indiana, pp. 424–463.

Béduer, A., Seichepine, F., Flahaut, E., Loubinoux, I., Vaysse, L., Vieu, C., 2012. Elucidation of the Role of Carbon Nanotube Patterns on the Development of Cultured Neuronal Cells. Langmuir 28, 17363–17371. doi:10.1021/la304278n

Beigbeder, A., Degee, P., Conlan, S.L., Mutton, R.J., Clare, A.S., Pettitt, M.E., Callow, M.E., Callow, J.A., Dubois, P., 2008. Preparation and characterisation of silicone-based coatings filled with carbon nanotubes and natural sepiolite and their application as marine fouling-release coatings. Biofouling 24, 291–302. doi:10.1080/08927010802162885

Belin, T., Epron, F., 2005. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. Mater. Sci. Eng. B 119, 105–118. doi:10.1016/j.mseb.2005.02.046

Bethune, D.S., Klang, C.H., de Vries, M.S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., Beyers, R., 1993. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. Nature 363, 605–607. doi:10.1038/363605a0

Betts, J.N., Johnson, M.G., Rygiewicz, P.T., King, G.A., Andersen, C.P., 2013. Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. Environ. Toxicol. Chem. 32, 889–893. doi:10.1002/etc.2123

Bhushan, B., 2010. Springer handbook of nanotechnology, third revised and extended edition. Springer, Heidelberg; New York.

Biswas, P., Wu, C.-Y., 2005. Nanoparticles and the environment. J. Air Waste Manag. Assoc. 1995 55, 708–746.

Blaise, C., Gagné, F., Férard, J.F., Eullaffroy, P., 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environ. Toxicol. 23, 591–598. doi:10.1002/tox.20402

Bliefert, C., Perraud, R., 2008. Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets. De Boeck, Bruxelles, Belgique

Bouchard, D., Zhang, W., Powell, T., Rattanaudompol, U., 2012. Aggregation Kinetics and Transport of Single-Walled Carbon Nanotubes at Low Surfactant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 46, 4458–4465. doi:10.1021/es204618v

Bourdiol, F., Dubuc, D., Grenier, K., Mouchet, F., Gauthier, L., Flahaut, E., 2014. Quantitative detection of carbon nanotubes in biological samples by an original method based on microwave permittivity measurements. Carbon. doi:10.1016/j.carbon.2014.09.086

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. Carbon 54, 175–191. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024

Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., Stal, L.J., 2005. Biogenic Stabilization of Intertidal Sediments: The Importance of Extracellular Polymeric Substances Produced by Benthic Diatoms. Microb. Ecol. 49, 501–512. doi:10.1007/s00248-004-0020-z

Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S.I., Jakobsen, K.S., Pawlowski, J., 2007. Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups. PLoS ONE 2, e790. doi:10.1371/journal.pone.0000790

Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases 2, MR17. doi:10.1116/1.2815690

Cantonati, M., Angeli, N., Virtanen, L., Wojtal, A.Z., Gabrieli, J., Falasco, E., Lavoie, I., Morin, S., Marchetto, A., Fortin, C., Smirnova, S., 2014. Achnanthidium minutissimum (Bacillariophyta) valve deformities as indicators of metal enrichment in diverse widely-distributed freshwater habitats. Sci. Total Environ. 475, 201–215. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.018

Carson, R., 1962. Silent spring. Houghton Mifflin, Boston.

Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. Mar. Pollut. Bull. 44, 7–15. doi:10.1016/S0025-326X(01)00253-3

Che, G., Lakshmi, B.B., Martin, C.R., Fisher, E.R., Ruoff, R.S., 1998. Chemical Vapor Deposition Based Synthesis of Carbon Nanotubes and Nanofibers Using a Template Method. Chem. Mater. 10, 260–267. doi:10.1021/cm970412f

Chen, C.-S., Anaya, J.M., Zhang, S., Spurgin, J., Chuang, C.-Y., Xu, C., Miao, A.-J., Chen, E.Y.-T., Schwehr, K.A., Jiang, Y., Quigg, A., Santschi, P.H., Chin, W.-C., 2011. Effects of Engineered

Nanoparticles on the Assembly of Exopolymeric Substances from Phytoplankton. PLoS ONE 6, e21865. doi:10.1371/journal.pone.0021865

Chen, R., Ratnikova, T.A., Stone, M.B., Lin, S., Lard, M., Huang, G., Hudson, J.S., Ke, P.C., 2010. Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. Small 6, 612–617. doi:10.1002/smll.200901911

Chen, Y.-P., Zhang, P., Guo, J.-S., Fang, F., Gao, X., Li, C., 2013. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. Chemosphere 92, 633–638. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.059

Chepurnov, V.A., Mann, D.G., 1997. Variation in the sexual behaviour of natural clones of Achnanthes longipes (Bacillariophyta). Eur. J. Phycol. 32, 147–154. doi:10.1080/09670269710001737079

Chepurnov, V.A., Mann, D.G., 1999. Variation in the sexual behaviour of Achnanthes longipes (Bacillariophyta). II. Inbred monoecious lineages. Eur. J. Phycol. 34, 1–11. doi:10.1080/09670269910001736022

Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vyverman, W., 2004. Experimental Studies on Sexual Reproduction in Diatoms, in: International Review of Cytology. Elsevier, pp. 91–154.

Chepurnov, V., Mann, D., 2000. Variation in the sexual behaviour of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). III. Progeny of crosses between monoecious and unisexual clones. Eur. J. Phycol. 35, 213–223. doi:10.1080/09670260010001735821

Christensen, B.E., Characklis, W.G., 1990. Physical properties of biofilms. In Biofilms, Wiley. ed. Characklis W. G. & Marshall K. C., New York.

Chu, W.-L., Phang, S.-M., Goh, S.-H., 1996. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. J. Appl. Phycol. 8, 389–396. doi:10.1007/BF02178582

Colomer, J.-F., Stephan, C., Lefrant, S., Van Tendeloo, G., Willems, I., Kónya, Z., Fonseca, A., Laurent, C., Nagy, J.., 2000. Large-scale synthesis of single-wall carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition (CCVD) method. Chem. Phys. Lett. 317, 83–89. doi:10.1016/S0009-2614(99)01338-X

Coste in CEMAGREF, 1982. Etude des méthodes biologiques quantitatives d'appréciation de la qualité des eaux. (Rapport Q.E. Lyon). A.F.B. Rhône-Méditerranée-Corse.

Dai, H., 2002. Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. Acc. Chem. Res. 35, 1035–1044. doi:10.1021/ar0101640

Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. Aquat. Toxicol. 93, 11–17. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.014

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. Aquat. Toxicol. 88, 88–94. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.011

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 203. Springer New York, New York, NY, pp. 87–103.

De Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., 2002. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylinfrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae)1. J. Phycol. 38, 464–472. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01164.x

De Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Stal, L.J., 2002. Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. Eur. J. Phycol. 37, 37–44. doi:10.1017/S0967026201003419

De Deckere, E.M.G.., Tolhurst, T.., de Brouwer, J.F.., 2001. Destabilization of Cohesive Intertidal Sediments by Infauna. Estuar. Coast. Shelf Sci. 53, 665–669. doi:10.1006/ecss.2001.0811

De Volder, M.F.L., Tawfick, S.H., Baughman, R.H., Hart, A.J., 2013. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. Science 339, 535–539. doi:10.1126/science.1222453

Dijon, J., 2005. Les nanotubes, canons à électrons à usages multiples. CLEFS CEA 113 – 115.

Dodds, W.K., 2010. Freshwater ecology: concepts and environmental applications of limnology, 2nd ed. ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston.

Doudrick, K., Herckes, P., Westerhoff, P., 2012. Detection of Carbon Nanotubes in Environmental Matrices Using Programmed Thermal Analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 12246–12253. doi:10.1021/es300804f

Ebbesen, T.W. (Ed.), 1997. Carbon nanotubes: preparation and properties. CRC Press, Boca Raton.

Ebbesen, T.W., Ajayan, P.M., 1992. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. Nature 358, 220–222. doi:10.1038/358220a0

Ebbesen, T.W., Ajayan, P.M., Hiura, H., Tanigaki, K., 1994. Purification of nanotubes. Nature 367, 519–519. doi:10.1038/367519a0

ECHA, (European CHemical Agency), 2014. Nanomatériaux. http://echa.europa.eu/fr/regulations/nanomaterials;jsessionid=049F617413A54EC4A44D7C6D68FF56FE.live2. Consulté en ligne le 30-09-2014

Edgington, A.J., Roberts, A.P., Taylor, L.M., Alloy, M.M., Reppert, J., Rao, A.M., Mao, J., Klaine, S.J., 2010. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2511–2518. doi:10.1002/etc.309

Edwards, B.C., Ragan, P., 2006. Leaving the planet by space elevator. Lulu.com, Seattle, WA.

Endo, M., Strano, M.S., Ajayan, P.M., 2008. Potential Applications of Carbon Nanotubes, in: Carbon Nanotubes. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 13–61.

Falasco, E., Bona, F., Ginepro, M., Hlúbiková, D., Hoffmann, L., Ector, L., 2009. Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. Water SA 35. doi:10.4314/wsa.v35i5.49185

Falkowski, P.G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. Photosynth. Res. 39, 235–258. doi:10.1007/BF00014586

Falkowski, P.G., 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. Science 305, 354–360. doi:10.1126/science.1095964

Farré, M., Pérez, S., Gajda-Schrantz, K., Osorio, V., Kantiani, L., Ginebreda, A., Barceló, D., 2010. First determination of C60 and C70 fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. J. Hydrol. 383, 44–51. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.08.016

FDA, 2012a. Guidance for Industry. Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. Draft Guidance. U.S. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition., USA. http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/GuidanceRegulation/GuidanceDocuments/UCM300932.pdf. Consulté en ligne le 19-08-2014

FDA, 2012b. Guidance for Industry. Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition., USA. http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm300661.htm. Consulté en ligne le 19-08-2014

Field, C.B., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. Science 281, 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237

Fifield, L.S., Dalton, L.R., Addleman, R.S., Galhotra, R.A., Engelhard, M.H., Fryxell, G.E., Aardahl, C.L., 2004. Noncovalent Functionalization of Carbon Nanotubes with Molecular Anchors Using Supercritical Fluids †. J. Phys. Chem. B 108, 8737–8741. doi:10.1021/jp037977l

Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. Chem. Commun. 1442. doi:10.1039/b301514a

Flemming, H.C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 43, 1–8. PMID:11381954

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. doi:10.1038/nrmicro2415

Future Markets Inc, 2013. The global market for carbon nanotubes to 2020 (No. 70). Future Markets Inc, Dublin, Ireland.

Gaillard, C., Cellot, G., Li, S., Toma, F.M., Dumortier, H., Spalluto, G., Cacciari, B., Prato, M., Ballerini, L., Bianco, A., 2009. Carbon Nanotubes Carrying Cell-Adhesion Peptides do not Interfere with Neuronal Functionality. Adv. Mater. 21, 2903–2908. doi:10.1002/adma.200900050

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

Ge, C., Du, J., Zhao, L., Wang, L., Liu, Y., Li, D., Yang, Y., Zhou, R., Zhao, Y., Chai, Z., Chen, C., 2011. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 16968–16973. doi:10.1073/pnas.1105270108

Ge, C., Li, Y., Yin, J.-J., Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., Chen, C., 2012. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. NPG Asia Mater. 4, e32. doi:10.1038/am.2012.60

Gerbersdorf, S.U., Westrich, B., Paterson, D.M., 2009. Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Fresh Water Sediments. Microb. Ecol. 58, 334–349. doi:10.1007/s00248-009-9498-8

Gordon, S.C., Butala, J.H., Carter, J.M., Elder, A., Gordon, T., Gray, G., Sayre, P.G., Schulte, P.A., Tsai, C.S., West, J., 2014. Workshop report: Strategies for setting occupational exposure limits for engineered nanomaterials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 68, 305–311. doi:10.1016/j.yrtph.2014.01.005

Gottschalk, F., Nowack, B., 2012. Modeling the environmental release and exposure of engineered nanomaterials, in: Towards Efficient Designing of Safe Nanomaterials: Innovative Merge of Computational Approaches and Experimental Techniques. Royal Society of Chemistry, pp. 284–313.

Gottschalk, F., Nowack, B., Gawlik, B., 2010. Development of Exposure Scenarios for Manufactured Nanomaterials Work Package 5 Report on exposure scenarios and release of nanomaterials to the environment (Including Deliverable D5.1).

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO 2 , ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environ. Sci. Technol. 43, 9216–9222. doi:10.1021/es9015553

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. Environ. Pollut. 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Guo, T., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D.T., Smalley, R.E., 1995. Catalytic growth of single-walled manotubes by laser vaporization. Chem. Phys. Lett. 243, 49–54. doi:10.1016/0009-2614(95)00825-O

Hajipour, M.J., Laurent, S., Aghaie, A., Rezaee, F., Mahmoudi, M., 2014. Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. Biomater. Sci. doi:10.1039/c4bm00131a

Hellebust, J.A., Lewin, J., 1977. Heterotrophic nutrition, in: The Biology of Diatoms, Botanical Monographs, ISSN 0068-0389 ; v. 13. Dietrich Werner, Berkeley and Los Angeles, pp. 169–197/ 498.

Hilding, J., Grulke, E.A., George Zhang, Z., Lockwood, F., 2003. Dispersion of Carbon Nanotubes in Liquids. J. Dispers. Sci. Technol. 24, 1–41. doi:10.1081/DIS-120017941

Hoek, C. van den, Mann, D. G, Jahns, H.M., 1995. Algae: an introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge; New York.

Holt, B.D., Shams, H., Horst, T.A., Basu, S., Rape, A.D., Wang, Y.-L., Rohde, G.K., Mofrad, M.R.K., Islam, M.F., Dahl, K.N., 2012. Altered Cell Mechanics from the Inside: Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin. J. Funct. Biomater. 3, 398–417. doi:10.3390/jfb3020398

Holzinger, M., Vostrowsky, O., Hirsch, A., Hennrich, F., Kappes, M., Weiss, R., Jellen, F., 2001. Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes This work was supported by the European Union under the 5th Framework Research Training Network 1999, HPRNT 1999-00011 FUNCARS. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40, 4002–4005.

Hristozov, D.R., Gottardo, S., Cinelli, M., Isigonis, P., Zabeo, A., Critto, A., Van Tongeren, M., Tran, L., Marcomini, A., 2013. Application of a quantitative weight of evidence approach for ranking and prioritising occupational exposure scenarios for titanium dioxide and carbon nanomaterials. Nanotoxicology 1–15. doi:10.3109/17435390.2012.760013

Hughes, M.E., Brandin, E., Golovchenko, J.A., 2007. Optical Absorption of DNA−Carbon Nanotube Structures. Nano Lett. 7, 1191–1194. doi:10.1021/nl062906u

Hunter, C.A., Sanders, J.K.M., 1990. The nature of .pi.-.pi. interactions. J. Am. Chem. Soc. 112, 5525–5534. doi:10.1021/ja00170a016

Hussain, F., 2006. Review article: Polymer-matrix Nanocomposites, Processing, Manufacturing, and Application: An Overview. J. Compos. Mater. 40, 1511–1575. doi:10.1177/0021998306067321

Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.-H., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. Environ. Sci. Technol. 41, 179–184. doi:10.1021/es061817g

Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. Nature 354, 56–58. doi:10.1038/354056a0

Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. Nature 363, 603–605. doi:10.1038/363603a0

iRAP, Inc. 2011. Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphene and nanodiamonds: A global technology survey and market analysis. (No. ET-113). Stamford, CT, USA.

Irin, F., Shrestha, B., Cañas, J.E., Saed, M.A., Green, M.J., 2012. Detection of carbon nanotubes in biological samples through microwave-induced heating. Carbon 50, 4441–4449. doi:10.1016/j.carbon.2012.05.022

Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K.A., Vogel, U., Wallin, H., 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chem. Cent. J. 7, 154. doi:10.1186/1752-153X-7-154

Janmey, P.A., 1998. The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. Physiol. Rev. 78, 763–781.

Jiang, K., Eitan, A., Schadler, L.S., Ajayan, P.M., Siegel, R.W., Grobert, N., Mayne, M., Reyes-Reyes, M., Terrones, H., Terrones, M., 2003. Selective Attachment of Gold Nanoparticles to Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes. Nano Lett. 3, 275–277. doi:10.1021/nl025914t

Journet, C., Maser, W.K., Bernier, P., Loiseau, A., de la Chapelle, M.L., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., Fischer, J.E., 1997. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. Nature 388, 756–758. doi:10.1038/41972

Kagan, V.E., Konduru, N.V., Feng, W., Allen, B.L., Conroy, J., Volkov, Y., Vlasova, I.I., Belikova, N.A., Yanamala, N., Kapralov, A., Tyurina, Y.Y., Shi, J., Kisin, E.R., Murray, A.R., Franks, J.,

Stolz, D., Gou, P., Klein-Seetharaman, J., Fadeel, B., Star, A., Shvedova, A.A., 2010. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. Nat. Nanotechnol. 5, 354–359. doi:10.1038/nnano.2010.44

Kah, M., Hofmann, T., 2014. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. Environ. Int. 63, 224–235. doi:10.1016/j.envint.2013.11.015

Kam, N., Dai, H., 2006. Single walled carbon nantoubes for transport and delivery of biological cargos. Phys Stat Sol 243, 3561–3566. doi:10.1002/pssb.200669226

Kam, N.W.S., Dai, H., 2005. Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality. J. Am. Chem. Soc. 127, 6021–6026. doi:10.1021/ja050062v

Kam, N.W.S., Liu, Z., Dai, H., 2006. Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. Angew. Chem. 118, 591–595. doi:10.1002/ange.200503389

Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2008a. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! Langmuir 24, 6409–6413. doi:10.1021/la800951v

Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M., 2008b. Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotube Bacterial Cytotoxicity. Environ. Sci. Technol. 42, 7528–7534. doi:10.1021/es8010173

Karthikeyan, S., Mahalingam, P., Karthik, M., 2009. Large Scale Synthesis of Carbon Nanotubes. E-J. Chem. 6, 1–12. doi:10.1155/2009/756410

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

Kelly, M.G., Whitton, B.A., 1995. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. J. Appl. Phycol. 7, 433–444. doi:10.1007/BF00003802

Kennedy, A.J., Hull, M.S., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A., 2008. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1932. doi:10.1897/07-624.1

Kim, B., Park, H., Sigmund, W.M., 2003. Electrostatic Interactions between Shortened Multiwall Carbon Nanotubes and Polyelectrolytes. Langmuir 19, 2525–2527. doi:10.1021/la026746n

Klaassen, C.D., Casarett, L.J., Doull, J., 2013. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill Education, New York, USA. 1309

Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanaomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1825. doi:10.1897/08-090.1

Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Carley, S., Handy, R.D., Kapustka, L., Nowack, B., von der Kammer, F., 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. Environ. Toxicol. Chem. 31, 3–14. doi:10.1002/etc.733

Koelmans, A.A., Nowack, B., Wiesner, M.R., 2009. Comparison of manufactured and black carbon nanoparticle concentrations in aquatic sediments. Environ. Pollut. 157, 1110–1116. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.006

Köhler, A.R., Som, C., Helland, A., Gottschalk, F., 2008. Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. J. Clean. Prod. 16, 927–937. doi:10.1016/j.jclepro.2007.04.007

Kostarelos, K., Bianco, A., Prato, M., 2009. Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. Nat. Nanotechnol. 4, 627–633. doi:10.1038/nnano.2009.241

Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.-P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A., 2007. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nat. Nanotechnol. 2, 108–113. doi:10.1038/nnano.2006.209

Krupke, R., 2003. Separation of Metallic from Semiconducting Single-Walled Carbon Nanotubes. Science 301, 344–347. doi:10.1126/science.1086534

Kümmerer, K., Menz, J., Schubert, T., Thielemans, W., 2011. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. Chemosphere 82, 1387–1392. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.069

Kwok, K.W., Leung, K.M., Flahaut, E., Cheng, J., Cheng, S.H., 2010. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. Nanomed. 5, 951–961. doi:10.2217/nnm.10.59

Lam, C., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. Crit. Rev. Toxicol. 36, 189–217. doi:10.1080/10408440600570233

Larousse, 2014. Dictionnaire de Français. http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/bio-indicateur/9426. Consulté en ligne le 19-06-2014

Laurent, C., Flahaut, E., Peigney, A., 2010. The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter. Carbon 48, 2994–2996. doi:10.1016/j.carbon.2010.04.010

Lauwerys, R.R., 2007. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelle. Elsevier Masson, Paris, France

Lebeau, T., Robert, J.-M., 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. Appl. Microbiol. Biotechnol. 612–623.

Lecointre, G., Le Guyader, H., 2006. Classification phylogénétique du vivant. Belin, Paris, France

Leitão, M., Couté, A., 2005. Guide pratique des cyanobactéries planctoniques du Grand Ouest de la France: manuel pour les prélèvements et la reconnaissance à l'usage des gestionnaires des eaux de surface : caractéristiques, échantillonnage, identification. Agence de l'eau Seine-Normandie, [Nanterre].

Lévêque, C., 1996. Ecosystèmes aquatiques. Hachette, Paris, France

Liang, Z., Li, W., Yang, S., Du, P., 2010. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. Chemosphere 81, 626–632. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.043

Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Singh, R., Suhonen, S., Järventaus, H., Vanhala, E., Catalán, J., Farmer, P.B., Savolainen, K.M., Norppa, H., 2013. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. Toxicology 313, 24–37. doi:10.1016/j.tox.2012.12.008

Liu, X., Gurel, V., Morris, D., Murray, D.W., Zhitkovich, A., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2007. Bioavailability of Nickel in Single-Wall Carbon Nanotubes. Adv. Mater. 19, 2790–2796. doi:10.1002/adma.200602696

Liu, Y., Liang, P., Zhang, H.-Y., Guo, D.-S., 2006. Cation-Controlled Aqueous Dispersions of Alginic-Acid-Wrapped Multi-Walled Carbon Nanotubes. Small 2, 874–878. doi:10.1002/smll.200600099

Li, Y.-H., Ding, J., Luan, Z., Di, Z., Zhu, Y., Xu, C., Wu, D., Wei, B., 2003a. Competitive adsorption of Pb2+, Cu2+ and Cd2+ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. Carbon 41, 2787–2792. doi:10.1016/S0008-6223(03)00392-0

Li, Y.-H., Wang, S., Luan, Z., Ding, J., Xu, C., Wu, D., 2003b. Adsorption of cadmium(II) from aqueous solution by surface oxidized carbon nanotubes. Carbon 41, 1057–1062. doi:10.1016/S0008-6223(02)00440-2

Li, Y.-H., Wang, S., Wei, J., Zhang, X., Xu, C., Luan, Z., Wu, D., Wei, B., 2002. Lead adsorption on carbon nanotubes. Chem. Phys. Lett. 357, 263–266. doi:10.1016/S0009-2614(02)00502-X

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. Environ. Sci. Technol. 46, 8458–8466. doi:10.1021/es301802g

Luther, G.W., Rickard, D.T., 2005. Metal Sulfide Cluster Complexes and their Biogeochemical Importance in the Environment. J. Nanoparticle Res. 7, 389–407. doi:10.1007/s11051-005-4272-4

Mann, D.G., 1999. The species concept in diatoms. Phycologia 38, 437–495. doi:10.2216/i0031-8884-38-6-437.1

Marcato-Romain, C.E., Pechaud, Y., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., Dossat-Létisse, V., 2012. Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. Biofouling 28, 305–314. doi:10.1080/08927014.2012.673122

MarketsandMarkets, 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 (No. AD 2183).

Martins, P.S. de O., Almeida, N.F. de, Leite, S.G.F., 2008. Application of a bacterial extracellular polymeric substance in heavy metal adsorption in a co-contaminated aqueous system. Braz. J. Microbiol. 39, 780–786. doi:10.1590/S1517-83822008000400034

Maser, W.K., Muñoz, E., Benito, A.M., Martínez, M.T., de la Fuente, G.F., Maniette, Y., Anglaret, E., Sauvajol, J.-L., 1998. Production of high-density single-walled nanotube material by a simple laser-ablation method. Chem. Phys. Lett. 292, 587–593. doi:10.1016/S0009-2614(98)00776-3

Matorin, D.N., Karateyeva, A.V., Osipov, V.A., Lukashev, E.P., Seifullina, N.K., Rubin, A.B., 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Nanotechnologies Russ. 5, 320–327. doi:10.1134/S199507801005006X

Maynard, A.D., 2006. Safe handling of nanotechnology. Nature 444, 267–269. doi:10.1038/444267a

Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Castranova, V., 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. J. Toxicol. Environ. Health A 67, 87–107. doi:10.1080/15287390490253688

Medley, C.N., Clements, W.H., 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. Ecol. Appl. 8, 631–644. doi:10.1890/1051-0761(1998)008[0631:RODCTH]2.0.CO;2

Ministère de L'écologie, du Développement Durable et de L'énergie, 2014. Nanomateriaux. http://www.developpement-durable.gouv.fr/-Nanomateriaux-.html. Consulté en ligne le 19-08-2014

Ministère de L'écologie, du Développement Durable et de L'énergie, ANSES, 2013. R-Nano.fr Déclaration des substances à l'état nanoparticulaire. https://www.r-nano.fr/. Consulté en ligne le 19-08-2014

Miranda, A.A., Shaikh, S.M., Sarode, P.R., Desai, P.V., 2012. Carbon Nanoparticle Toxicity to marine algae Navicula longa and isochrysis galbana. Indian J. Geo-Mar. Sci. 41, 331–337.

Monthioux, M., Kuznetsov, V.L., 2006. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? Carbon 44, 1621–1623. doi:10.1016/j.carbon.2006.03.019

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ. Int. 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2011. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. Environ. Toxicol. 26, 136–145. doi:10.1002/tox.20537

Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. Environ. Sci. Technol. 42, 4447–4453. doi:10.1021/es7029637

Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. Chem. Rev. 140613144559008. doi:10.1021/cr400295a

Murr, L.E., Soto, K.F., Esquivel, E.V., Bang, J.J., Guerrero, P.A., Lopez, D.A., Ramirez, D.A., 2004. Carbon nanotubes and other fullerene-related nanocrystals in the environment: A TEM study. JOM 56, 28–31. doi:10.1007/s11837-004-0106-6

Nakashima, N., Tomonari, Y., Murakami, H., 2002. Water-Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes via Noncovalent Sidewall-Functionalization with a Pyrene-Carrying Ammonium Ion. Chem. Lett. 638–638. doi:10.1246/cl.2002.638

Nanowerk, 2014. Carbon nanotubes (purification No. 101). Nanowerk. http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_24.php#ixzz39QCtuluD. Consulté en ligne le 13-08-2014

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Nel, A., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science 311, 622–627. doi:10.1126/science.1114397

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nat. Mater. 8, 543–557. doi:10.1038/nmat2442

Nielsen, P., Jahn, A., Palmgren, R., 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. Water Sci. Technol. 36, 11–19. doi:10.1016/S0273-1223(97)00318-1

Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity*. Phycologia 35, 308–326. doi:10.2216/i0031-8884-35-4-308.1

Nowack, B., Bucheli, T., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ. Pollut. 150, 5–22. doi:10.1016/j.envpol.2007.06.006

Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A.A., Klaine, S.J., 2012. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. Environ. Toxicol. Chem. 31, 50–59. doi:10.1002/etc.726

Oberlin, A., Endo, M., Koyama, T., 1976. Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. J. Cryst. Growth 32, 335–349. doi:10.1016/0022-0248(76)90115-9

OECD, 2002. Detailed Review Document on Classification Systems for Sensitising Substances in OECD Member Countries, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing. Paris, France

OECD, 2010. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27. Paris, France

Olivi, M., Zanni, E., De Bellis, G., Talora, C., Sarto, M.S., Palleschi, C., Flahaut, E., Monthioux, M., Rapino, S., Uccelletti, D., Fiorito, S., 2013. Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks. Nanoscale 5, 9023. doi:10.1039/c3nr02091f

Park, H., Afzali, A., Han, S.-J., Tulevski, G.S., Franklin, A.D., Tersoff, J., Hannon, J.B., Haensch, W., 2012. High-density integration of carbon nanotubes via chemical self-assembly. Nat. Nanotechnol. 7, 787–791. doi:10.1038/nnano.2012.189

Park, H., Haensch, W., 2012. Carbon nanotubes to keep up with Moore's Law. http://ibmresearchnews.blogspot.fr/2012/10/carbon-nanotubes-to-keep-up-with-moores.html. Consulté en ligne le 27-07-2014

Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R.R., Rousset, A., 2001. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. Carbon 39, 507–514. doi:10.1016/S0008-6223(00)00155-X

Pereira, M.M., Mouton, L., Yéprémian, C., Couté, A., Lo, J., Marconcini, J.M., Ladeira, L.O., Raposo, N.R., Brandão, H.M., Brayner, R., 2014. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in Chlorella vulgaris. J. Nanobiotechnology 12, 15. doi:10.1186/1477-3155-12-15

Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. 398, 613–650. doi:10.1007/s00216-010-3881-7

Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O'Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., Chen, K.L., 2011. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. Environ. Sci. Technol. 45, 9837–9856. doi:10.1021/es201579y

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14. doi:10.1007/s11051-012-1109-9

Porter, A.E., Gass, M., Muller, K., Skepper, J.N., Midgley, P.A., Welland, M., 2007. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. Nat. Nanotechnol. 2, 713–717. doi:10.1038/nnano.2007.347

Prygiel, J., Coste, M., 2000. Guide Méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T 90-354.

Pumera, M., 2007. Carbon Nanotubes Contain Residual Metal Catalyst Nanoparticles even after Washing with Nitric Acid at Elevated Temperature Because These Metal Nanoparticles Are Sheathed by Several Graphene Sheets. Langmuir 23, 6453–6458. doi:10.1021/la070088v

Pumera, M., Iwai, H., 2009a. Multicomponent Metallic Impurities and Their Influence upon the Electrochemistry of Carbon Nanotubes. J. Phys. Chem. C 113, 4401–4405. doi:10.1021/jp900069e

Pumera, M., Iwai, H., 2009b. Metallic Impurities within Residual Catalyst Metallic Nanoparticles Are in Some Cases Responsible for "Electrocatalytic" Effect of Carbon Nanotubes. Chem. - Asian J. 4, 554–560. doi:10.1002/asia.200800420

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

Qu, L., Dai, L., Stone, M., Xia, Z., Wang, Z.L., 2008. Carbon Nanotube Arrays with Strong Shear Binding-On and Easy Normal Lifting-Off. Science 322, 238–242. doi:10.1126/science.1159503

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie: fondements et applications. Tec & Doc : Lavoisier, Paris, France

Ras, M., Elisabeth, G.-N., Etienne, P., Dominique, L., 2008. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. Bioresour. Technol. 99, 7464–7471. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.025

Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., 2011. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. Water Res. 45, 1529–1538. doi:10.1016/j.watres.2010.11.021

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., Bouharmont, J., Evrard, C.-M., 2000. Biologie végétale. De Boeck Université, Paris, France

REACH, 2007. règlement n° 1907/2006. http://www.lifereachnano.eu/index.php/objectives. Consulté en ligne le 15-09-2014

REACHnano, 2012. http://www.lifereachnano.eu/index.php/objectives. Consulté en ligne le 15-09-2014

Resende, R., Tonelli, F.M.P., Santos, A.K., Gomes, K.N., Lorençon, E., Ladeira, L.O., Guatimosim, S., 2012. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. Int. J. Nanomedicine 4511. doi:10.2147/IJN.S33612

Reviers, B. de, Bosquet, Gilles, Blondel, L., Martin, C., 2002. Biologie et phylogénie des algues. Tome 1 Tome 1. Belin, Paris, France

Roco, M.C., 2005. Environmentally responsible development of nanotechnology. Environ. Sci. Technol. 39, 106A–112A.

Roux, D., 2014. "Colloïdes. Encycl. Universalis En Ligne. http://www.universalis.fr/encyclopedie/colloides/. Consulté en ligne le 21-08-2014

Royal Botanic garden Edinburgh, 2014. Publications by phycologists of the Royal Botanic Garden Edinburgh. Edinburg. Royaume Uni

Santschi, P., Balnois, E., Wilkinson, K.J., Zhang, J., Buffle, J., Guo, L., 1998. Fibrillar polysaccharides in marine macromolecular organic matter as imaged by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. Limnol. Oceanogr. 43, 896–908. doi:10.4319/lo.1998.43.5.0896

Sargent, L.M., Hubbs, A.F., Young, S.-H., Kashon, M.L., Dinu, C.Z., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Siegrist, K.J., Battelli, L., Mastovich, J., Sturgeon, J.L., Bunker, K.L., Shvedova, A.A., Reynolds, S.H., 2012. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 745, 28–37. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.017

Sargent, L.M., Shvedova, A.A., Hubbs, A.F., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Friend, S., McKinstry, K.T., Battelli, L., Reynolds, S.H., 2009. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. Environ. Mol. Mutagen. 50, 708–717. doi:10.1002/em.20529

Sato, S., Beakes, G., Idei, M., Nagumo, T., Mann, D.G., 2011. Novel Sex Cells and Evidence for Sex Pheromones in Diatoms. PLoS ONE 6, e26923. doi:10.1371/journal.pone.0026923

Scala, S., Bowler, C., 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. Cell. Mol. Life Sci. 58, 1666–1673. doi:10.1007/PL00000804

SCENIHR, 2007. Opinion on The appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials. Commission européenne.

Schäfer, R.B., Gerner, N., Kefford, B.J., Rasmussen, J.J., Beketov, M.A., de Zwart, D., Liess, M., von der Ohe, P.C., 2013. How to Characterize Chemical Exposure to Predict Ecologic Effects on Aquatic Communities? Environ. Sci. Technol. 47, 7996–8004. doi:10.1021/es4014954

Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T., Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. Env. Sci Nano. doi:10.1039/C4EN00063C

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? Environ. Sci. Technol. 45, 6136–6144. doi:10.1021/es200506b

Scott, C.D., Arepalli, S., Nikolaev, P., Smalley, R.E., 2001. Growth mechanisms for single-wall carbon nanotubes in a laser-ablation process: Appl. Phys. Mater. Sci. Process. 72, 573–580. doi:10.1007/s003390100761

Shams, H., Holt, B.D., Mahboobi, S.H., Jahed, Z., Islam, M.F., Dahl, K.N., Mofrad, M.R.K., 2014. Actin Reorganization through Dynamic Interactions with Single-Wall Carbon Nanotubes. ACS Nano 8, 188–197. doi:10.1021/nn402865e

Shi, X., von dem Bussche, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., Gao, H., 2011. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. Nat. Nanotechnol. 6, 714–719. doi:10.1038/nnano.2011.151

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30, 3891–3914. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.009

Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., 1996. Algal ecology freshwater benthic ecosystems. Academic Press, San Diego, USA. 753

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environ. Pollut. 185, 69–76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004

Thomas, T., Bahadori, T., Savage, N., Thomas, K., 2009. Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 1, 426–433. doi:10.1002/wnan.34

Trobajo, R., Mann, D.G., Chepurnov, V.A., Clavero, E., Cox, E.J., 2006. Taxonomy, life cycle, and auxosporulation of *Nitzschia fonticola* (Bacillariophyta). J. Phycol. 42, 1353–1372. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00291.x

Tuzen, M., Saygi, K.O., Usta, C., Soylak, M., 2008. Pseudomonas aeruginosa immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions. Bioresour. Technol. 99, 1563–1570. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.013

Upadhyayula, V.K.K., Gadhamshetty, V., 2010. Appreciating the role of carbon nanotube composites in preventing biofouling and promoting biofilms on material surfaces in environmental engineering: A review. Biotechnol. Adv. 28, 802–816. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.06.006

Vallés, C., Pérez-Mendoza, M., Martínez, M.T., Maser, W.K., Benito, A.M., 2007. CVD production of double-wall and triple-wall carbon nanotubes. Diam. Relat. Mater. 16, 1087–1090. doi:10.1016/j.diamond.2006.11.007

Velzeboer, I., Peeters, E.T.H.M., Koelmans, A.A., 2013. Multiwalled Carbon Nanotubes at Environmentally Relevant Concentrations Affect the Composition of Benthic Communities. Environ. Sci. Technol. 130612074310008. doi:10.1021/es400777j

Von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. Environ. Toxicol. Chem. 31, 32–49. doi:10.1002/etc.723

Von Moos, N., Slaveykova, V.I., 2013. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 1–26. doi:10.3109/17435390.2013.809810

Walczyk, D., Bombelli, F.B., Monopoli, M.P., Lynch, I., Dawson, K.A., 2010. What the Cell "Sees" in Bionanoscience. J. Am. Chem. Soc. 132, 5761–5768. doi:10.1021/ja910675v

Wang, Y., Yang, K., 2013. Toxicity of single-walled carbon nanotubes on green microalga *Chromochloris zofingiensis*. Chin. J. Oceanol. Limnol. 31, 306–311. doi:10.1007/s00343-013-2131-1

Wang, Y.-Y., Lai, S.K., So, C., Schneider, C., Cone, R., Hanes, J., 2011. Mucoadhesive Nanoparticles May Disrupt the Protective Human Mucus Barrier by Altering Its Microstructure. PLoS ONE 6, e21547. doi:10.1371/journal.pone.0021547

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, Dunaliella tertiolecta. Aquat. Toxicol. 100, 194–201. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.001

Wick, P., Manser, P., Limbach, L., Dettlaffweglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W., Bruinink, A., 2007. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. Toxicol. Lett. 168, 121–131. doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.019

Wilson, N.R., Macpherson, J.V., 2009. Carbon nanotube tips for atomic force microscopy. Nat. Nanotechnol. 4, 483–491. doi:10.1038/nnano.2009.154

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds.), 1999. Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Winkler, D.A., Mombelli, E., Pietroiusti, A., Tran, L., Worth, A., Fadeel, B., McCall, M.J., 2013. Applying quantitative structure–activity relationship approaches to nanotoxicology: Current status and future potential. Toxicology 313, 15–23. doi:10.1016/j.tox.2012.11.005

Wolfstein, K., Stal, L., 2002. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effect of irradiance and temperature. Mar. Ecol. Prog. Ser. 236, 13–22. doi:10.3354/meps236013

Wood, R.J., Mitrovic, S.M., Kefford, B.J., 2014. Determining the relative sensitivity of benthic diatoms to atrazine using rapid toxicity testing: A novel method. Sci. Total Environ. 485-486, 421–427. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.115

Wu, B., Hu, D., Kuang, Y., Liu, B., Zhang, X., Chen, J., 2009. Functionalization of Carbon Nanotubes by an Ionic-Liquid Polymer: Dispersion of Pt and PtRu Nanoparticles on Carbon Nanotubes and Their Electrocatalytic Oxidation of Methanol. Angew. Chem. Int. Ed. 48, 4751–4754. doi:10.1002/anie.200900899

Yang, D.-Q., Rochette, J.-F., Sacher, E., 2005. Spectroscopic Evidence for π−π Interaction between Poly(diallyl dimethylammonium) Chloride and Multiwalled Carbon Nanotubes. J. Phys. Chem. B 109, 4481–4484. doi:10.1021/jp044511+

Yang, K., Xing, B., 2009. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. Environ. Pollut. 157, 1095–1100. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.007

Youn, S., Wang, R., Gao, J., Hovespyan, A., Ziegler, K.J., Bonzongo, J.-C.J., Bitton, G., 2012. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nanotoxicology 6, 161–172. doi:10.3109/17435390.2011.562329

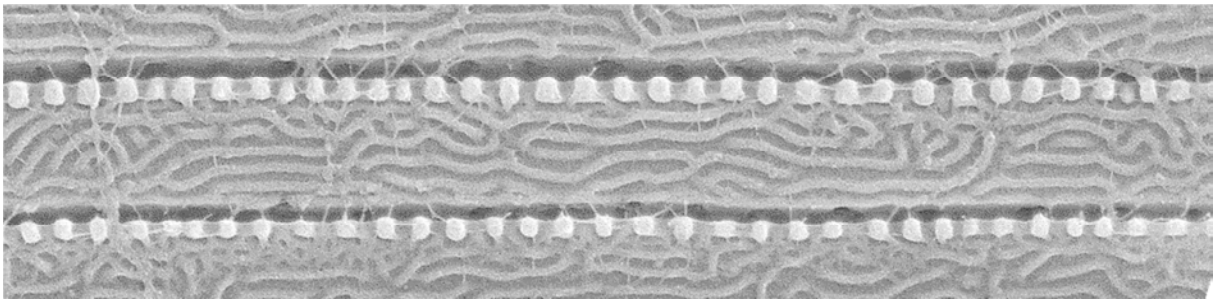
Zhang, L., Liu, J., 2014. In situ relationships between spatial–temporal variations in potential ecological risk indexes for metals and the short-term effects on periphyton in a macrophyte-dominated lake: a comparison of structural and functional metrics. Ecotoxicology 23, 553–566. doi:10.1007/s10646-014-1175-0

Zhang, L., Petersen, E.J., Habteselassie, M.Y., Mao, L., Huang, Q., 2013. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. Environ. Pollut. 181, 335–339. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.058

Zhang, S., Shao, T., Kose, H.S., Karanfil, T., 2012. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. Environ. Toxicol. Chem. 31, 79–85. doi:10.1002/etc.724

Zheng, M., 2003. Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly. Science 302, 1545–1548. doi:10.1126/science.1091911

Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., Hong, Y., 2007. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. Nano Lett. 7, 3592–3597. doi:10.1021/nl071303v



CHAPITRE 2

PRESENTATION DES MODELES D'ETUDE

1 Espèces Modèles

Deux diatomées du genre *Nitzschia* présentant des caractéristiques écologiques et morphologiques distinctes ont été sélectionnées pour réaliser ces travaux de thèse.

1.1 Particularité du genre *Nitzschia*

Le genre *Nitzschia*, très commun dans l'environnement, présente un grand nombre d'espèces qui sont souvent difficiles à identifier entre elles. Certaines espèces sont très abondantes dans les eaux riches en pollution organique. Ce genre est caractérisé par un raphé, dit nitzschioïde, excentré au niveau d'une des deux carènes[1] de chaque valve du frustule. Le raphé de chacune des valves est opposé à l'autre par rapport à l'axe central du frustule. La carène présentant le raphé est également caractérisée par des structures internes de renforcement, nommées fibules. Les valves ne présentent pas de renforcement central. Le genre présente des espèces ayant une large gamme de taille, allant d'une dizaine de micromètres à plus d'une centaine (Hofmann *et al.*, 2013).

1.2 *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith 1856

Le frustule peut présenter des variations en fonction des différentes variétés existantes. La plupart du temps, il est linéaire à linéaire-lancéolée (Figure 1a-b), rarement lancéolée, rétréci à l'apex, les extrémités sont fortement arrondies (Figure 1a-b). La longueur peut varier de 15 à 70 µm, la largeur de 2,5 à 5 µm. Le nombre de fibules varie entre 9 à 17 / 10 µm. Les deux fibules centrales ne sont pas plus éloignées entre elles que les autres. L'espèce présente un nombre de stries variant de 28 à 40 / 10 µm (Figure 1a-b), en dépit de leur forte densité, elles ne sont généralement pas distingables en microscopie optique. La détermination des variétés en microscopie optique est difficilement réalisable et reste souvent subjective. Cela vaut en particulier pour les populations rencontrées (ou isolées) dans des eaux faiblement à modérément chargées en nutriments, dans lesquelles plusieurs variétés peuvent coexister. Dans ces cas, il est recommandé de limiter la détermination au niveau de l'espèce, afin d'éviter toute erreur. (Hofmann *et al.*, 2013 ; Spaulding and Edlund, 2008). C'est également vrai pour les souches maintenues en culture pendant de longues périodes, qui peuvent présenter des modifications morphologiques (anomalies de frustule) et comportementales importantes. (Figure 1c-f, i).

[1] Crête de silice élevée au-dessus de la surface de la valve. Elle est formée par un repliement de la paroi. On peut rencontrer ce type de structures sur les diatomées du genre *Nitzschia*, *Surirella* et *Entomoneis* (Spaulding and Edlund, 2008).

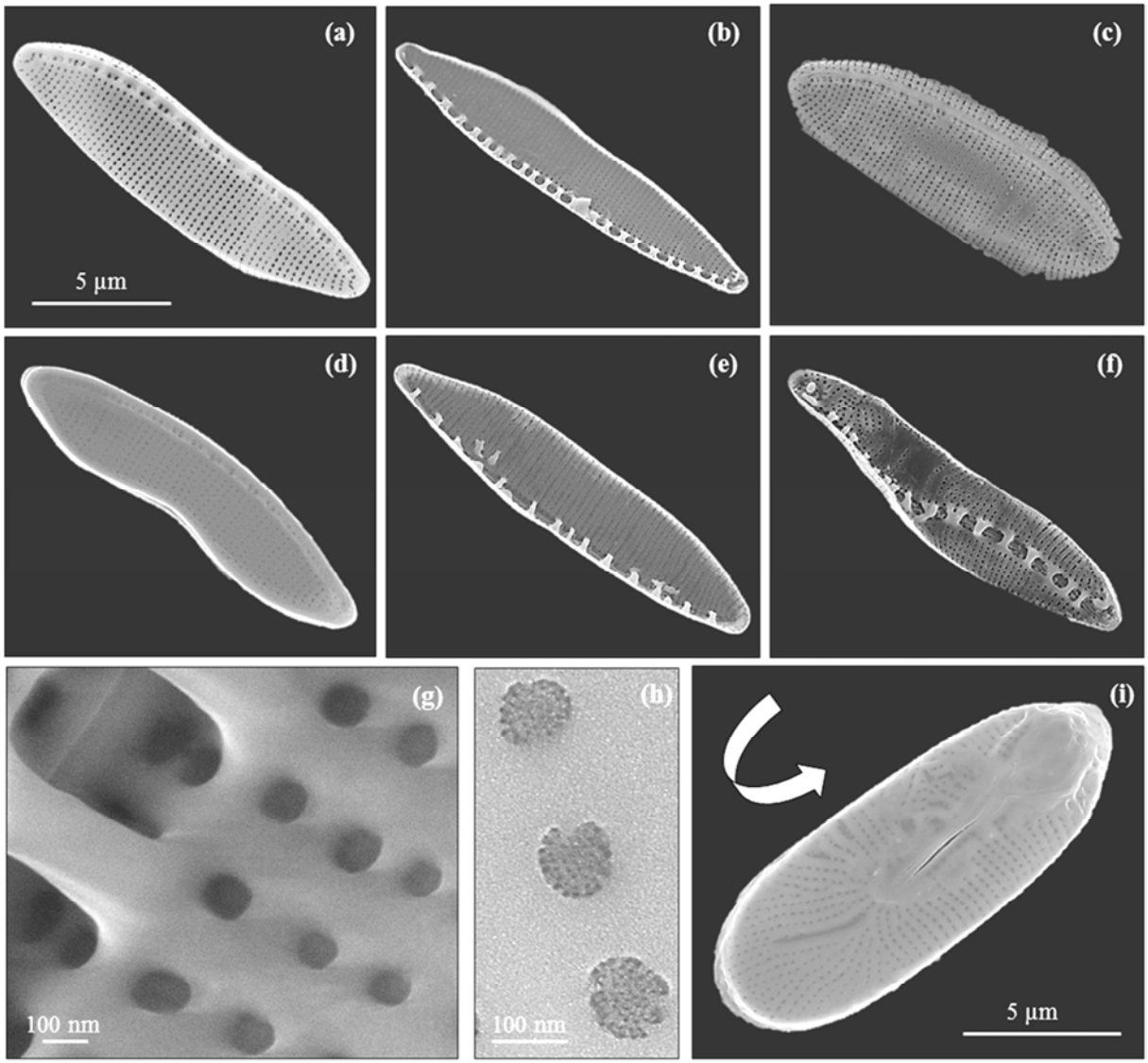


Figure 1 : Images de frustules de *Nitzschia palea* (souche CPCC 160 provenant du Canadian Phycological Culture Center) en microscopie électronique à balayage (MEB) après traitement à l'H_2O_2 et HCl (protocole AFNOR : NF EN 13946). (a) Frustule en vue de face externe ; on distingue la carène renforcée sur la partie droite du frustule ainsi que la zone d'implantation des fibules ne présentant pas de ponctuation. (b) frustule en vue interne mettant en avant les fibules réparties de façon homogène sur toute la longueur. (c-d-e-f-i) anomalies de frustules apparaissant spontanément dans la culture. Avec (c) un renflement du frustule, (d) une dépression en partie centrale, (e) des anomalies au niveau de la répartition et de la structure des fibules, (f) une inversion partielle de l'emplacement du raphé et une torsion à 180° effectuée au centre du raphé. (g) Détail du frustule en vue interne montrant le raphé (en haut à gauche), soutenu par les fibules. (h) vue externe des pores montrant un réseau nanométrique (Photos : L. Verneuil, EcoLab)

1.2.1 *Nitzschia palea* var. *palea*

Les populations de cette variété vivent dans des milieux moins spécifiques que d'autres variétés. On la retrouve dans les zones communes au genre Nitzschia avec une préférence pour des eaux de types mésotrophes à eutrophes (moyennement chargées à chargées en nutriments). Cette variété se développe également dans les eaux usées non traitées et dans des habitats qui sont fortement impactés par les effluents industriels. Elle est également présente en milieux oligotrophes en faible densité et côtoie souvent dans ce cas la variété

debilis. (Hofmann *et al.*, 2013 ; Spaulding and Edlund, 2008). En culture mono-spécifique, sans agitation ou avec agitation modérée, elle forme un biofilm uniforme qui peut être très adhérent au support de culture (Figure 2 a-b). Sous forte agitation ou dans certaines conditions, elle peut rester plus ou moins planctonique. La souche utilisée (CPCC160) provient du Canandian Phycological Culture Center et était cultivée dans du milieu de culture CHU10 (Annexe 1).

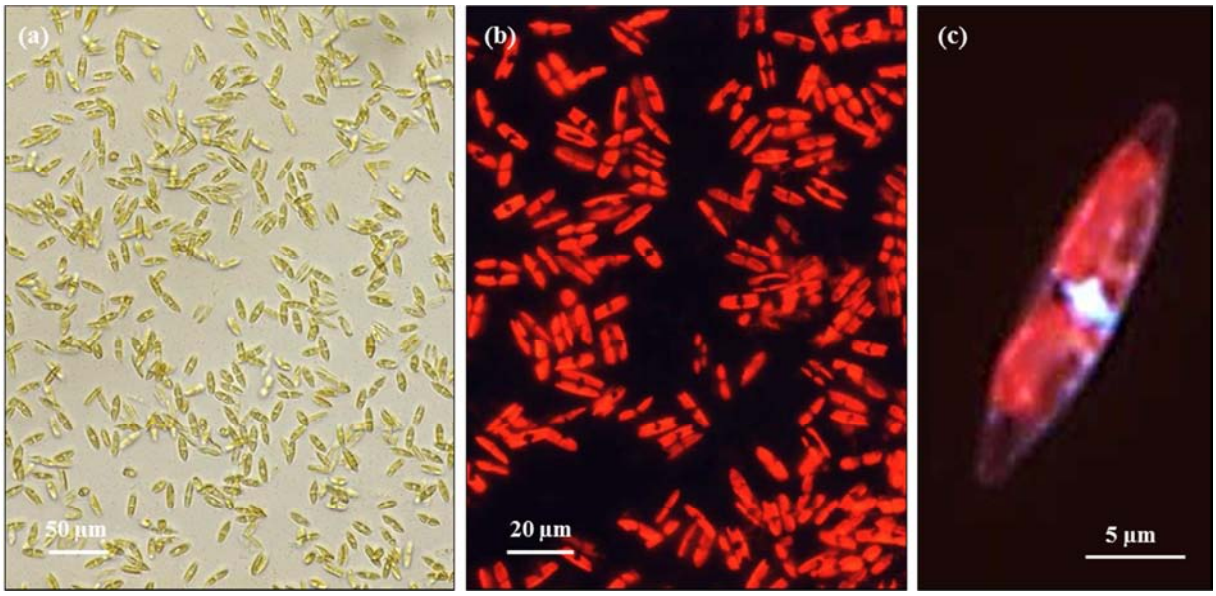


Figure 2 : (a) Culture de *Nitzschia palea* observée en microscopie à fond clair. La même culture observée sous microscope à épi-fluorescence (BX-41 lampe à mercure U-LH100HG Olympus, Center Valley, PA) montrant l'auto-fluorescence des chloroplastes (Ex : 448–550 nm, Em 590 nm, filtre dichromatique : 570 nm; U-MMSWG, Olympus). Détail d'une cellule à plus fort grossissement et après marquage au hoechst 33342. On observe à la fois l'auto-fluorescence des deux chloroplastes (rouge) et celle du marqueur (bleu) au niveau du noyau (Ex : 330–385 nm, Em : 420 nm, filtre dichromatique : 400 nm U-MWU2, Olympus. (Photos : L. Verneuil, EcoLab)

1.3 *Nitzschia linearis* (C. Agardh) W. smith 1853

Cette espèce présente un frustule assez large et linéaire à linéaire-lancéolé en vue de profil légèrement concave au centre (Figure 3b-c). En vue de face, elle et linéaire-lancéolée, légèrement concave au centre et lancéolée à l'extrémité (Figure 3b, 4a). Les extrémités rétrécies, rappelant une forme de bateau, sont arrondies et paraissent plates en MEB (Figure 4c-d). Chaque extrémité est d'un côté concave, de l'autre convexe et incurvée (Figure 4c-d). Le raphé présente un nodule central distinct (Figure 4b). La longueur du frustule peut varier de 50 à 130 µm (entre 100 µm et 120 µm pour la souche durant les expériences), pour une largeur allant de 5 à 7,5 µm (Figure 4a, b, e).

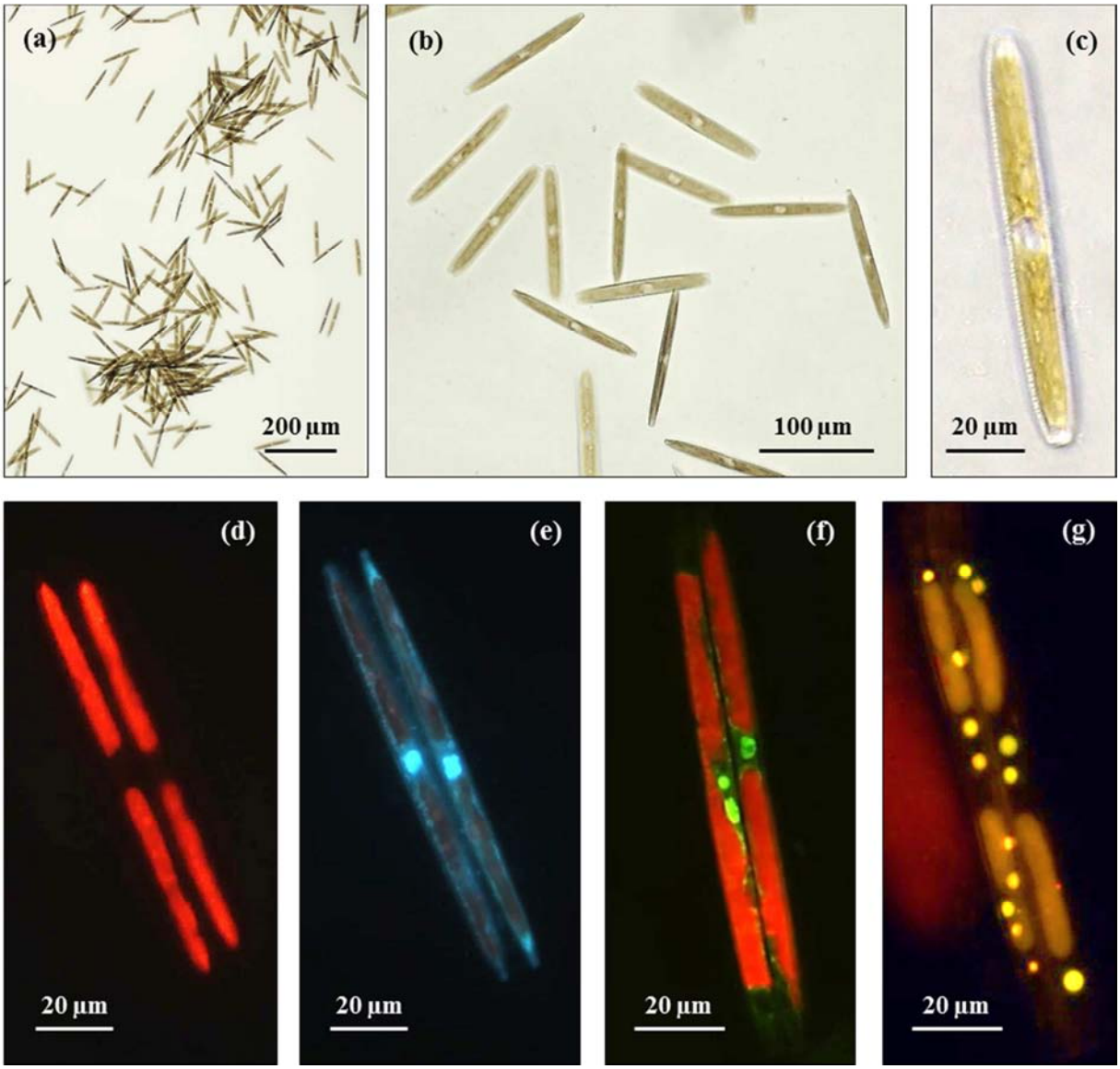


Figure 3 : (a)(b)(c) Culture de *N. linearis* observée sous microscope inversé à fond clair (CKX-41 Olympus, Center Valley, PA) et (d)(e)(f)(g) à fluorescence (microscope BX-41 Olympus). (a) Vue générale de la culture. On remarque que les cellules se regroupent pour former des amas pouvant faires plusieurs millimètres de diamètre. (b) la même culture à plus fort grossissement. On peut voir l'emplacement des noyaux (incolores) en position centrale dans les cellules. (c) vue d'une cellule en microscopie à contraste de phase. On visualise bien les deux gros chloroplastes (en brun) et l'emplacement du noyau au centre (zone incolore). (d)(e)(f)(g) Images en microscopie à fluorescence de deux cellules filles peu après une division. (d) auto-fluorescence des chloroplastes observés sans marquages (Ex : 448–550 nm, Em 590 nm, filtre dichromatique : 570 nm; U-MMSWG, Olympus). (e) après marquage au hoechst 33342. On observe à la fois l'auto-fluorescence des chloroplastes (rouge) et celle du marqueur (bleu) au niveau des noyaux. On remarque également un marquage au niveau des membranes et dans les zones apicales probablement lié à des interactions hydrophobes (lipophiles) entre le hoescht 33342 et des protéines ou lipides des membranes cellulaires et chloroplastiques (Ex : 330–385 nm, Em : 420 nm, filtre dichromatique : 400 nm U-MWU2, Olympus). (f) marquage à l'acridine orange des noyaux (vert). Les chloroplastes apparaissent en rouge. Une anomalie nucléaire (micronoyau) est visible dans la cellule de gauche et présente un ADN condensé (pycnose), signe d'un début d'apoptose ou de nécrose cellulaire. On peut également observer le nucléole (zone plus sombre) dans le noyau de la cellule de droite. (g) Marquage des lipides au rouge de Nile dans une culture après plusieurs jours en phase plateau. On remarque les nombreuses gouttelettes lipidiques (jaune) à l'intérieur des cellules. Dans le cas d'une culture en croissance, elles sont beaucoup moins abondantes, voire complètement absentes (Ex : 470 nm – 490 nm, Em : 520 nm; filtre dichromatique : 500 nm; U-MNB2, Olympus ; Photos : L. Verneuil, EcoLab)

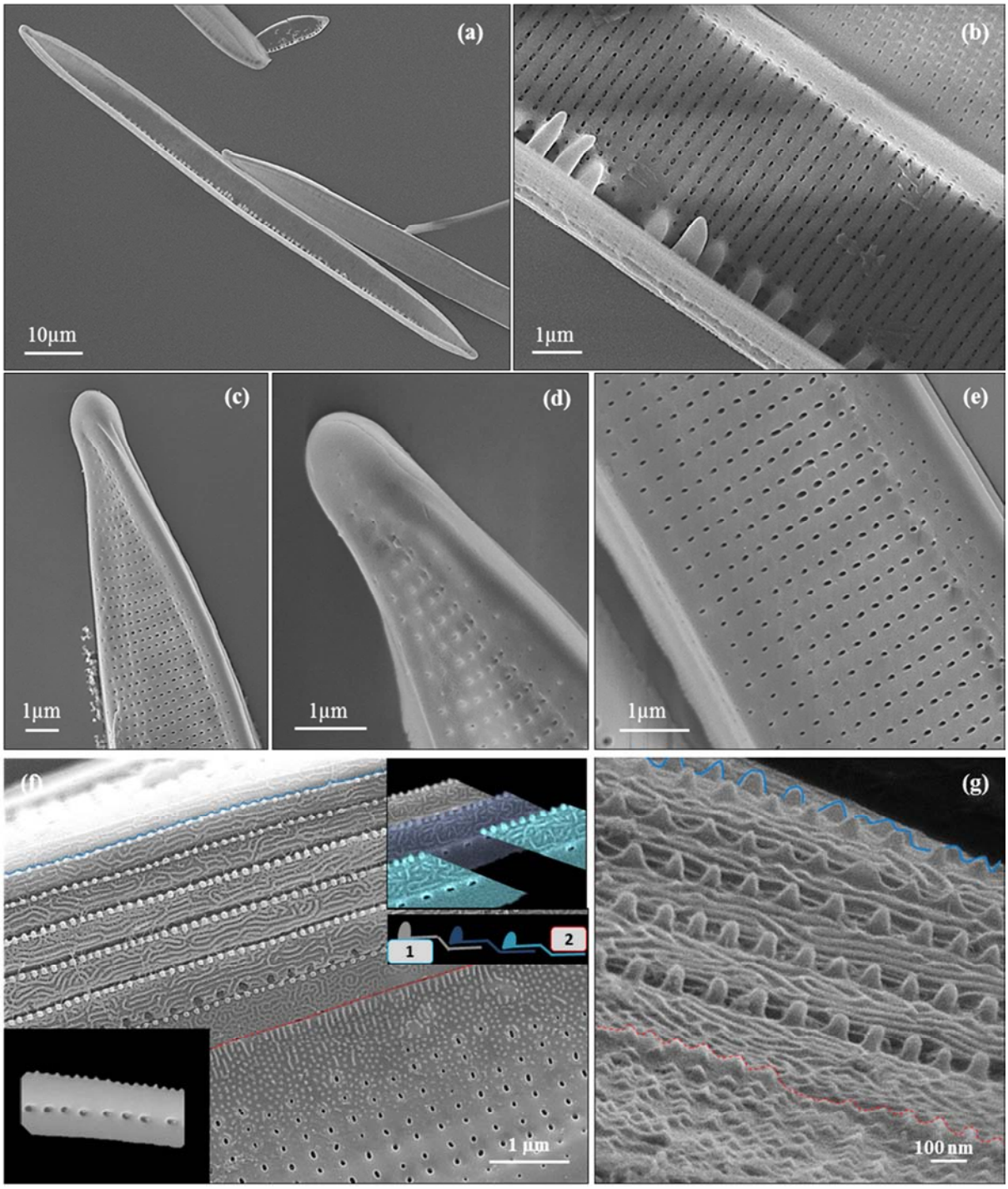


Figure 4 : Détails en microscopie électronique à balayage (MEB) du frustule de *Nitzschia linearis*. (a) vue générale du frustule montrant l'aspect interne et externe après traitement à l'H2O2 et HCl (protocole AFNOR : NF EN 13946). (b) détail de la partie centrale de la zone du raphé en vue interne. Remarquez l'espace entre les deux fibules centrales, caractéristique de l'espèce. (c-d) détail de l'apex du frustule à deux grossissements différents. (e) aspect externe des stries. (f) vue de profil du frustule. Détail des ceintures connectives (ici 6) imbriquées entre elles-mêmes (formant le cingulum) et avec les deux valves du frustule. La limite ente le cingulum est la valve supérieure (épi-valve) est matérialisée en rouge et avec la valve inferieure (hypo-valve) en bleu. Remarquez l'aspect labyrinthique de la surface des ceintures. Le schéma en haut à droite illustre le chevauchement entre les plaques et avec le frustule (1 valve inférieure ; 2 valve supérieure). L'image en bas à gauche montre l'aspect lisse de la face interne d'une ceinture connective présentant des perforations communiquant avec la face externe. (g) Cingulum à plus fort grossissement et en vue rasante mettant en avant le relief des ceintures connectives. (Photos : L. Verneuil, EcoLab)

Le nombre de fibules varie de 9 à 14 / 10 µm (Figure 4a-b), les deux du milieu sont sensiblement plus espacées entre elles que les autres. (Figure 4b), le raphé s'interrompt plus ou moins au centre de cette zone, qui est matérialisé par un nodule central en vue externe. Le nombre de stries varie de 27 à 30 / 10 µm (Figure. 4b, e). C'est une espèce facilement reconnaissable. L'espèce a une amplitude écologique assez large. Elle peut être retrouvée sur l'ensemble du lit des ruisseaux, des rivières et des lacs faiblement à modérément alcalins. Elle se développe plutôt dans les milieux oligotrophes. Tolérant une certaine eutrophie, on peut également la retrouver en milieu mésotrophe mais en faibles densités d'individus. (Hofmann *et al.*, 2013 ; Kociolek, 2011). Les ceintures connectives sont au nombre de six (hors période de division cellulaire où elles peuvent être plus ou moins nombreuse en fonction du stade de division et reformation de la valve complémentaire). Elles sont perforées en position médiane et présentent des ornementations labyrinthiques en plus d'une crénelure sur une des deux marges (Figure 4f-g). En culture mono-spécifique les cellules se regroupent pour former des amas pouvant atteindre plusieurs millimètres (mm) de diamètre, facilement visibles à l'œil nu (Figure 3a). En période de carence en nutriments, la souche présente de nombreuses inclusions lipidiques (hydrophobe) dans le cytoplasme (Figure 3g). La souche était cultivée dans du milieu SPE-1 développé durant cette thèse (Annexe 2).

2 Nanotubes de carbone

Les deux types de NTC dont les effets ont été évalués proviennent de synthèse par Dépôt chimique en phase vapeur catalysé (en anglais : Catalyst chemical vapor deposition CCVD).

Les premiers, des DWNTC, ont été produits au Centre Inter-Universitaire de Recherche et d'Ingénierie de Matériaux (Institut Carnot CIRIMAT, UMR 5085 CNRS UPS INPT) à Toulouse (31, France) dans le cadre de la thèse de Floriane Bourdiol (2013). La toxicité de ces DWNTC a d'ailleurs déjà été évaluée dans le cadre de cette thèse ainsi que celle de Périne Landois (2008) sur d'autres organismes du compartiment aquatique (amphibiens). L'étude de leurs effets sur les producteurs primaires (dans cette thèse, les diatomées) vient compléter une expertise quasi décennale concernant les effets toxiques associés à ce type de NTC. De plus, l'ensemble de ces travaux ouvre de nombreuses voies de recherche pour des approches écotoxicologiques à l'échelle de communautés.

Les seconds NTC testés sont cette fois des MWNTC industriels produits par CCVD sur lit fluidisé par la société ARKEMA France sur le site de Mont (64300 Pyrénées-atlantiques ;

capacité de production : 400 tonnes an^{-1}). Ces derniers, produits en grandes quantités, sont d'ores et déjà vendus à l'international et destinés à des applications à grande échelle.

2.1 Les nanotubes de carbone à double paroi (DWNTC)

Les nanotubes de carbone à paroi double (Figure 5, DWNTC) utilisés sont synthétisés à partir d'un catalyseur composé de magnésium et d'oxyde de cobalt ($Mg_{-x}Co_xO$) additionné d'oxyde de molybdène (Mo_yO). Les NP de cobalt (Co) servent de noyaux de condensation du carbone alors que le molybdène (Mo) sert uniquement à augmenter le rendement de la synthèse. Le précurseur carboné est ici un mélange de dihydrogène (H_2) et de méthane (CH_4). La synthèse est effectuée par augmentation de la température de 5°C min^{-1} jusqu'à 1000°C sous atmosphère d'azote (N_2) permettant la réduction et l'activation des catalyseurs métalliques. La poudre composite résultant de la synthèse est ensuite traitée avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (HCl) concentré pour extraire les NTC et dissoudre un maximum de résidus de synthèse. Les échantillons sont ensuite ramenés à la neutralité par rinçages successifs par filtration. La caractérisation physico-chimique de ces NTC a été effectuée au CIRIMAT. La composition élémentaire en carbone des NTC obtenus est de 89,7% du poids total, correspondant à 97,7% en masse molaire de carbone (déterminée par

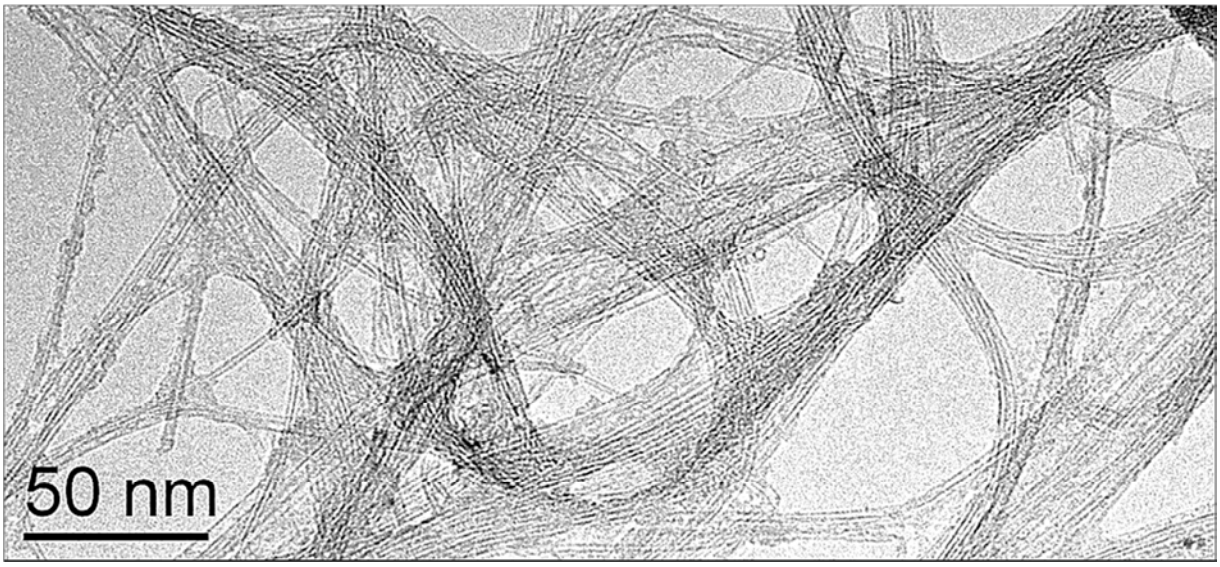


Figure 5 : Nanotubes de carbone double paroi (DWNTC) utilisées pendant cette étude (lot : CNT260310, Institut Carnot Cirimat). On peut remarquer l'enrobage de ces derniers par de la MON de la rivière Suwannee (1R101N, International Humic Substances Society, IHSS USA ; Photo : L. Verneuil, EcoLab) Pour plus de détail de l'enrobage de MON voir Chapitre 5 Figure 1.

flash combustion), la majorité du Co et du Mo étant encapsulée dans des NP graphitiques. La surface spécifique (déterminée par Brunauer-Emmett-Teller BET Specific Surface Area SSA) est de 980 m^2 g^{-1}. Le ratio entre les intensités des bandes D et G est proche de 8,9% (spectroscopie RAMAN). Le diamètre des DWNTC est compris entre 0,7 et 3 nm. Ils forment

des faisceaux allant de 10 nm à 20 nm de diamètre pour une longueur comprise entre 1µm et > 100µm arrangés majoritairement en faisceaux. Les proportions en NTC produits sont de 77% de DWNTC, 18% de SWNTC et 5% de MWNTC (Flahaut *et al.*, 2003 ; Mouchet, 2014).

2.2 Les nanotubes de carbone multi-parois (MWNTC)

Les MWNTC (Figure 6 ; commercialisés sous la référence GRAPHISTRENGTH C100, lot 09215) ont été synthétisés en utilisant l'éthylène (C_2H_4) comme source de carbone. Le catalyseur est composé principalement de fer, de molybdène ainsi que d'alumine (Al_2O_3). Malheureusement pour des raisons de confidentialité, le protocole de synthèse détaillé ne peut être présenté ici. La composition élémentaire en carbone des MWNTC est > 90% du poids total et les impuretés métalliques de 1,4% d'aluminium, 0,9% de Fer et 735 ppm de molybdène, bien que la majorité des particules métalliques soit encapsulée dans des NP graphitiques ou directement dans les MWNTC. La surface spécifique est de 270 $m^2\ g^{-1}$ pour une densité de 2,1. La taille des agglomérats initiaux (avant dispersion) varie de 200 µm à 500 µm. Le diamètre des MWNTC est compris entre quelques nm et 20 nm, leur longueur entre 0,1 µm et 10 µm. Ils sont arrangés en pelotes de tubes individualisés. Aucun SWNTC et DWNTC n'a été observé dans les échantillons testés (MET ; Bourdiol *et al.*, 2013; Mouchet, 2014).

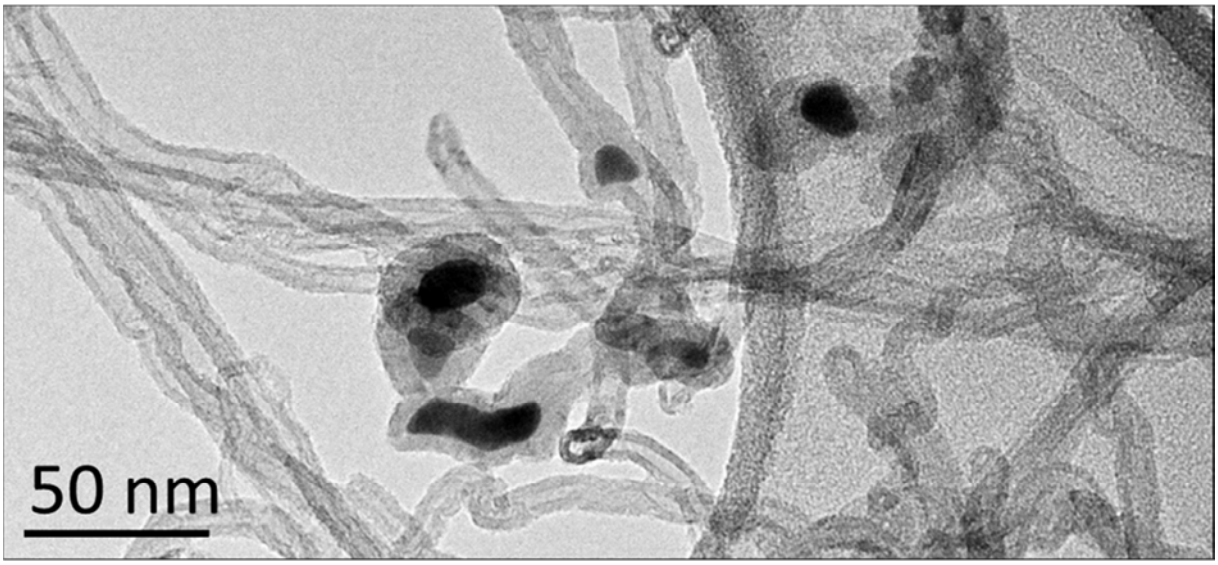


Figure 6 : Nanotubes de carbone multi-paroi (MWNTC) utilisés durant cette thèse. On peut remarquer sur la photo des nanoparticules métalliques issues de la synthèse (zones sombres) encapsulées dans des coques de carbone ou directement incluses dans les MWNTC. (Photo : L. Verneuil, EcoLab)

3 Matière Organique, un dispersant naturel pour une approche environnementale

L'état de dispersion des NTC peut fortement modifier leurs effets sur le vivant (Navarro *et al.*, 2008). Dans la littérature, différents dispersants et modes de dispersion sont utilisés (Moore *et al.*, 2003). Cependant, ils peuvent parfois présenter une toxicité propre, rendant difficile d'évaluer la part entre leurs effets et ceux des nanotubes (Gao *et al.*, 2012). Les études réalisées dans le cadre de deux thèses précédentes (Bourdiol, 2013 ; Landois, 2008) ont utilisé principalement deux dispersants : la carboxy méthyle celullose (CMC) et la gomme arabique (GA), ne présentant pas de toxicité pour l'organisme modèle utilisé (l'amphibien *Xenopus laevis*). Malheureusement, ces produits ne sont pas présents dans l'environnement aquatique en concentration suffisante pour avoir un effet sur la dispersion des NTC. Ainsi, bien que permettant une évaluation des effets de NTC dispersés, la pertinence de leur usage pour des tests de toxicité environnementale et écotoxicité restent discutables. Ces dernières années, plusieurs études ont montré que la Matière Organique Naturelle (MON, en anglais Natural Organic Matter, NOM), composée entre autres d'acides humiques et fulviques, pouvaient également permettre de disperser efficacement et durablement des NTC (Hyung *et al.*, 2007 ; Figure 7, 8). La NOM est naturellement présente dans les milieux aquatiques, souvent en concentration suffisante pour disperser une grande quantité de NTC. Par exemple, 10 mg L^{-1} de NOM (une concentration environnementale classique ; Oeurng *et al.*, 2011) peut disperser au moins 1 mg L^{-1} des DWNTC utilisés ici et 10mg L^{-1} de MWNTC (Chapitre 4). Ainsi, sa présence et sa concentration dans les environnements aquatiques posent la question du rôle qu'elle va jouer dans la dispersion des NTC présents, ainsi que sur leurs effets sur les différents organismes peuplant les écosystèmes aquatiques. Dans une optique écotoxicologique, la NOM se présente comme un candidat idéal pour disperser les NTC.

La matière organique utilisée pour disperser les NTC dans le cadre des essais algues est la Suwannee River NOM (1R101N, International Humic Substances Society, IHSS). Il s'agit d'un mélange naturel de substances humiques caractérisé par une teneur en sels faible et une teneur en matière organique élevée. Elle a une masse moléculaire comprise entre 2600 g mol^{-1} et 3100 g mol^{-1}. Son acidité carboxylique est comprise entre 9,5 et 11,5 meq g^{-1} de carbone, elle est fournie au départ avec une humidité de 8,5 % (w/w). Les cendres représentent 7 % (w/w) des résidus organiques d'un échantillon sec. Cette NOM est

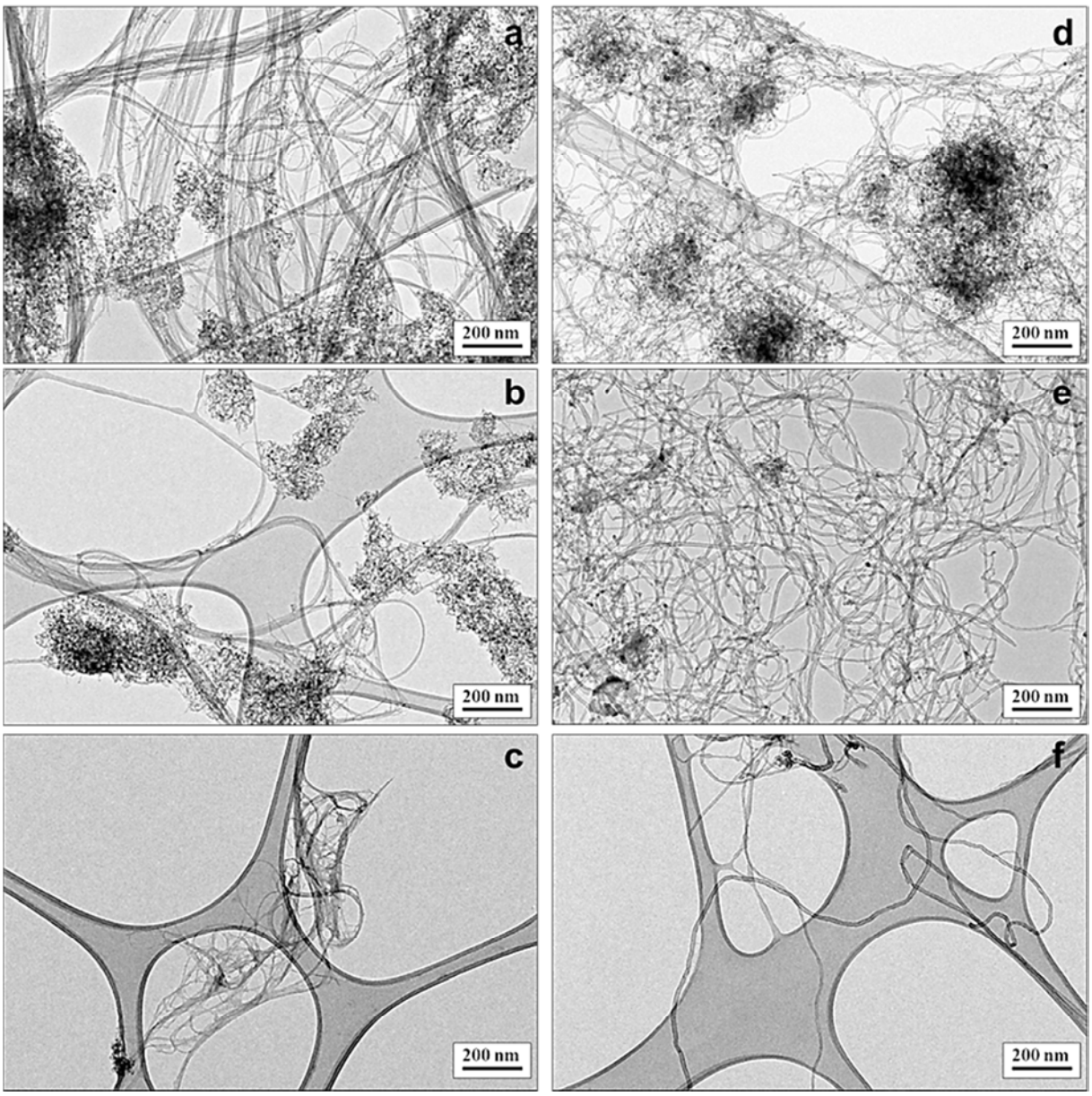


Figure 7 : Vue en microscopie électronique à transmission (MET) de nanotubes de carbone (NTC) à paroi double (DWNTC, à gauche) et multi-parois (MWNTC, à droite) utilisés pendant la thèse, après dispersion aux ultrasons pendant 20 min dans du milieu de culture CHU-10, éventuellement ajout de NOM et ultrasons à nouveau pendant 20 min (sonotrode) et repos une heure avant préparation des grilles de MET. (a) (c) : sans ajout de MON, (b) (d) : avec ajout de 10 mg L^{-1} de MON pour 50 mg L^{-1} de NTC (ratio 5:1). Et enfin (c) (e) avec ajout de 10 mg L^{-1} de MON pour 10 mg L^{-1} (ratio 1:1 ; TEM, JEOL JEM-1400, 120kV, JEOL, Tokyo, Japon ; Photos : L. Verneuil, EcoLab)

composée à 52,47 % de carbone, à 42,69 % d'oxygène, à 4,19 % d'hydrogène, 1,1 % d'azote, 0,65 % de soufre et 0,02% de phosphore (w/w). La distribution du ^{13}C (Résonance Magnétique Nucléaire, RMN) est de 8%, de groupements carbonyles (220-190 ppm), 20% de carboxyles (190-165 ppm), de 23% d'aromatiques (165-110 ppm), de 7% d'acétals (110-90 ppm), de 15% d'hétéro-aliphatiques (90-60 ppm) et de 27 % d'aliphatiques. Analyse élémentaire fournie par l'IHSS (international humic substances society. Réalisée par les laboratoires Huffman, Wheat Ridge, CO, USA). Des informations complémentaires sur la

composition de la MON (spectre RMN, composition en acides aminés…), et plus particulièrement celle des acides humiques et acides fulviques la composant sont disponibles sur le site internet de l'IHSS (http://www.humicsubstances.org/).



Figure 8 : nanotubes de carbone multi-paroi (MWNTC) observés en microscopie électronique à transmission (MET ; JEOL JEM-1400, 120kV, JEOL, Tokyo, Japon) après 20 mn de dispersion par ultrasons en présence de matière organique naturelle (MON ; ratio 10 mg L^{-1} de MWNTC pour 10 mg L^{-1} de MON) on peut remarquer les MWNTC entièrement recouverts par la MON contrairement à la Figure 6. (Photo : L. Verneuil EcoLab).

References bibliographiques

Bourdiol, F., 2013. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. Paul-Sabatier, Toulouse III, Toulouse, France.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. Carbon 54, 175–191. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024

Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. Chem. Commun. 1442. doi:10.1039/b301514a

Gao, J., Llaneza, V., Youn, S., Silvera-Batista, C.A., Ziegler, K.J., Bonzongo, J.-C.J., 2012. Aqueous suspension methods of carbon-based nanomaterials and biological effects on model aquatic organisms. Environ. Toxicol. Chem. 31, 210–214. doi:10.1002/etc.704

Hofmann, G., Werum, M., Lange-Bertalot, H., 2013. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Koeltz Scientific Books, Königstein.

Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.-H., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. Environ. Sci. Technol. 41, 179–184. doi:10.1021/es061817g

Kociolek, P., 2011. Nitzschia linearis. In Diatoms of the United States. http://westerndiatoms.colorado.edu/taxa/species/nitzschia_linearis. Consulté en ligne le 05-08-14

Landois, P., 2008. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. (PhD Thesis). Centre Interuniversitaire de la Recherche et d'Ingénieurie des Materiaux (CIRIMAT), UMR 5085; Laboratoire D'Ecologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), UMR 5245, Toulouse.

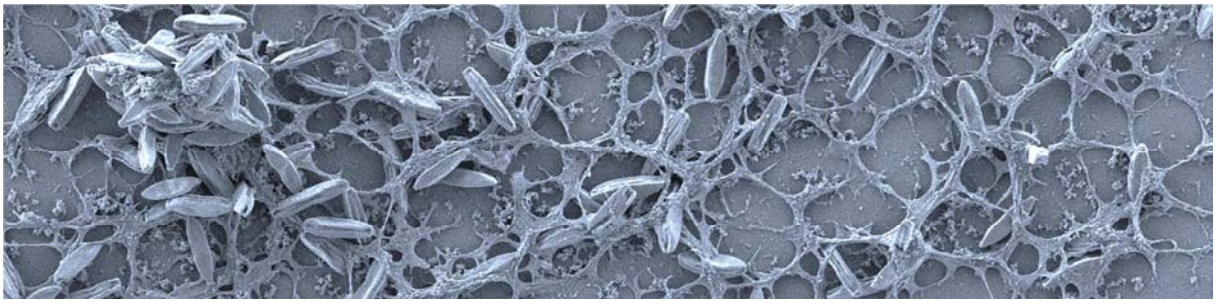
Moore, V.C., Strano, M.S., Haroz, E.H., Hauge, R.H., Smalley, R.E., Schmidt, J., Talmon, Y., 2003. Individually Suspended Single-Walled Carbon Nanotubes in Various Surfactants. Nano Lett. 3, 1379–1382. doi:10.1021/nl034524j

Mouchet, F., 2014. Rapport Final Ecotoxicité des nanotubes de carbone : bilan des travaux du laboratoire Nautile sur la période (2008 – 2013). Laboratoire Commun NAUTILLE : NanotUbes et écoToxIcoLogiE.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Oeurng, C., Sauvage, S., Coynel, A., Maneux, E., Etcheber, H., Sánchez-Pérez, J.-M., 2011. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. Hydrol. Process. 25, 2365–2378. doi:10.1002/hyp.7999

Spaulding, S., Edlund, M., 2008. Nitzschia. In Diatoms of the United States. http://westerndiatoms.colorado.edu/taxa/genus/Nitzschia. Consulté en ligne le 05-08-2014



CHAPITRE 3

EFFETS DE NANOTUBES DE CARBONE MULTI-PAROIS CHEZ LA DIATOMEE BENTHIQUE *NITZSCHIA PALEA* : ROLE DU FRUSTULE ET DES SUBSTANCES EXTRACELLULAIRES POLYMERIQUES

Contexte

La fin du vingtième siècle a vu émerger la production contrôlée de nombreuses nanoparticules, parmi elles les nanotubes de carbone (NTC). Aujourd'hui, il est possible de trouver des NTC dans de nombreux produits du quotidien tel que divers plastiques, batteries et équipements sportifs. Depuis plusieurs années maintenant, cette production et utilisation croissante de NTC pose la question de leurs effets environnementaux, particulièrement dans le cas des écosystèmes aquatiques, qui sont le réceptacle de nombreux contaminants. Ainsi, les organismes habitant ces écosystèmes pourraient être particulièrement exposés aux NTC.

Dans cette étude, les effets de NTC multi-parois industriels (MWNTC) ont été évalués sur la diatomée benthique d'eau douce *Nitzschia palea* (*N. palea*). Cette étude s'est en particulier focalisée sur le rôle de la dispersion des MWNTC par de la matière organique naturelle, sur différents marqueurs de toxicité (croissance, intégrité cellulaire, rendement quantique du photosystème II). Le rôle de l'ombrage causé par les MWNTC a également été évalué à l'aide d'un dispositif expérimental original, inspiré par de précédentes études et, suivant les recommandations de l'OCDE, a été optimisé afin de prendre en compte les caractéristiques du modèle, tout en permettant la réalisation de nombreux tests, une observation *in situ* des biofilms formés par les algues, ainsi que la réalisation d'observations des mêmes biofilms sous microscope électronique à balayage. Ce dispositif miniaturisé a également permis de limiter fortement les quantités de MWNTC nécessaires. Une attention particulière a été portée sur l'interaction entre le biofilm et plus particulièrement les substances polymériques extracellulaires (SPE) produites par *N. palea* et les MWNTC, via différentes approches de microscopie (marquages, microscopie inversée et Microscopie Electronique à Balayage : MEB).

Résultats marquants et conclusions

Cette étude a mis en avant le rôle prépondérant de la dispersion des MWNTC par la MON sur l'inhibition de croissance de *N. palea* en comparaison avec une exposition à des MWNTC seuls, particulièrement aux faibles temps d'exposition (48h). Un fort effet d'ombrage a été observé à partir de 10 mg L^{-1} de MWNTC, alors qu'il n'était pas quantifiable dans le cas de MWNTC non dispersé. En cas d'exposition directe, un effet accru des MWNTC sur l'inhibition de croissance a également été mis en avant avec une inhibition significative de croissance dès 0.1 mg L^{-1} de MWNTC. En revanche, les autres paramètres de toxicité (intégrité cellulaire et photosystème II) n'ont jamais été impactés, ceci quel que soit l'état de dispersion des MWNTC. Il a été constaté un rattrapage quasi intégral de la croissance après 144h d'exposition.

Une forte affinité des MWNTC pour le biofilm a été observée. Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, les MWNTC n'interagissaient pas directement avec la paroi cellulaire (le frustule). De plus, un réseau nanométrique à l'intérieur des pores du frustule a pu être observé et constituait une protection efficace contre la pénétration des MWCNTs dans les cellules. En revanche, une forte interaction entre les MWNTC et les SPE produites par les diatomées a été observée. D'une part, cette interaction pourrait avoir augmenté l'effet d'ombrage en cas de contact direct (enrobage des cellules par les MWNTC) avec les MWNTC, et d' autre part, elle semble avoir été à l'origine de la diminution de l'inhibition de croissance observée au cours du temps, en favorisant l'agglomération de MWNTC entre eux

et au support des boîtes de culture, menant à une réduction de leur surface de contact avec les diatomées. De plus, les SPE ont probablement constitué une barrière physico-chimique entre les MWNTC et les diatomées. Enfin, les observations microscopiques laissaient penser à une surproduction d'EPS en présence de MWNTC. Le coût énergétique de cette dernière pourrait avoir été à l'origine d'une partie de l'inhibition de croissance observée.

Ces travaux, présentant les premiers résultats de cette thèse, ont fait l'objet d'une publication dans la revue Nanotoxicology, intitulée :

Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: ''A sticky story''

Laurent Verneuil, Jérôme Silvestre, Florence Mouchet, Emmanuel Flahaut, Jean-Charles Boutonnet, Floriane Bourdiol, Tifania Bortolamiol, David Baqué, Laury Gauthier & Eric Pinelli

DOI : 10.3109/17435390.2014.918202

http://informahealthcare.com/nan
ISSN: 1743-5390 (print), 1743-5404 (electronic)

Nanotoxicology

Nanotoxicology, Early Online: 1–11
© 2014 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: ''A sticky story''

Laurent Verneuil[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Florence Mouchet[1,2,3], Emmanuel Flahaut[4,5], Jean-Charles Boutonnet[3,6], Floriane Bourdiol[3,4,5], Tifania Bortolamiol[4,5], David Baqué[1,2], Laury Gauthier[1,2,3], and Eric Pinelli[1,2,3]

[1]EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France, [2]CNRS; EcoLab; Castanet Tolosan, France, [3]Laboratoire Commun NAUTILE (CNRS, UPS, INPT, ARKEMA), Laboratoires EcoLab, CIRIMAT, GRL, France, [4]Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France, [5]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France, and [6]Toxicology & Environment Department Manager, ARKEMA, Colombes, France

Abstract

Different effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on the freshwater diatom *Nitzschia palea* were examined. MWCNTs used in this study (MWCNT) were dispersed either by sonication without ($MWCNT_{sonicated}$) or with a realistic concentration (10 mg L^{-1}) of Natural Organic Matter ($MWCNT_{+NOM}$). A pocket-size device was designed to distinguish shading effect (using MWCNT suspensions as external filters) from total exposure effect of $MWCNT_{sonicated}$ and $MWCNT_{+NOM}$ on benthic algae. This study demonstrates that cell division was strongly inhibited after a 48 h exposure to $MWCNT_{+NOM}$ compared to $MWCNT_{sonicated}$. This device did not yield a quantifiable contribution of shading to growth inhibition of $MWCNT_{sonicated}$ and below 10 mg L^{-1} of $MWCNT_{+NOM}$. In all cases, neither lethal effects nor drops in photosynthetic quantum yield were observed. After a 6-d exposure, a complete growth recovery was observed for all conditions except at the highest concentration of $MWCNT_{+NOM}$. Different microscopic approaches using carbohydrates markers revealed the strong affinity between MWCNT and extracellular polymeric substances (EPS) produced by *N. palea*. These seem to constitute a defensive mechanism against MWCNT.

Keywords

Algae, extracellular polymeric substances, nano-ecotoxicology, nanoparticles, toxicity

History

Received 24 October 2013
Revised 11 April 2014
Accepted 17 April 2014
Published online 22 May 2014

Introduction

Although observed for the first time in 1952, it was only during the 1990s, with the first controlled synthesis of carbon nanotubes (CNTs) that their widespread use became possible (Monthioux & Kuznetsov, 2006). Owing to their nanoscale and their physico-chemical properties (mechanical, electrical, thermal, and optical), they are used increasingly in many fields (Ajayan & Zhou, 2001). Currently most CNTs produced are multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Annual production is more than 3 Kt/year (Keller et al., 2013). Currently, it is already possible to find MWCNTs in a variety of everyday products such as plastic additives, batteries, or some sporting goods (Endo et al., 2008).

For several years now, increased production and use of MWCNTs, as well as wastes that will result have been raising the question of their potential environmental impact, especially on aquatic ecosystems. Indeed, their location downstream of terrestrial ecosystems favors the concentration of all kinds of pollution, especially in the case of non-biodegradable compounds such as CNTs (Kümmerer et al., 2011). Thus, organisms inhabiting aquatic ecosystems might be particularly exposed to MWCNTs.

Correspondance: Eric Pinelli, Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), Université de Toulouse; INP-ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, France. Tel: +33 5 62 19 39 45. Fax: +33 5 62 19 39 01. E-mail: pinelli@ensat.fr

Several studies have investigated the toxicity of MWCNTs on various aquatic organisms. These have provided conflicting results while emphasizing both toxic and non-toxic effects. Acute toxicity, chronic toxicity, cytotoxicity, or genotoxicity of MWCNTs are usually explained by cell membrane disruption or breakage and oxidative stress (Gusev et al., 2012; Hsieh et al., 2013; Kang et al., 2008; Kwok et al., 2010; Mouchet et al., 2007, 2010; Nel, 2006; Singh et al., 2009; Wei et al., 2010; Von Moos & Slaveykova, 2013). Other studies have also demonstrated that in the case of non-purified CNTs, metal catalyst residues could significantly influence the observed toxicity (Ge et al., 2012; Matorin et al., 2010; Mwangi et al., 2012; Shvedova et al., 2012). However, other papers have reported inhibiting effects of MWCNTs on green algae growth and clearly demonstrated the negligible influence of catalyst residue (Long et al., 2012; Schwab et al., 2011). Long et al. (2012) have also observed the presence of MWCNTs in the cytoplasm of *Chlorella* sp. Finally, decreases in photosynthetic yield and inhibition or delay of cell growth were reported to be a combinatory effect of MWCNTs on oxidative stress, agglomeration, physical interactions, and shading (Long et al., 2012; Matorin et al., 2010; Schwab et al., 2011; Wei et al., 2010). Many authors have also investigated the effect on biota of dispersed-CNTs by non-covalent functionalization using synthetic organic compounds such as carboxymethyl cellulose, sodium dodecyl sulfate, sodium dodecylbenzene sulfonate, sodium cholate, Triton X-15, Triton X-100, polyvinylpirrolidone, and tetrahydro-furan

(Gao et al., 2012; Vaisman et al., 2006; Petersen et al., 2011). Unfortunately, due to the inherent toxicity of some of these products, it is difficult to clearly separate their effect from those of CNTs (Dong et al., 2008). Although widely used by industry to provide well-dispersed CNTs, none of these above compounds are encountered in aquatic environments at sufficient concentrations to play a role in CNT dispersion. Assessment of CNT toxicity in the presence of non-toxic natural organic compounds such as gum Arabic (Bourdiol et al., 2013; Mouchet et al., 2011; Youn et al., 2012) or natural organic matter (NOM) (Schwab et al., 2011) demonstrated that these compounds could interfere with the toxicity of CNTs. NOM, being widely present in aquatic media, is probably the best choice to investigate the influence of the dispersion on CNTs toxicity in natural environment.

To date, few studies have focused on the effects of nanoparticles on algae (Von Moos & Slaveykova, 2013). Nevertheless, their abundance in the environment, their primordial place in the carbon cycle as well as their intrinsic properties such as photosynthesis and the presence of cell walls, make them of particular interest for the assessment of contaminant effects (Debenest et al., 2010). Among algae, diatoms are responsible for more than 25% of the global primary productivity (Scala & Bowler, 2001). Diatoms can be planktonic or benthic. They represent the main component of many freshwater photoautotrophic biofilms during autumn and spring. In addition, they produce a cell wall composed of amorphous silica, similar to glass, called frustule. The frustule is known to provide great protection against environmental physical stresses (Hamm et al., 2003). Another feature of benthic diatoms is the production of extracellular polymeric substances (EPS) mainly composed of polysaccharides and proteins. These allowing them to adhere, move, and stabilize supports they colonize (Stal, 2003). EPS production also confers strong resistance to many organisms against biocides (Flemming & Wingender, 2001) and metallic ions released by nanoparticles (Miao et al., 2009).

Currently, studies using NOM as dispersant focus on an optimal dispersion of CNTs. However, none has addressed the effect of MWCNTs in the presence of a realistic concentration of NOM in order to simulate the behavior and effects of CNTs in natural conditions. The effect of CNTs on benthic freshwater diatoms has also never been investigated despite their key role at the base of many aquatic food chains.

In this study, a common freshwater diatom, *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (*N. palea*) was chosen to assess the effects of MWCNTs in the presence of NOM. The first part of this work focuses on quantitative effects (growth inhibition, photosynthetic yield decrease, and viability) using a device inspired by previous studies (Aruoja et al., 2009; Hund-Rinke & Simon, 2006). It was designed to separate shading (using external light filters) and total exposure effects of nanoparticles on benthic photosynthetic organisms. In the second part, the affinity and the potential input of MWCNTs into the cells were investigated and characterized using various microscopic approaches while taking into account two major characteristics of diatoms known to protect them from environmental stress: EPS and the silica frustule.

Methods

Carbon nanotubes and natural organic matter

MWCNTs were provided by the ARKEMA Company under the reference Graphistength® C100 (MWCNT; note that in this paper, MWCNTs is the general term for MWCNTs and MWCNT refers to those used in this study).

They were synthesized by CCVD using a fluidized bed process. According to the supplier and Bourdiol et al. (2013), MWCNT have 5–15 walls with an outer diameter ranging from a few nanometers to 20 nm and a specific surface area of $270\,m^2\,g^{-1}$. Their length ranges from 0.1 to 10 µm. Their initial mean agglomerate size ranges between 200 and 500 µm in deionized water. The carbon content of dried MWCNT is ca. 95 wt%. MWCNT were provided suspended in deionized water (100 mg in 20 mL). Suwannee river Natural Organic Matter (NOM; Cat no. 1R101N) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS, St. Paul, MN). Characterization of MWCNT suspensions will be described in a later section.

Diatom strain and cultures

The axenic strain of *N. palea* (Ref. CPCC-160) purchased from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC) was grown in a CHU no. 10 basic medium (CHU10; $6.4 < pH < 6.6$) modified by J. Acreman using ethylenediamine tetraacetic acid ferric sodium salt (EDTA–Na–Fe) as an iron source (for more detail see: http://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/chu-10). All bioassays were performed in a growth room at $20 \pm 1\,^{\circ}C$ on a rotary shaker at 90 rpm during a light/dark period of 16 h/8 h provided by high pressure sodium lamps (VIALOX® NAV® (SON) SUPER 4Y®, 600W, OSRAM GmbH) with an illumination of 5500 lux. CHU10 was always replaced by fresh medium 72 h before the experiments and prior to preparing inoculum. All manipulations during the experiments were carried out under a class II laminar flow hood to avoid biotic contamination.

MWCNT suspensions

Deionized water was removed (95%) by pipetting from provided suspensions before re-suspending MWCNT in CHU10 thus obtaining MWCNT stock suspension of $100\,mg\,L^{-1}$. Stock suspension was homogenized by ultrasonication for 1 h using a BRANSON digital sonifier S-250D with a 1/8 in Tapered Microtip (200 W; amplitude: 35% 5 s/2 s). Then, four dilutions were carried out ($0.167\,mg\,L^{-1}$, $1.67\,mg\,L^{-1}$, $16.7\,mg\,L^{-1}$, and $83.5\,mg\,L^{-1}$) for the algal tests, and four ($0.1\,mg\,L^{-1}$, $1\,mg\,L^{-1}$, $10\,mg\,L^{-1}$, and $50\,mg\,L^{-1}$) for analyses (metal dosages in solution, optical densities, and microscopic observations). MWCNT suspensions were homogenized again as described above, but only for 20 min after autoclaving (20 min, 121 °C, 1 bar) prior to the beginning of the experiments. Prior to the second homogenization, MWCNT suspensions dispersed with NOM were carried out in the same way, adding $16.7\,mg\,L^{-1}$ of NOM for algal tests and $10\,mg\,L^{-1}$ for the other tests. This concentration was not chosen to allow optimal dispersion of MWCNT but to be representative of the average NOM abundance in the river Save near Toulouse, France (Oeurng et al., 2011). Two kinds of MWCNT suspensions were obtained after sonication: (i) without NOM ($MWCNT_{sonicated}$) and (ii) with NOM ($MWCNT_{+NOM}$) for all concentrations (e.g. $MWCNT_{50mg-sonicated}$ and $MWCNT_{50mg+NOM}$ are suspensions of MWCNT at concentration of $50\,mg\,L^{-1}$ without or with $10\,mg\,L^{-1}$ of NOM, respectively).

Characterization of MWCNT suspensions

$MWCNT_{sonicated}$ and $MWCNT_{+NOM}$ were characterized by transmission electron microscopy (TEM, JEOL JEM-1400, 120 kV, JEOL, Tokyo, Japan) and by field effect gun scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-6700F, 5 kV, JEOL, Tokyo, Japan). Samples of each $10\,mg\,L^{-1}$ suspension were first sonicated for 5 min. A droplet was dried over a perforated carbon copper grid before TEM observation and on aluminum holders before SEM observation.

DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

The stability of $MWCNT_{sonicated}$ and $MWCNT_{+NOM}$ was assessed by optical density at the chosen wavelength of $\lambda = 439$ nm corresponding to the maximum absorbance of *N. palea* photosynthetic pigments. For that purpose, 90 mL of each suspension was divided into three test tubes. About 1 mL at half height of the water column was sampled and analyzed at regular intervals (1, 24, 48, and 72 h).

Effect of MWCNT on the CHU10 composition

Investigation of MWCNT effects on CHU10 was done by analyzing the elemental composition of triplicated $MWCNT_{50mg-sonicated}$ and $MWCNT_{50mg+NOM}$. Each suspension was incubated 48 h in identical conditions to the algal tests (see above). Samples were then centrifuged 30 min at 20 675*g* (Sigma Laborzentrifugen 3-18, Osterode, Germany). Supernatants were filtered on a Minisart high flow polyethersulfone membrane (0.1 µm; SARTORIUS-STEDIM Biotech). Major and trace elements were measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS, Agilent-7500ce, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). pH was controlled at the beginning of the tests in each MWCNT suspension and directly in wells at the end of the experiment.

Investigation of MWCNT toxicity and shading effect on *N. palea*

The experimental device used for algal growth tests was designed to assess total exposure effect and shading effect of $MWCNT_{sonicated}$ and $MWCNT_{+NOM}$ on benthic algae. Moreover, it also allows *in situ* observations of MWCNT behavior on a photosynthetic biofilm.

Each device consists of two stacked 12 well plates (COSTAR®-3513, Corning Incorporated, Corning, NY) with a black opaque film stuck on covers around the wells. The stack of two plates, after being surrounded by Parafilm® to avoid evaporation, was placed in an open-topped opaque box to allow light to enter by the wells only (Figure 1). One device was used per condition.

Before the beginning of the exposures, lower plates of each device were inoculated with 1 mL of algal inoculums (2.5×10^5 cells mL^{-1}) and the uppers ones with 1 mL of CHU10. The devices were then placed, without shaking, in a growth room for 24 h to allow a homogenous sedimentation and adhesion of algae. Then, 1.5 mL of MWCNT suspensions (see above) were added to each well of the lower plates, to obtain a final volume of 2.5 mL per well and MWCNT concentrations of 0.1, 1, 10, and 50 mg L^{-1} per plate. Shading effect tests were performed by adding 1.5 mL of $MWCNT_{sonicated}$ or $MWCNT_{+NOM}$, but only to the upper plates. All remaining wells were filled with 1.5 mL of CHU10 to obtain a final volume of 2.5 mL per well. The same procedure was followed for $MWCNT_{+NOM}$ tests except NOM was added to CHU10. Control devices were prepared with only CHU10 or CHU10 complemented with NOM (CHU10+NOM). The duration of incubation was 24, 48, 72, and 144 h.

Each time, the content of three wells per plate were scraped, homogenized, and fixed with 3.6% of formaldehyde. Algal concentrations were determined using a Malassez cell counter to perform two counts per well. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD tests were implemented using the statistical open source software ''R'' (SSR; R Development Core Team 2012, Bio-RAD, Charlottesville, VA) to determine significant differences between conditions of the growth test. Effect concentrations of 50% (EC_{50}) values were estimated with the Excel® Macro: REGTOX 7.0.3 (Copyright© 2001, Eric Vindimian, Boston, MA) using the Hill model. The 95% confidence intervals for the EC_{50} values were calculated by

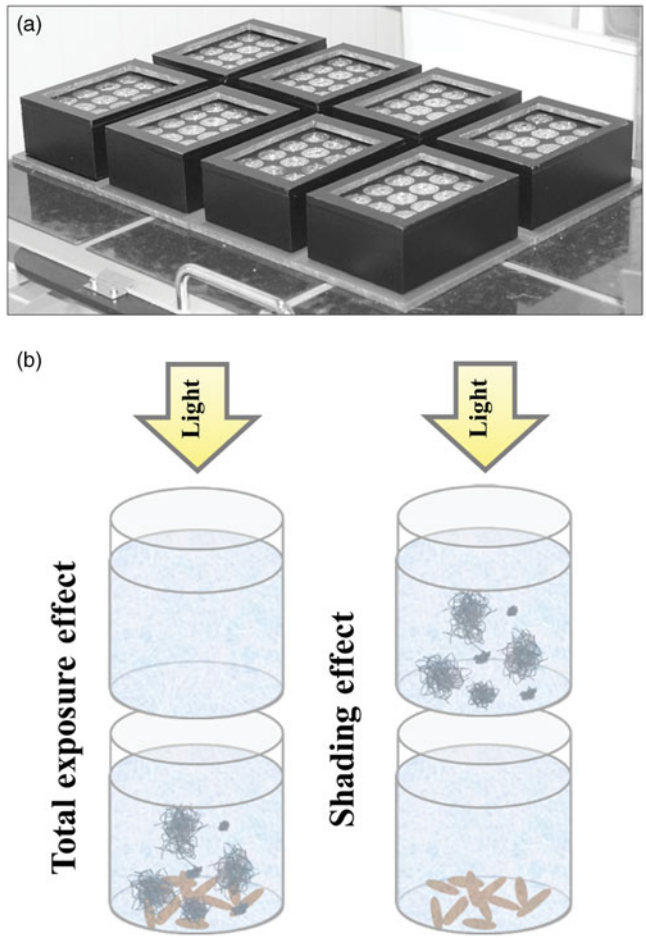


Figure 1. Experimental devices composed of open-top opaque boxes covering two stacked 12 wells plates with opacified inter-wells (a). Schematic representation of the device used for toxicity test (b). Bottom wells contain benthic diatoms exposed to (left) or shaded by (right) multi-walled carbon nanotube suspensions without ($MWCNT_{sonicated}$) or with the presence of natural organic matter ($MWCNT_{+NOM}$). Top boxes contain only culture medium (CHU10) in the case of exposure tests and $MWCNT_{sonicated}$ or $MWCNT_{+NOM}$ in the case of shading tests.

bootstrap simulations ($n = 500$). Growth rates (r) were calculated from the following equation ($n_0 = 1.22 \times 10^5$ cell mL^{-1} = number of cells mL^{-1} at the beginning of exposures and n_x = number of cells mL^{-1} after x hours of exposure to MWCNT ($x = 48$ or 144 h)

$$r = \frac{n_x - n_0}{n_0}$$

Algal mortality was controlled after 48 h of exposure to MWCNT suspensions using Sytox green® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Living samples were incubated 10 min in Sytox green® (100 nM) and then observed using a fluorescence microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA) equipped with an HG lamp (U-LH100HG, Olympus, Center Valley, PA) using a 470–490 nm/520 nm excitation/emission filter and a 500-nm dichromatic filter (U-MNB2, Olympus, Center Valley, PA). The nucleus of dead (or injured) cells fluoresces in green while the nucleus of intact cells is not stained. Photosynthetic active radiations (PAR) received by *N. palea* were measured after 48 h of exposure, with the sensor placed between the two plates, using a light-meter (Li-250A light meter equipped with Li-COR Quantum sensor; Li-COR Biosciences, San Diego, CA). Interference between Sytox green® and MWCNT was assessed following the works of Horst et al. (2013). It consisted to labeling diatom just before or right after the addition of MWCNT. No significant

interference was revealed at chosen concentration (data not shown).

Influence of MWCNT and NOM on photosynthetic activity and chloroplasts

The effect of MWCNT on photosynthetic activity was investigated by pulse amplitude modulated fluorometry (PAM) using a Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The photosystem II quantum yield (PSII) was investigated to establish the ratio of emitted photons to photons absorbed by chlorophyll after an illumination pulse. In the case of total inhibition, quantum yield is close to 0 and rises with increased photosystem II activity (Phyto-PAM user guide). Measurements were done 48 h after the beginning of the exposure for each MWCNT suspension and concentration and after removing background signals from the corresponding test conditions. Any interference of NOM was revealed after illumination pulse. Each condition was triplicated. The Kruskal–Wallis analysis of variance (non-parametric data) was implemented using SSR to determine significant differences between conditions. Kendall tests were subsequently implemented to determine correlations between MWCNT concentration and the presence of NOM on PSII of *N. palea*.

Integrity of chloroplasts was also qualitatively controlled with a fluorescence microscope using a 330–385 nm/420 nm excitation/emission filter and a 400-nm dichromatic filter (U-MWU2, Olympus, Center Valley, PA) thus allowing auto-fluorescence observation of chloroplasts.

Nature of MWCNT affinity for a biofilm of *N. palea*

Investigation of the interaction between MWCNT and *N. palea* at the cellular level was provided by both light microscopy and SEM. For this purpose, diatoms were grown on coverslips in devices used for growth tests and exposed 48 h to $MWCNT_{10mg-sonicated}$ or $MWCNT_{10mg+NOM}$. Samples were then fixed and stained with Alcian blue (Sigma-Aldrich, Paris, France) directly in the wells, following Erlandsen's (2004) protocol with some modifications. Fixation consisted in a first 24 h-incubation in a solution of 0.1% Alcian blue in acetic acid (0.5 M), paraformaldehyde (2%), and glutaraldehyde (2%) and buffered using sodium cacodylate (0.15 M). Samples were then gently rinsed in cacodylate buffer (0.15 M) and then observed *in situ* at a maximum well depth using an inverted microscope (IX51, Olympus, Center Valley, PA, × 400). Samples exposed to $MWCNT_{10mg+NOM}$ were subsequently 2 h-post fixed in a solution of cacodylate buffer containing potassium ferro-cyanide (1.5%) and OsO_4 (1%). They were rinsed again and dehydrated in an ascending ethanol gradient [50, 70, 80, and 95%] each for 10 min and twice for 15 min in [100%] before critical point drying with N_2. Coverslips were then placed on SEM mounts and platinum coated before observation (JEOL JSM-6700F, 3 kV, detection mode: Secondary Electron Imaging).

SEM observations of frustules were performed after a chemical treatment following the normalized AFNOR protocol (NF EN 13946) digested cellular content and EPS. This was achieved by boiling hydrogen peroxide (H_2O_2, Sigma-Aldrich® 30%) for 10 min and boiling hydrochloric acid (HCl, 35%) for 5 min. Samples were then rinsed, dried on SEM mount and platinum coated before being observed as stated above with voltage switched to 5 kV.

Results

Characterization of MWCNT suspensions

Absorbance spectrometry showed that after 24 h, the measured water column absorbance of all $MWCNT_{sonicated}$ was close to zero which corresponds to complete settling of the MWCNT out of suspension. However, $MWCNT_{+NOM}$ exhibited stable absorbance, up to 10 mg L^{-1} of MWCNT and similar to those of the beginning of the test (data not shown). Figure 2 shows examples of collected TEM images of MWCNT in three different dispersion states depending on the MWCNT/NOM ratio (*w*/*w*). Without NOM, MWCNT were grouped into pellets ranging from 0.1 to 1 µm in diameter which were almost interconnected by individualized nanotubes forming clusters of several tens of micrometers (Figure 2a). In the presence of five times more MWCNT than NOM (w/w = 5/1), MWCNT form fewer pellets than previously observed and exhibited more or less individualized clusters of tubes (Figure 2b). Finally, with a ratio MWCNT/NOM of 1or less, all MWCNT tend to be individualized in the suspension (Figure 2c).

Higher magnification TEM observations of MWCNT without NOM presented in Figure 2(d) show the presence of catalyst residue, always encapsulated in carbon shells or directly embedded into the tubes. ICP-MS analysis revealed only significant increased concentrations of molybdenum (Mo) in both 48 h $MWCNT_{50mg-sonicated}$ and $MWCNT_{50mg+NOM}$. Thus, Mo concentrations were 20.77 µg L^{-1} (SD = 3.85) for $MWCNT_{50mg}$ and 22.42 µg L^{-1} (SD = 0.15) for $MWCNT_{50mg+NOM}$, namely around two times higher than in CHU10. The pH of the culture media measured at the beginning (6.5 ± 1) and at the end of each experiment (7.1 ± 1) was never significantly modified by the presence of either NOM or MWCNT.

The effect of MWCNT suspensions on photosynthetic yield, chloroplasts and viability

Significant positive correlation between the presence of NOM in the MWCNT suspensions and PSII was observed ($\tau = 0.62$; $Z = 5.77$; $p < 0.001$), highlighting a positive effect of NOM on photosynthetic activity. However, no significant correlation was found between MWCNT concentration and PSII ($\tau = 0.18$; $Z = 1.075$; $p = 0.06$). Moreover, no significant difference in PSII was observed between control and treated diatoms regardless of MWCNT concentration. Thus, diatoms exposed to $MWCNT_{sonicated}$ exhibited an average PSII of 0.58 ± 0.03 (± = 95% confidence interval) whereas those exposed to $MWCNT_{+NOM}$ exhibited an average PSII of 0.63 ± 0.03. Observations of chloroplasts have not revealed any abnormality whatever the test conditions. Viability tests after 48 h of exposure have not revealed any significant mortality induced by $MWCNT_{sonicated}$ or $MWCNT_{+NOM}$. Thus, the test have revealed an average mortality of 7.2 ± 1% (± = 95% confidence interval) under all tested conditions.

MWCNT and NOM effects on *N. palea* growth

Figure 3(a) shows the growth kinetics of *N. palea* in controls with or without NOM. A positive effect of NOM ($p < 0.01$) was observed on *N. palea* growth from 48h (+21 ± 9%) extending to 144 h (+8 ± 3%) but was significant only during the exponential growth phase. EC_{50} and growth rates were determined after 48 h of exposure to MWCNT corresponding to the end of the exponential phase. Diatoms exposed to $MWCNT_{sonicated}$ exhibited an estimated 48 h EC_{50} of 118 mg L^{-1} (95% confidence interval: 76; 201). Diatoms exposed to $MWCNT_{+NOM}$ exhibited a 48 h EC_{50} of 2.83 mg L^{-1} (95% confidence interval: 0.84–8.82). Figure 3(b and c) shows growth inhibition after both 48 h of direct exposure to $MWCNT_{sonicated}$ and shading. Significant growth inhibition of *N. palea* was only observed for direct exposure to $MWCNT_{50mg-sonicated}$ (23.4 ± 7%) (Figure 3b). Direct exposure to $MWCNT_{+NOM}$ (Figure 3c) caused a dose–response growth inhibition from 0.1 mg L^{-1} to 50 mg L^{-1} with

DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

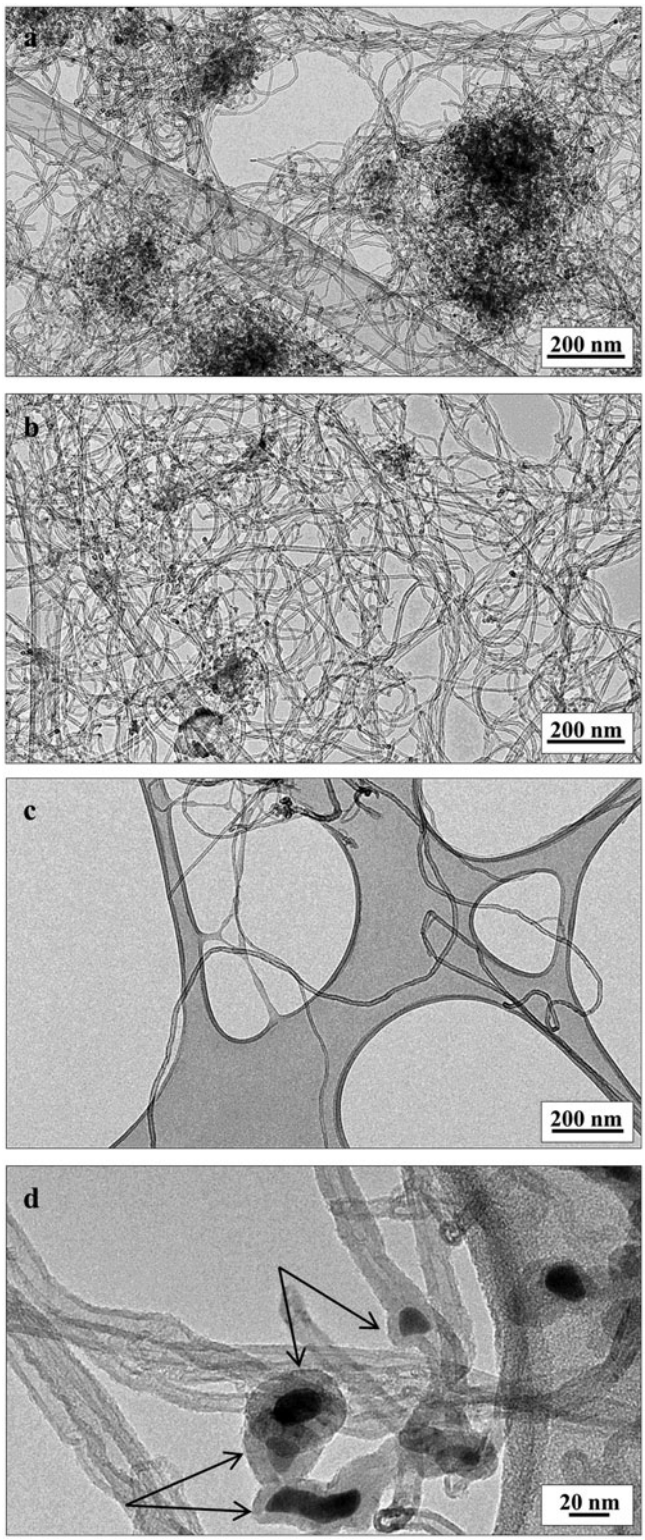


Figure 2. Transmission electron microscopy (TEM) images of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) dried suspensions with various concentrations of natural organic matter (NOM). (a) Without natural organic matter ($MWCNT_{sonicated}$). (b) With NOM ($MWCNT_{+NOM}$; ratio 1/1). (c) $MWCNT_{+NOM}$ (ratio 5/1). (d) Magnified view of (a). Arrows indicate metallic residues encapsulated in carbon shells or directly embedded in MWCNT.

inhibition values of $28.9 \pm 12\%$, $52.4 \pm 3\%$, $71.2 \pm 7\%$, and $81.4 \pm 2\%$ and a calculated 48 h EC_{50} of $2.83\ mg\ L^{-1}$.Moreover, $MWCNT_{+NOM}$ caused growth inhibition by shading from $10\ mg\ L^{-1}$ ($67 \pm 12\%$) to $50\ mg\ L^{-1}$ ($67.1 \pm 8\%$) although shading effect at lower concentrations cannot be ruled out. The decrease of PAR caused by shading depends on the MWCNT concentrations. This is shown in the caption for Figure 3. Figure 3(d and e) shows growth rates after 144 h of exposure. All conditions exhibited growth rates similar to controls, except for cultures exposed to $MWCNT_{50mg+NOM}$ which exhibited an inhibition of $34 \pm 11\%$.

MWCNT adherence to the algal biofilm

The interaction of MWCNT with the biofilm of diatoms was investigated using stereo microscopy, light microscopy, and SEM. Examples of collected stereo-microscopy images show an overview of the MWCNT pellet size and structure in $MWCNT_{sonicated}$ in the presence or absence of *N. palea* (Figure 4). In the absence of *N. palea*, $MWCNT_{sonicated}$ formed only free sparse large pellets of several mm in diameter. In the presence of *N. palea*, MWCNT form many scattered pellets agglomerated onto the biofilm despite the presence or not of NOM. The staining of EPS using Alcian blue showed an agglomeration of the MWCNT onto these compounds (Figure 5a–c). Collected images also showed that this agglomeration was highly impacted by the NOM driven dispersion of MWCNT. Without NOM, MWCNT presented large clusters, mostly agglomerated on areas with a high quantity of diatoms and EPS (Figure 5b). NOM-dispersed MWCNT clusters were smaller and a large quantity of MWCNTs was stock to the EPS network (Figure 5c).

Figure 5(d–g) shows examples of collected SEM images of *N. palea* in control culture and in cultures exposed for 48 h to $MWCNT_{10mg+NOM}$. SEM allows higher magnified observations of the EPS network produced by diatoms and their interaction with MWCNT. These figures show that MWCNT present a high affinity for the EPS and are mostly included-in or stocked to the EPS matrix. However, few are found on the surface of cells. Finally SEM observations highlighted a ≤ 10 nm porous nanostructure inside the pores of frustules (Figure 5i). The size of these ''nanopores'' is smaller than that of most MWCNT (Figure 5h).

Discussion

MWCNT suspensions, dispersion, and catalyst metal release

The importance of CNT dispersion on the observed effects on organisms has often been described (Dong et al., 2008; Kwok et al., 2010; Schwab et al., 2011; Gao et al., 2012). Ultra-sonication is a widely employed technique to disperse CNTs in solvents (Hilding et al., 2003). In CHU10, ultra-sonication was not efficient in maintaining MWCNT in suspension. According to Hyung et al. (2007), the addition of NOM ($10\ mg\ L^{-1}$) during sonication allowed a stable suspension of MWCNT from $0.1\ mg\ L^{-1}$ to $10\ mg\ L^{-1}$. However, $^{-}MWCNT_{50mg+NOM}$ sedimentated rapidly despite the observed reduction of pellet size (Figure 2). These results emphasize three distinct states of dispersion of MWCNT: (i) agglomerated ($MWCNT_{0.1mg-sonicated}$; $MWCNT_{1mg-sonicated}$; $MWCNT_{10mg-sonicated}$; $MWCNT_{50mg-sonicated}$) (Figure 2a), (ii) partially dispersed but unstable in the suspension ($MWCNT_{50mg+NOM}$) (Figure 2b), and (iii) dispersed and stable ($MWCNT_{0.1mg+NOM}$; $MWCNT_{1mg+NOM}$; $MWCNT_{10mg+NOM}$) (Figure 2c).

NOM affinity for CNTs results in a non-covalent adsorption due to different mechanisms: electrostatic, hydrophobic, π–π, and hydrogen bonding (Yang & Xing, 2009). It might be attributed to the size of hydrophilic groups, with high molecular weights and long polymeric chains (Vaisman et al., 2006) which compose humic and fulvic acids. This coating/interaction induces

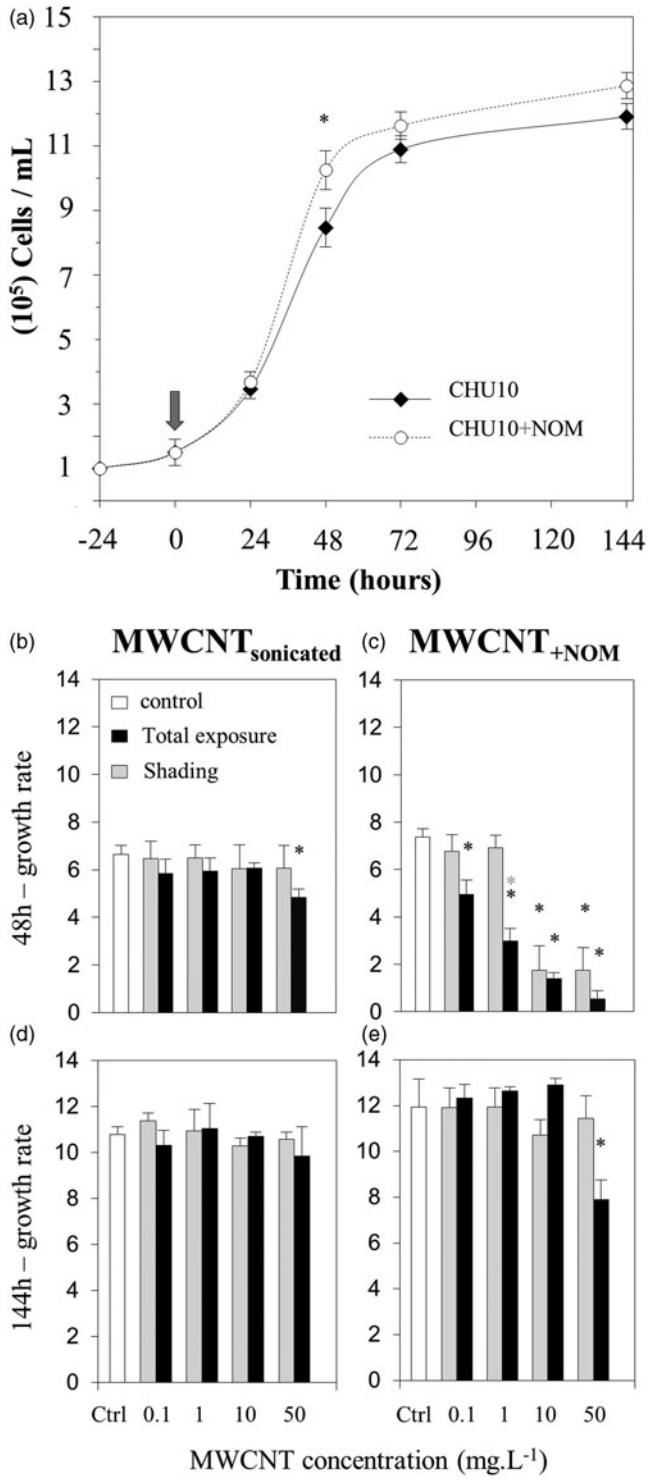


Figure 3. (a) Growth kinetics in control culture of *N. palea* growth in CHU no. 10 medium (CHU10; solid line) and in CHU10 plus 10 mg L^{-1} of natural organic matter (CHU10 + NOM; dashed line). Arrow indicates the time of NOM addition. (*) Indicates a significant difference ($p < 0.01$). (b) *Nitzschia palea* growth rates (r) after 48 h of exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) sonicated ($MWCNT_{sonicated}$) and (c) to $MWCNT_{sonicated}$ with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNT_{+NOM}$). (d) and (e) are the same conditions but after 144 h of exposure. Error bars are standard error. (*) Indicates significant difference versus controls. (*) Indicates a significant difference between total exposure effect and shading effect ($p < 0.01$). $r = (n_x - n_0)/n_0$ (n_x = number of cells mL^{-1} after 48 or 144 h of exposure; $n_0 = 1.22 \times 10^5$ cell mL^{-1} = number of cells mL^{-1} at the beginning of exposures). Photo synthetically active radiations (PAR) values (μmole s^{-1} m^{-2} μA) after 48 h are 22.9 ± 0.8, 24 ± 3.2, 24.4 ± 1.7, 23.3 ± 4.8, 11.7 ± 2.1* for $MWCNT_{sonicated}$ and 23.8 ± 1.5, 24.2 ± 2, 23.8 ± 3.4, 15.1 ± 1.4*, 9.6 ± 1.6* for $MWCNT_{+NOM}$ values correspond, respectively to: control 0.1 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}, and 50 mg L^{-1}. (*) Indicates significant difference versus controls.

electrostatic or steric repulsions that counterbalance van der Waals attractions and changes surface energy. This creates a thermodynamically stable dispersion (Hilding et al., 2003). These results demonstrated that organic matter can strongly modify the behavior of MWCNT in aqueous media. These also show that dispersion is modulated by the NOM/MWCNT ratio. In our experimental conditions, MWCNT forms dispersed and stable suspensions as long as MWCNT/NOM ratio is less than or equal

DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

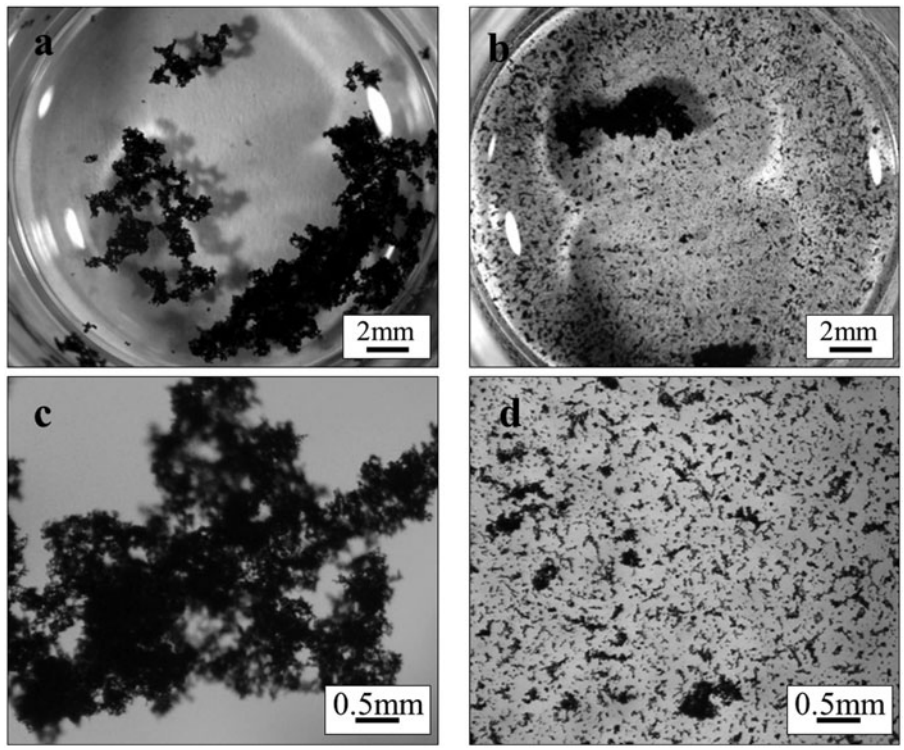


Figure 4. Examples of collected stereo-microscopy images of well bottoms after 48 h of diatoms exposed to 50 mg L^{-1} of MWCNT without natural organic matter ($MWCNT_{50mg-sonicated}$). (a) Overview of $MWCNT_{50mg-sonicated}$ without diatoms. (b) Same suspension in the presence of diatoms. (c) and (d) higher magnification of (a) and (b), respectively.

to 1. This is the case for all experimental conditions except for $MWCNT_{50mg+NOM}$.

The presence of metallic ions and nanoparticles in MWCNT suspensions was shown by TEM and quantified in solution by ICP-MS. In agreement with Pumera (2007), TEM only revealed carbon-encapsulated metallic nanoparticles that were physically and chemically protected from the medium (Figure 2d). However, ICP-MS analysis revealed the presence of significant free Mo concentration about two times more than in CHU10. Investigations of structural defects by TEM and SEM did not provide any evidence of MWCNT alteration caused by ultra-sonication, although TEM is probably not the best suited tool to elucidate this question. Both Bourdiol et al. (2013) working on the same batch of MWCNT and the works of Chowdhury & Cui (2011) came (using Raman, TEM and Dynamic light scattering) to the same conclusions.

Investigation of MWCNT toxic effects

Oxidative stress induced by the release of nanoparticles or metal ions is often involved in toxic effects such as alteration of cellular membranes, mortality, and decreases in PSII (Von Moos & Slaveykova, 2013). ICP-MS analysis revealed only the presence of Mo both in $MWCNT_{50mg-sonicated}$ and $MWCNT_{50mg+NOM}$. Mo concentrations were about 750 times less (~20 µg L^{-1}) than those leading to acute toxicity (>15 mg L^{-1}) for some unicellular algae (Dooren de Jong, 1965; Sakaguchi et al., 1981). Furthermore, Mo concentrations were similar for these two conditions while strong differences in terms of growth inhibition were observed (Figure 3b and c). No significant decrease in *N. palea* PSII was measured after 48 h of exposure whether for diatoms exposed to MWCNT or to $MWCNT_{+NOM}$ when compared with control. These data show that MWCNT had no effect on the relative efficiency of energy conversion of the photosynthetic centers of *N. palea*. According to several studies (Kang et al., 2008; Wei et al., 2010; Wild & Jones, 2009), viability, plasma membranes, and chloroplasts were also unaltered whatever the MWCNT dispersion conditions. All these results suggest the absence of disorders caused by oxidative stress on exposed diatoms. In line with previous works on photosynthetic organisms (Ilyash et al., 2007; Kulikova et al., 2005), a positive effect of NOM on PSII was emphasized. This increase in PSII may explain the positive effect of NOM on *N. palea* growth (Figure 3a). Finally, the lack of effect on PSII and chloroplasts, together with the absence of acute mortality or plasma membrane disruption, hint at as an inhibitory effect of MWCNT on *N. palea* rather than a toxic effect. Moreover, growth inhibition of *N. palea* was not related to the presence of metal ions in MWCNT suspensions.

MWCNT effect on growth: total exposure effect versus shading effect

In this study, total exposure and shading effects on the growth of *N. palea* were investigated simultaneously. Without NOM, only exposure to $MWCNT_{50mg-sonicated}$ led to growth inhibition after 48 h (Figure 3b) with an EC_{50} of ~118 mg L^{-1}. However, exposure to $MWCNT_{+NOM}$ led to a dose–response growth inhibition from $MWCNT_{0.1mg+NOM}$ (Figure 3c). Thus NOM decreased the EC_{50} by around a factor forty (2.83 mg L^{-1}). Addition of NOM (10 mg L^{-1}) has strongly increased growth inhibition caused by MWCNT despite a positive effect of NOM observed in control culture (Figure 3a). According to Kwok et al. (2010), shading tests have shown that MWCNT without NOM agglomerate quickly (Figures 2a and 4a–c). They were also not effective in causing growth inhibition by shading in the range of chosen concentrations (Figure 3b). A recent study estimated between 20% and 40% the contribution of shading to the observed toxicity of MWCNTs (10 mg L^{-1}) on *Chlorella* sp. after 96 h of exposure (Long et al., 2012). Thus, our results suggest that *N. palea* growth is less affected by the shading of $MWCNT_{sonicated}$ than the planktonic green algae *Chlorella* sp. According to Schwab et al. (2011), shading of $MWCNT_{+NOM}$ caused a strong growth inhibition from 10 mg L^{-1} (~ 67%) due to dense and homogeneous clouding. Nevertheless, evaluation of shading using external filters as they were used in the present study, is prone to underestimate the part of shading plays in growth inhibition

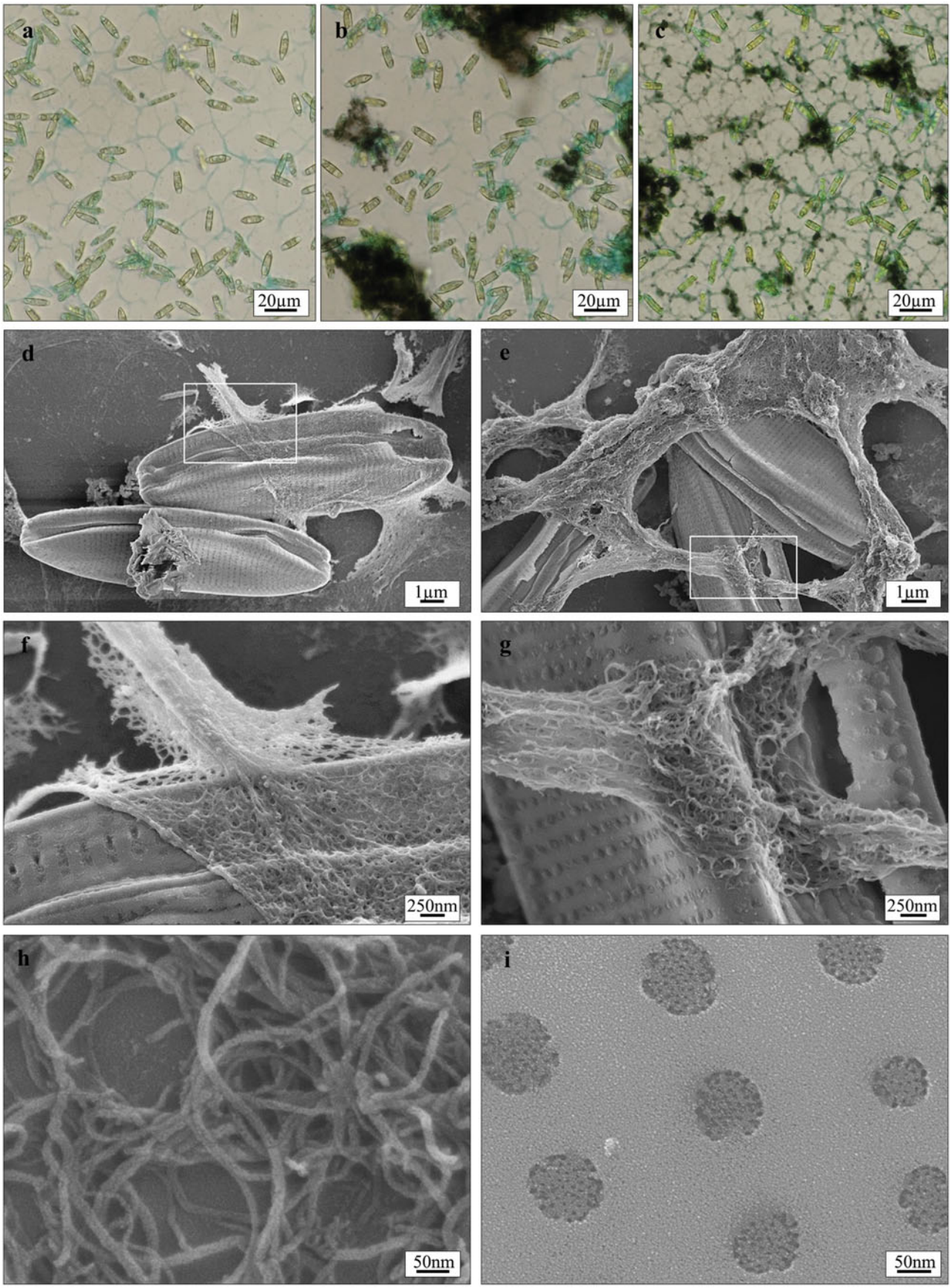


Figure 5. Biofilm of *N. palea* in devices after staining extracellular polymeric substances (EPS) using Alcian blue. (a) Control culture. (b) Culture exposed to suspension of multi-walled carbon nanotubes at $10\,mg\,L^{-1}$ ($MWCNT_{10mg-sonicated}$). (c) Culture exposed to suspension of $10\,mg\,L^{-1}$ MWCNT with a natural organic matter ($MWCNT_{10mg+NOM}$). EPS are stained in blue. MWCNT are in black. Scanning electron microscopy (SEM) images of *N. palea* (d) in control cultures and (e) in $MWCNT_{10mg+NOM}$. (f) and (g) Higher magnification of previous images focused on an EPS structure without or with $MWCNT_{10mg+NOM}$, respectively. (h) SEM images of MWCNT. (i) Detail of the nanostructure observed in pores of frustule.

DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

(Cleuvers et al., 2002; OECD, 2002). Indeed, shading will be slightly higher for diatoms in contact with MWCNT (especially in the case of $MWCNT_{sonicated}$) as compared with diatoms in externally shaded cultures. This makes it difficult to properly estimate the true part of inhibition by shading for exposed diatoms.

Stereo microscopy showed that MWCNT bonded strongly to the biofilm (Figure 4) whatever their state of dispersion and the presence or absence of NOM. The presence of biofilm, therefore, reduced their dispersion. Agglomeration of MWCNT and more broadly of nanomaterials onto cells is often involved in the growth inhibition or toxicity observed on algae (Aruoja et al., 2009; Long et al., 2012; Schwab et al., 2011). Agglomerates observed on the biofilm may, therefore, explain growth inhibition. At the end of the experiment, a full recovery of growth was observed for all conditions except $MWCNT_{50mg+NOM}$. Thus, the inhibitor effect caused both by lack of light and contact appears to be reversible. This suggests that (i) shading at tested concentrations only delayed growth of *N. palea* and (ii) *N. palea* became less sensitive to MWCNT over time, as already observed on green algae (Wang et al., 2008; Youn et al., 2012).

It has been hypothesized that CNT self-agglomeration and macromolecules production, such as EPS by algae, both helped to neutralize the reactive surface sites of nanoparticles (Wei et al., 2010), reducing CNT toxicity. Thus, agglomeration that is partly responsible for growth inhibition early during the exposure could lead to detoxifying MWCNT. Furthermore, the mobility of *N. palea* gives it the opportunity to leave contaminated areas of the biofilm and to better reach MWCNT-free areas, making the evaluation of shading over time even more unpredictable.

Biofilm-MWCNT interaction: role of EPS and frustules

Focusing on EPS, light microscopy revealed the EPS network formed by *N. palea*, resulting from excretion involved in their shifting on and adherence to the substrate (Figure 5a). Strong agglomeration of MWCNT on EPS (Figure 5b and c) was also observed. In the absence of NOM, MWCNT form large agglomerates in high EPS concentration areas. MWCNT dispersed by NOM homogeneously covered the EPS network.

SEM observations confirmed and specified the interaction. The EPS network is fully covered by MWCNT and highly disrupted in the case of $MWCNT_{10mg+NOM}$ (Figure 5d–g). This affinity may result from different kinds of interactions depending on the presence or absence of NOM. EPS could form many hydrogen and sulfate bonds, bivalent bridging or covalent peptide bonds with NOM coating MWCNTs because of their numerous uronic acids, sulfonated sugars, and/or ketal-linked pyruvate groups (Stal, 2003). Finally, NOM adsorbed to MWCNT could, like Arabic gum, act as adhesion promoters, leading to the formation of highly adhesive interfaces between CNTs and the EPS matrix (Bandyopadhyaya et al., 2002; Gennes, 1990). These data show the efficiency of EPS in binding MWCNT and their potential role in diatom protection. More generally, our results according to the literature show the widespread role of EPS in efficiently protecting organisms against (nano) particles, whether natural (Brouwer et al., 2005; Staats et al., 1999) or manufactured (Luongo & Zhang, 2010; Jachak et al., 2012; Wei et al., 2010). Environmental conditions are known to strongly influence the production of EPS (Stal, 2003). An energetic trade-off could be achieved by *N. palea*, allocating more energy to their protection (sequestration of MWCNT as well as fleeing from high density MWCNT areas) and less to cell division. This could explain both the strong growth inhibition during early stages of exposure and the growth recovery observed at the end of the experiment. Studies are currently in progress in order to better quantify the contribution of this mechanism to the growth inhibition caused by MWCNT.

Frustules are at the interface between the cell membrane and the extracellular environment. They represent the area of exchange between intracellular and external medium and confer strong protection to diatoms against mechanical stresses (Hamm et al., 2003). SEM shows that the frustule was not altered by MWCNT. Contrary to what was observed by other authors, SEM did not reveal any direct affinity of MWCNT for the outer surface of the diatom cells (Figure 5e–g). Furthermore, magnified observation revealed ''nanopores'' ($\sim$10 nm or less), forming nano-metric filters (Figure 5h and i). These filters enable both nutrient uptake and exclusion of particles, bacteria, and viruses (Losic et al., 2006). In the present case, it might completely prevent the entry of MWCNT into the cells.

This study reveals two important features of *N. palea* and numerous benthic diatoms which efficiently protect them against MWCNT and possibly explain the absence of toxicity: (i) the affinity of MWCNT for EPS rather than diatoms cell wall and (ii) the nano-porous structure of the frustule pores.

Conclusion

NOM strongly increases MWCNT-induced growth inhibition on the diatoms *N. palea* compared with raw MWCNT material, especially at short exposure times. Only growth inhibition was observed and seems partially explained by the shading effect that MWCNT caused when dispersed by NOM. However, the affinity of MWCNT for the biofilm and the mobility of *N. palea* were not taken into account in shading effect assessment, and a misestimating of the shading effect cannot be ruled out in the present study.

Microscopic observations provided an explanation for the commonly observed adherence of MWCNTs to organisms. Our results suggest that EPS provide considerable protection against MWCNTs, by reducing water column opacity and contact opportunities. EPS excretion also confers mobility to *N. palea*, an opportunity for escape from MWCNTs contaminated area. The intrinsic-to-diatom frustule, also appears as an efficient barrier preventing MWCNTs cellular uptake, thereby limiting toxic effects. Thus, our study highlights two protective means that benthic diatoms naturally possess against MWCNTs and probably numerous other non-soluble nanoparticles too. For a better assessment of MWCNTs effect, determining to what extent an overproduction of EPS induced by MWCNTs may be involved in the observed growth inhibition could be the next step.

From an ecological point of view, CNTs adhesion to biofilm could greatly increase the persistence of these nanoparticles in aquatic environments. The predominant role of aquatic biofilms for many primary consumers could also potentiate the transfer of CNTs along the aquatic food chains.

Acknowledgements

We thank the Lacq Research Group (Arkema France) for supplying MWCNT suspensions. Part of the present study was achieved in the framework of the public/private joint research laboratory NAUTILE (NAnotUbes et écoToxIcoLogiE; Arkema France–CNRS/INPT/UPS). We acknowledge the Common Service for Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy of the University Paul Sabatier and Stephane Du Plouy for his help. The English language of the manuscript has been corrected by the native English Rashard Khadaroo (Université Paul Sabatier, Toulouse, France).

Declaration of interest

This research was supported by the French Ministry of higher education and research. The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

Ajayan PM, Zhou OZ. 2001. Applications of carbon nanotubes. In Dresselhaus MS, Dresselhaus G & Avouris P, eds. Carbon Nanotubes. Berlin, Heidelberg: Springer, 391–425.

Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Sci Total Environ 407:1461–8.

Bandyopadhyaya R, Nativ-Roth E, Regev O, Yerushalmi-Rozen R. 2002. Stabilization of individual carbon nanotubes in aqueous solutions. Nano Lett 2:25–8.

Bourdiol F, Mouchet F, Perrault A, Fourquaux I, Datas L, Gancet C, et al. 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. Carbon 54:175–91.

Brouwer JFC, Wolfstein K, Ruddy GK, Jones TER, Stal LJ. 2005. Biogenic stabilization of intertidal sediments: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. Microb Ecol 49:501–12.

Chowdhury DF, Cui ZF. 2011. Carbon nanotube length reduction techniques, and characterisation of oxidation state using quasi-elastic light scattering. Carbon 49:862–8.

Cleuvers M, Ratte HT. 2002. The importance of light intensity in algal tests with coloured substances. Water Res 36:2173–8.

Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E. 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. In Whitacre DM, ed. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 203. New York (NY): Springer New York, 87–103.

Dong L, Joseph KL, Witkowski CM, Craig MM. 2008. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants. Nanotechnology 19:255702.

Dooren de Jong. 1965. Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. Antonie Van Leeuwenhoek 31:301–13.

Endo M, Strano MS, Ajayan PM. 2008. Potential applications of carbon nanotubes. In Carbon Nanotubes. Berlin, Heidelberg: Springer, 13–61.

Erlandsen SL. 2004. High-resolution visualization of the microbial glycocalyx with low-voltage scanning electron microscopy: dependence on cationic dyes. J Histochem Cytochem 52:1427–35.

Flemming HC, Wingender J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I: structural and ecological aspects. Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res 43:1–8.

Gao J, Llaneza V, Youn S, Silvera-Batista CA, Ziegler KJ, Bonzongo J-CJ. 2012. Aqueous suspension methods of carbon-based nanomaterials and biological effects on model aquatic organisms. Environ Toxicol Chem 31:210–14.

Ge C, Li Y, Yin J-J, Liu Y, Wang L, Zhao Y, Chen C. 2012. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. Npg Asia Mater 4:e32. doi: 10.1038/am.2012.60.

Gennes PGde. 1990. Simple views on adhesion and fracture. Can J Phys 68:1049–54.

Gusev AA, Fedorova IA, Tkachev AG, Godymchuk AY, Kuznetsov DV, Polyakova IA. 2012. Acute toxic and cytogenetic effects of carbon nanotubes on aquatic organisms and bacteria. Nanotechnol Russ 7:509–16.

Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, Smetacek V. 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature 421:841–3.

Hilding J, Grulke EA, George Zhang Z, Lockwood F. 2003. Dispersion of carbon nanotubes in liquids. J Dispers Sci Technol 24:1–41.

Horst AM, Vukanti R, Priester JH, Holden PA. 2013. An assessment of fluorescence- and absorbance-based assays to study metal-oxide nanoparticle ROS production and effects on bacterial membranes. Small 9:1753–64.

Hsieh S-F, Bello D, Schmidt DF, Pal AK, Stella A, Isaacs JA, Rogers EJ. 2013. Mapping the biological oxidative damage of engineered nanomaterials. Small 9:1853–65.

Hund-Rinke K, Simon M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO_2) on algae and daphnids (8 pp). Environ Sci Pollut Res – Int 13:225–32.

Hyung H, Fortner JD, Hughes JB, Kim J-H. 2007. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. Environ Sci Technol 41:179–84.

Ilyash LV, Belevich TA, Ulanova AY, Matorin DN. 2007. Fluorescence parameters of marine plankton algae at the assimilation of organic nitrogen. Mosc Univ Biol Sci Bull 62:111–16.

Jachak A, Lai SK, Hida K, Suk JS, Markovic N, Biswal S, et al. 2012. Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. Nanotoxicology 6:614–22.

Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M. 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! Langmuir 24:6409–13.

Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J Nanopart Res 15:1692–708.

Kulikova NA, Stepanova EV, Koroleva OV. 2005. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. In Perminova IV, Hatfield K & Hertkorn N, eds. Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 285–309.

Kümmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W. 2011. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. Chemosphere 82:1387–92.

Kwok KW, Leung KM, Flahaut E, Cheng J, Cheng SH. 2010. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. Nanomedicine 5:951–61.

Long Z, Ji J, Yang K, Lin D, Wu F. 2012. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. Environ Sci Technol 46:8458–66.

Losic D, Rosengarten G, Mitchell JG, Voelcker NH. 2006. Pore architecture of diatom frustules: potential nanostructured membranes for molecular and particle separations. J Nanosci Nanotechnol 6:982–9.

Luongo LA, Zhang X (Jackie). 2010. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. J Hazard Mater 178:356–62.

Matorin DN, Karateyeva AV, Osipov VA, Lukashev EP, Seifullina NK, Rubin AB. 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Nanotechnol Russ 5:320–7.

Miao A-J, Schwehr KA, Xu C, Zhang S-J, Luo Z, Quigg A, Santschi PH. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ Pollut 157:3034–41.

Monthioux M, Kuznetsov VL. 2006. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? Carbon 44:1621–3.

Mouchet F. Landois P. Datsyuk V, Puech P, Pinelli E, Flahaut E, Gauthier L. 2011. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for *in vivo* evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. Environ Toxicol 26:136–45.

Mouchet F, Landois P, Flahaut E, Pinelli E, Gauthier L. 2007. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. Nanotoxicology 1:149–56.

Mouchet F, Landois P, Puech P, Pinelli E, Flahaut E, Gauthier L. 2010. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomedicine 5:963–74.

Mwangi JN, Wang N, Ingersoll CG, Hardesty DK, Brunson EL, Li H, Deng B. 2012. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. Environ Toxicol Chem 31:1823–30.

Nel A. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311:622–7.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2002. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Vol.: OECD Series on Testing and Assessment. Paris, France: OECD Publishing.

Oeurng C, Sauvage S, Coynel A, Maneux E, Etcheber H, Sánchez-Pérez J-M. 2011. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. Hydrol Process 25:2365–78.

Petersen EJ, Pinto RA, Mai DJ, Landrum PF, Weber WJ. 2011. Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. Environ Sci Technol 45:1133–8.

Pumera M. 2007. Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. Langmuir 23:6453–8.

Sakaguchi T, Nakajima A, Horikoshi T. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 12:84–9.

Scala S, Bowler C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. Cell Mol Life Sci 58:1666–73.

DOI: 10.3109/17435390.2014.918202

Schwab F, Bucheli TD, Lukhele LP, Magrez A, Nowack B, Sigg L, Knauer K. 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? Environ Sci Technol 45: 6136–44.

Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 261:121–33.

Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TGG, et al. 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30:3891–914.

Staats N, De Winder B, Stal L, Mur L. 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. Eur J Phycol 34: 161–9.

Stal LJ. 2003. Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments. Geomicrobiol J 20:463–78.

Vaisman L, Wagner HD, Marom G. 2006. The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. Adv Colloid Interface Sci 128–30, 37–46.

Von Moos N, Slaveykova VI. 2013. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 8:1–26.

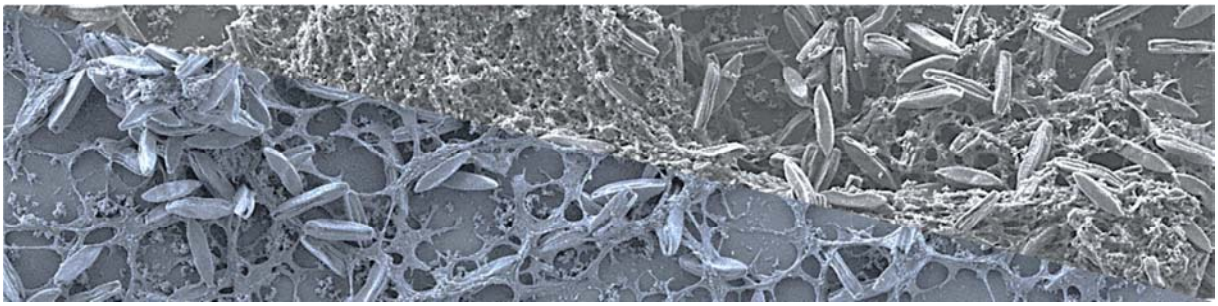
Wang J, Zhang X, Chen Y, Sommerfeld M, Hu Q. 2008. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Chemosphere 73:1121–8.

Wei L, Thakkar M, Chen Y, Ntim SA, Mitra S, Zhang X. 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. Aquat Toxicol 100: 194–201.

Wild E, Jones KC. 2009. Novel method for the direct visualization of *in vivo* nanomaterials and chemical interactions in plants. Environ Sci Technol 43:5290–4.

Yang K, Xing B. 2009. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. Environ Pollut 157:1095–100.

Youn S, Wang R, Gao J, Hovespyan A, Ziegler KJ, Bonzongo J-CJ, Bitton G. 2012. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nanotoxicology 6:161–72.



CHAPITRE 4

DYNAMIQUE DE FIXATION DE NANOTUBES DE CARBONE DOUBLE-PAROI ET MULTI-PAROIS SUR UN BIOFILM DE *NITZSCHIA PALEA*

Contexte :

Le chapitre précédent mettait en avant une forte affinité des MWNTC pour les SPE produites par *N. palea*. Cette dernière semblait être impliquée dans la diminution des effets observée au cours du temps, en diminuant la quantité de NTC dans la colonne d'eau responsable de l'ombrage (particulièrement aux fortes concentrations (10 mg L^{-1} et 50 mg L^{-1}) et en favorisant l'agglomération des NTC entre eux. Ce mécanisme d'agglomération est suspecté d'être impliqué dans la réduction des effets des NTC au cours de l'expérience. Cette inhibition des effets pourrait être liée à une réduction de leur surface de contact avec les diatomées. Afin de mieux évaluer ce phénomène et de confirmer cette hypothèse, la présente étude s'est intéressée à quantifier la dynamique d'adhérence de DWNTC et MWNTC, dans les mêmes conditions que précédemment, sur le biofilm de *N. palea*.

Résultats marquants et conclusions :
Cette étude a montré qu'un biofilm de *N. palea* pouvait, dans nos conditions expérimentales, capter de grandes quantités de NTC. Après 24h d'exposition, entre 10% et 20% des NTC étaient déjà accrochés au biofilm. Après 6 jours, entre 70 et 90 % des NTC présents étaient adhérés, indépendamment du type de NTC, de leur concentration de départ dans la colonne d'eau ou de leur état de dispersion (dans la gamme 1 mg L^{-1} ; 5 mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}). Cette adhérence présentait une tendance exponentielle, alors que la croissance de *N. palea* présentait une allure sigmoïde (classique en culture cellulaire). Ainsi, la quantité de NTC captée continuait d'augmenter, même dans la phase plateau de croissance de l'algue. Ce résultat suggère une production continue de substances extracellulaires polymériques (SPE) par la diatomée *N. palea*. L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de montrer qu'un jeune biofilm de *N. palea* (7 jours, dont 6 d'exposition) pouvait capter jusqu'à 4,97 µg cm^2 de NTC, soit ~90% de la quantité apportée pour une concentration de départ de 10 mg L^{-1} de NTC.
Ces résultats indiquent que les biofilms photo-autotrophes pourraient fortement concentrer les NTC et probablement d'autres nanoparticules.

Ce chapitre est structuré sous la forme d'un article en préparation, rédigé en Français, qui s'intitule :

Quantification de l'adhérence de nanotubes de carbone double paroi et multi-parois sur un biofilm de diatomées benthiques au cours du temps.

Laurent Verneuil, Jérôme Silvestre, Florence Mouchet, Laury Gauthier, Emmanuel Flahaut et Eric Pinelli

Quantification de l'adhérence de nanotubes de carbone double-paroi et multi-parois sur un biofilm de diatomées benthiques au cours du temps.

Résumé:

Nous présentons ici une étude ayant permis de quantifier de façon simple l'adhérence de nanotubes de carbone (NTC) double paroi (DWNTC) et multi-parois (MWNTC) sur un biofilm phototrophe mono-spécifique de la diatomée *Nitzschia palea*, (*N. palea*) au cours du temps. Pour cela, trois concentrations de nanotubes ont été choisies (1mg L^{-1}, 5 mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}). Suite aux travaux antérieurs (Verneuil et al, 2014), le choix de disperser les NTC avec une concentration environnementale de matière organique naturelle (MON ; 10 mg L^{-1}) a été fait, afin de reproduire des conditions de dispersion proches du milieu naturel. Cette concentration permettait de suspendre durablement toutes les concentrations de MWNTC testées et seulement les concentrations de 1mg L^{-1}, 5 mg L^{-1} de DWNTC. Les résultats indiquent que l'adhérence des DWNTC était supérieure à celle des MWNTC au début de l'expérience, alors que les quantités adhérées étaient similaires pour une même concentration de NTC après 6 jours d'exposition et représentait entre 70% et 90% de la quantité initiale de NTC. A la fin de l'expérience, la quantité de DWNTC adhérée au biofilm était de 4.74 µg/cm^2 et celle de MWNTC adhérée au biofilm était de 4,97 µg/cm^2. L'ensemble des résultats indique que, dans nos conditions expérimentales, la nature des NTC, ainsi que leur état de dispersion, n'influence pas de façon notable leur potentiel d'adhérence au biofilm de *N. palea*. Ces résultats laissent présager une forte accumulation des NTC dans les biofilms phototrophes à l'interface entre eau et sédiments dans les écosystèmes aquatiques.

Mots clés: Eco-toxicologie, Nanoparticules carbonées, algues, Densité optique, Microscopie électronique à balayage

Introduction

La production et l'utilisation croissante de nanotubes de carbone (NTC) va générer une hausse croissante de la présence de ces structures dans l'environnement (Köhler et al., 2008; Petersen et al., 2011). Les modèles prédisent un fort risque de concentration dans les milieux aquatiques situés en aval des bassins versants, particulièrement dans les sédiments (Gottschalk et al., 2013). A l'heure actuelle, le comportement et la répartition des NTC dans les milieux aquatiques restent pourtant incertains. Ceci est lié aux fortes interactions qui peuvent se produire entre les NTC et les organismes, ainsi que les différentes molécules organiques et substrats présents en milieu aquatique (Navarro et al., 2008 ; Mu et al., 2014). De plus, aucune mesure des concentrations environnementales des nanoparticules n'a à ce jour été fructueuse (Petersen et al., 2011; von der Kammer et al., 2012). Ce manque de données limite fortement les vérifications de la robustesse des modèles, qui ont rarement pu être validés de façon expérimentale. Pourtant, d'un point de vue éco-toxicologique, connaître les concentrations en nanoparticules dans les différents compartiments des milieux aquatiques (surface, colonne d'eau, sédiments, organismes…) est un point clé pour l'évaluation des risques pour les différents organismes répartis dans ces compartiments.

L'adhérence des NTC aux microorganismes et aux biofilms a souvent été reportée (Long et al., 2012 ; Schwab et al., 2011 ; Tuzen et al., 2008 ; Verneuil et al., 2014). Cette adhérence semble à la fois fortement impliquée dans les effets observés sur les microorganismes ainsi que dans le devenir des NTC et leur répartition dans les écosystèmes aquatiques. De nombreux microorganismes et les biofilms qu'ils produisent sont connus pour capter divers polluants et biocides, ainsi que de grandes quantités de particules naturelles (Flemming and Wingender, 2010). Des études récentes ont également montré

que les NTC pouvaient être captés par ces mêmes biofilms, particulièrement *via* la production de substances polymériques extracellulaires (SPE, Tuzen et al., 2008 ; Verneuil et al., 2014).

Dans ce travail, l'adhérence de deux types de NTC sur un biofilm photo-autotrophe mono-spécifique a été quantifiée en fonction de la concentration et la durée d'exposition. L'effet de la présence d'organismes sur la répartition et le comportement des NTC (dispersés ou agglomérés ; en suspension dans la colonne d'eau, déposés ou adhérés au biofilm) a également été quantifié. Pour cela, nous avons choisi la diatomée benthique dulçaquicole *Nitzschia palea* (*N. palea*) comme modèle d'étude. Cette espèce, régulièrement utilisée dans diverses études de toxicologie environnementale et éco-toxicologiques (Bour et al., 2015; Debenest et al., 2010; Verneuil et al., 2014), présente l'intérêt de se fixer rapidement au support et de produire une grande quantité de SPE. Deux types de NTC (des nanotubes de carbone double-paroi : DWNTC et des multi-parois : MWNTC), présentant des surfaces spécifiques très différentes, ont été choisis afin d'évaluer l'importance de ce paramètre sur l'adhérence observée. Les NTC utilisés étaient dispersés par une quantité réaliste de Matière Organique Naturelle (MON ; 10 mg L^{-1}) et une agitation permanente a été appliquée aux cultures afin de mimer au mieux les conditions environnementales de milieux lotiques.

Plan expérimental

Espèces modèle et conditions de culture

Une souche de *N. palea* (Ref. CPCC-160) provenant du Canadian Phycological Culture Center (CPCC) a été cultivée dans du milieu de culture CHU n°10 basic medium (6.4<pH<6.6) en utilisant de l'Ethylène Diamine Tétra Acétique de sel ferrique (Na_2 Fe-EDTA) comme source de fer (pour plus de détails voir : http://uwaterloo.ca/canadian-phycologicalculture-centre/cultures/culture-media/chu-10). Cette souche était cultivée dans une enceinte de culture tempéré (20 ± 1°C) sur un agitateur rotatif à 90 rpm et avec une photopériode de 16h de jour /8h de nuit, assurée par des lampes à vapeur de sodium (VIALOX® NAV® (SON) SUPER 4Y®, 600W, OSRAM GmbH) avec une illumination de 66 µmol m^{-2} s^{-1}. Soixante-douze heures avant le début des tests et juste avant de préparer l'inoculum, les milieux de culture étaient renouvelés par du CHUn°10 frais. Toutes les manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire de classe II en conditions axéniques.

Nanotubes de carbone et matière organique naturelle

Les DWNTC utilisés ont été synthétisés à partir d'un mélange de dihydrogène (H_2) et de méthane (CH_4) en présence d'un catalyseur composé de Magnésium et d'oxyde de Cobalt ($Mg_{-x}Co_xO$) additionné d'oxyde de Molybdène (Mo_yO). Les DWNTC obtenus ont été purifiés avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (HCl) concentrée pour dissoudre les résidus de synthèse, qui sont ensuite exclus des échantillons de DWNTC par rinçages successifs et filtration. La composition élémentaire en carbone des NTC obtenus est de 89,7% du poids total, correspondant à 97,7% en masse molaire de carbone (déterminée par flash combustion), la majorité du Co et du Mo étant encapsulée dans des NPs graphitiques. La surface spécifique (déterminée par Brunauer-Emmett-Teller BET Specific Surface Area SSA) est de 980 m^2 g^{-1}. Le ratio entre les intensités des bandes D et G est proche de 8,9% (spectroscopie RAMAN). Le diamètre des DWNTC est compris entre 0,7 et 3 nm. Ils forment majoritairement des faisceaux allant de 10 nm à 20 nm de diamètre pour une longueur comprise entre 1 µm et supérieure à 100 µm. Les proportions en NTC sont de 77% de DWNTC, 18% de SWNTC et 5% de MWNTC (Flahaut et al., 2003).

Les MWNTC (commercialisés sous la référence GRAPHISTRENGTH C100, lot 09215, ARKEMA, France) ont été synthétisés en utilisant l'éthylène (C_2H_4) comme source de carbone. Le catalyseur était composé de Fer et Mo ainsi que d'alumine (Al_2O_3). La composition élémentaire en carbone des MWNTC était > 90% du poids total et Les impuretés métalliques de 1.4% d'aluminium, 0.9% de Fer et 735 ppm de

Mo, bien que la majorité des particules métalliques soient encapsulée dans des NP graphitique ou directement dans les MWNTC. La surface spécifique était de 270 m^2 g^{-1} pour une densité de 2.1. La taille des agglomérats initiaux (avant dispersion) variait de 200 µm à 500 µm. Le diamètre des MWNTC était compris entre quelques nm et 20 nm, leur longueur entre 0.1 µm et 10µm. Ils étaient regroupés en pelotes de tubes individualisés. Aucun SWNTC ou DWNTC n'ont été observés dans les échantillons testés (MET).

La matière organique naturelle (NOM ; Cat no. 1R101N) a été achetée à l'International Humic Substances Society (IHSS, St Paul, MN).

Préparation des suspensions de nanotubes de carbone

Les suspensions de NTC ont été préparées comme décrit dans Verneuil et al. (2014). Brièvement, cela consistait à préparer trois concentrations (1.67 mg $L^{-1;}$ 8.35 mg L^{-1}, 16.7 mg L^{-1}) à partir d'une suspension mère, préalablement passée aux ultrasons pendant une heure (BRANSON digital sonifier S-250D 200 W; amplitude 35% 5s/2s). Les suspensions obtenues étaient ensuite autoclavées (20mn; 121°C; 1 bar) puis soniquées à nouveau pendant 20 min après y avoir ajouté 16,7 mg L^{-1} de MON à proximité d'une flamme de bec à gaz pour maintenir une atmosphère stérile.

Quantification de la répartition des NTC au cours du temps

Les expositions se sont déroulées dans des boîtes de culture de 12 puits (Corning 3.84 cm^2 / puits). Une boîte par condition. Vingt-quatre heures avant la contamination, les boîtes étaient ensemencées avec 1 mL d'inoculum de *N. palea* à une concentration de 2.5 10^5 cellules mL^{-1}. Les boîtes contrôles (NTC sans diatomées) étaient juste remplies avec 1 mL de CHUn°10. Les boîtes étaient ensuite placés en condition de culture pendant 24h mais sans agitation, afin d'optimiser l'adhérence des algues et faciliter le début de la formation du biofilm. Après cela, chaque puits était contaminé avec 1.5 mL de suspension de NTC (une boite par condition) pour atteindre des concentrations en NTC finales de 1 mg L^{-1} ; 5 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1} (soit des quantités de NTC par puits de respectivement 2.5 µg, 12.5 µg et 25 µg) et de 10 mg L^{-1} de NOM (25 µg / puits). Les boîtes étaient ensuite replacées en conditions de cultures et l'agitation était restaurée. Les boîtes contrôles (sans diatomées) étaient préparées de la même façon.

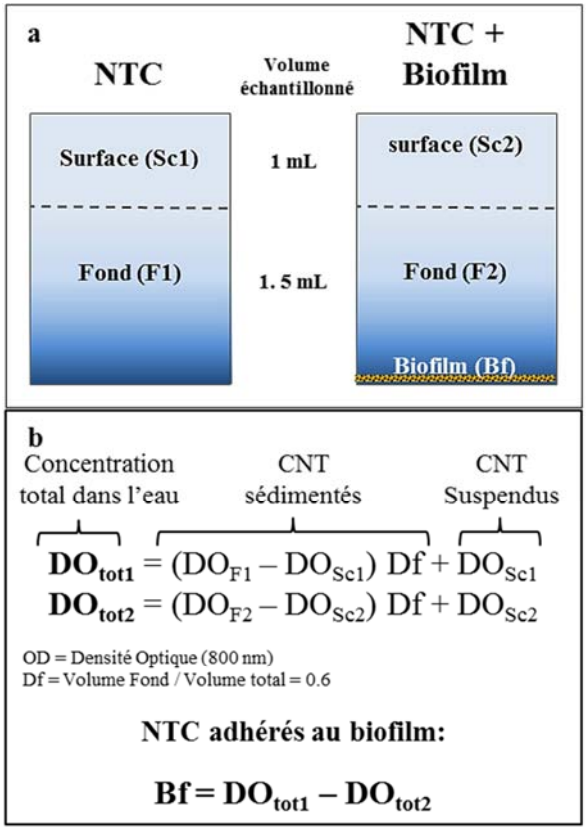


Figure 1 : principe des dosages de NTC dans les différents compartiments. (a) zones et quantité échantillonnées dans le dispositif, sans biofilm (à gauche) et avec biofilm (à droite). (b) Calcul des concentrations de NTC dans les différents compartiments à partir des régressions linéaires obtenues à partir de suspensions entièrement dispersées (pour les DWNTC : y = 0.397x – 0.0024 ; R2 = 0.997) et pour les MWNTC : y = 0.0383x - 0.0035 ; R2 = 0.999 avec y = OD et x = Concentration en NTC).

Après 24 h, 48 h, et 144 h, un prélèvement était réalisé dans trois puits pour chaque condition testée. Pour chaque puits, deux fractions étaient prélevées comme décrit dans la figure 1a. La première fraction (1 mL) était délicatement prélevée dans la colonne d'eau, alors que la seconde (1.5 mL) était prélevée après une agitation par aspiration et reflux répétés du milieu, permettant une homogénéisation des NTC sédimentés et/ou faiblement adhérés au biofilm. Les contrôles sans diatomées ont été prélevés de

la même manière. Les densités optiques (DO) à λ = 800 nm de chacune des fractions étaient mesurées après dispersion complète des prélèvements par du Tween® 20 (20 µL) et 1 minute au bain à ultrasons. Cette longueur d'onde a été choisie pour limiter les éventuelles interférences liées à la présence des pigments photosynthétiques de *N. palea* dans les prélèvements (dans tous les cas, la quantité de diatomées présente dans les échantillons prélevés était toujours en dessous des limites de comptage). Une gamme étalon de NTC réalisée à partir d'échantillons préparées comme pour les boites contrôles a été réalisée. Les équations obtenues sur la base de trois concentrations (1 mg L^{-1}, 5 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}) étaient : $y = 0.397x - 0.0024$ ($R^2 = 0.997$) pour les DWNTC et : $y = 0.0383x - 0.0035$ ($R^2 = 0.999$) pour les MWNTC (avec y = DO et x = concentration en NTC). Les quantités de NTC correspondantes ont ensuite été calculées : (i) la fraction en suspension, (ii) la fraction sédimentée et (iii) celle collée au biofilm (Figure 1b). Les valeurs ont ensuite été rapportées à la quantité de NTC présente dans chaque puits (en µg / 2.5 mL^{-1}), pour enfin calculer la quantité dans les trois compartiments pour une surface de biofilm donnée (µg cm^{-2}). Les valeurs de quantités captées par le biofilm ont également été transformées en logarithme afin d'évaluer la dynamique de collage au cours du temps en fonction de la quantité de NTC apportée au départ de l'expérience et du type de NTC considéré. Des contrôles de présence de diatomées dans les deux fractions prélevées ont été réalisés. Leur nombre était toujours inférieur aux limites de quantification en cellule de Malassez.

Croissance algale

La croissance algale au cours du temps a aussi été déterminée. Pour cela, après collecte des NTC et lavages, chacun des puits a été rempli à nouveau avec 1mL de mélange SPE-1 / formaldéhyde (4%). Les biofilms ont été grattés et les quantités d'algues dénombrées en cellule de Malassez (2 comptages par puits), le nombre de cellules est alors ramené au volume initial (2.5 mL).

Visualisation de l'interaction NTC / biofilm

Les interactions entre les NTC et le biofilm ont été étudiées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Des diatomées ont été exposées à 10 mg L^{-1} de DWNTC ou de MWNTC dans les conditions similaires précédemment décrites mais après ajout d'une lamelle ronde en verre au fond des puits. Après 48h d'exposition, les échantillons ont été fixés et colorés comme décrit par Verneuil et al., (2014) avec un mélange Alcian blue (0.1%), acide acétique (0.5 M), paraformaldhéhyde (2%) et glutaraldhéhyde (2%), dans un tampon de cacodylate de sodium (0.15 M). Cette étape est suivie d'une seconde fixation de deux heures dans du cacodylate contenant du ferrocyanure de potassium (1.5%) et du tétroxyde d'osmium (1%). Après rinçage, les échantillons étaient déshydratés dans un gradient croissant d'éthanol

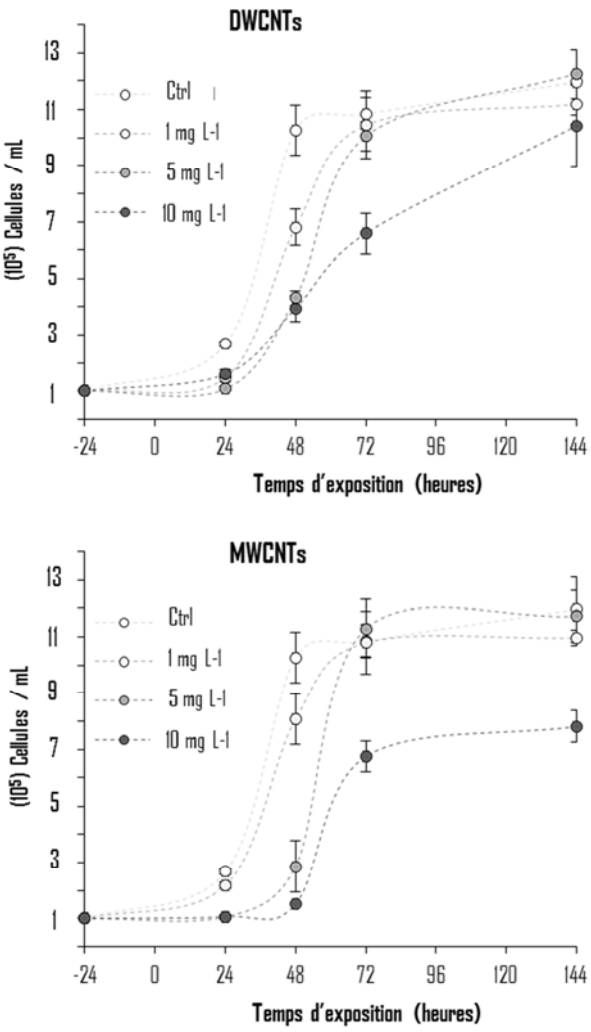


Figure 2 : Cinétique de croissance de *N. palea*. (a) dans le cas des expositions aux MWNTC et (b) des expositions aux DWNTC. Les barres d'erreurs représentent les écarts types. Les différences significatives entre les conditions et avec le témoin sont données en matériel complémentaire 1.

[50, 70, 80, 95%] pendant 10 min chacun et ensuite deux fois 15 min à [100%] avant d'être séchés sous atmosphère d'azote. Les lamelles étaient collées avec du vernis sur un plot de MEB et ombré au platine avant d'être observé en MEB (JEOL JSM-6700F, 3KV, mode de détection par électrons secondaires).

Analyses Statistiques

Les concentrations de NTC ayant inhibé 50% de la croissance après 48h d'exposition (48h-EC50) ont été estimés avec la Macro Exel® : REGTOX 7.0.3 (Copyright© 2001, Eric Vindimian, Boston, MA) utilisant un modèle de Hill. Les valeurs de l'intervalle de confiance à 95% ($CI_{95\%}$) ont été calculées à partir de simulations par ré-échantillonnages successifs (bootstrap ; n=500). Une analyse de variance (ANOVA) des valeurs de NTC calculées a été effectuée pour tester : (i) des différences significatives entre chaque fraction d'une même condition au cours du temps, (ii) les différences significatives entre les quantités captées par le biofilm pour une même concentration pour les deux types de NTC, ainsi que (iii) la comparaison des quantités de NTC en suspension et sédimentées en présence ou absence de biofilm. Les relations entre quantités de NTC apportées et quantités de NTC captées par le biofilm, ainsi que celles entre les quantités captées en fonction du temps, ont été testées par des tests de corrélation de Pearson.

Résultats et discussion

Effets des DWNTC et MWNTC sur croissance de *N. palea*

Des populations de diatomées ont été exposées à des suspensions de DWNTC et MWNTC. L'effet de ces derniers sur leur croissance a été quantifié (figure 2 et matériel supplémentaire 1 : S1). Les 48h-EC_{50} obtenues sont pour les MWNTC de 2.53 mg L^{-1} ($CI_{95\%}$ = 1.99/3.53 mg L^{-1} ; Nombre de Hill 1.225) et pour les DWNTC de 3.45 mg L^{-1} ($CI_{95\%}$ = 2.26/4.85 mg L^{-1} ; Nombre de Hill 0.518). Ces résultats indiquent que l'inhibition observée est similaire entre les deux types de NTC évalués. De plus, toutes les conditions à l'exception de $MWNTC_{10mg}$ ont rattrapé la densité des témoins en phase plateau après 144h, indiquant que les DWNTC et MWNTC causent uniquement un retard de croissance de *N. palea* comme l'ont observé différents auteurs chez les algues (Schwab et al., 2011; Verneuil et al., 2014; Youn et al., 2012). Ces résultats semblent dus à l'agglomération des NTC entre eux *via* les SPE produites par les algues. Semble responsable de la diminution des effets des NTC au cours du temps. Plus précisément, Cette agglomération pourrait avoir diminuée la surface de contact entre les NTC et les algues ainsi que la turbidité de la colonne d'eau (Wei et al., 2010).

Le fait que les diatomées exposées à $MWNTC_{10mg}$ présentent un retard de croissance plus important que celles exposées aux $DWNTC_{10mg}$ pourrait être dû à la différence d'état de dispersion entre ces deux conditions. En effet, alors que les MWNTC sont fortement dispersées et stables dans la colonne d'eau jusqu'à 10 mg L^{-1} (Figure 3e), les DWNTC ne sont dispersés que jusqu'à 1mg L^{-1} (Figure 3f). Ainsi, l'agglomération des $DWNTC_{10mg}$ entre eux a probablement fortement limité l'ombrage en comparaison des $MWNTC_{10mg}$, dont une grande partie (~70%) restait en suspension dans l'eau après 72h d'exposition (Figure 3f). Cette forte concentration de MWNTC dispersés dans la colonne d'eau aurait pu causer un ombrage accru en comparaison des DWNTC agglomérés, particulièrement à 10 mg L^{-1}, comme nous l'avons montré dans une précédente étude (Verneuil et al., 2014). La production d'SPE pourrait également avoir favorisé l'adhérence des NTC sur ces dernières. Ceci pourrait avoir limité leur potentiel abrasif (après enrobage par les SPE) et diminué la turbidité de l'eau (par captage des NTC dispersés; de Brouwer et al., 2000). Ainsi, une surproduction d'SPE lors d'expositions aux $MWNTC_{10mg}$ (fortement dispersés au départ) en comparaison des celles aux $DWNTC_{10mg}$ (auto agglomérés) est probable. Bien que conférant une protection pour les organismes (Joshi et al., 2012 Miao et al., 2009), l'énergie allouée à la surproduction d'SPE a pu diminuer celle allouée à la croissance, induisant le retard de croissance observé.

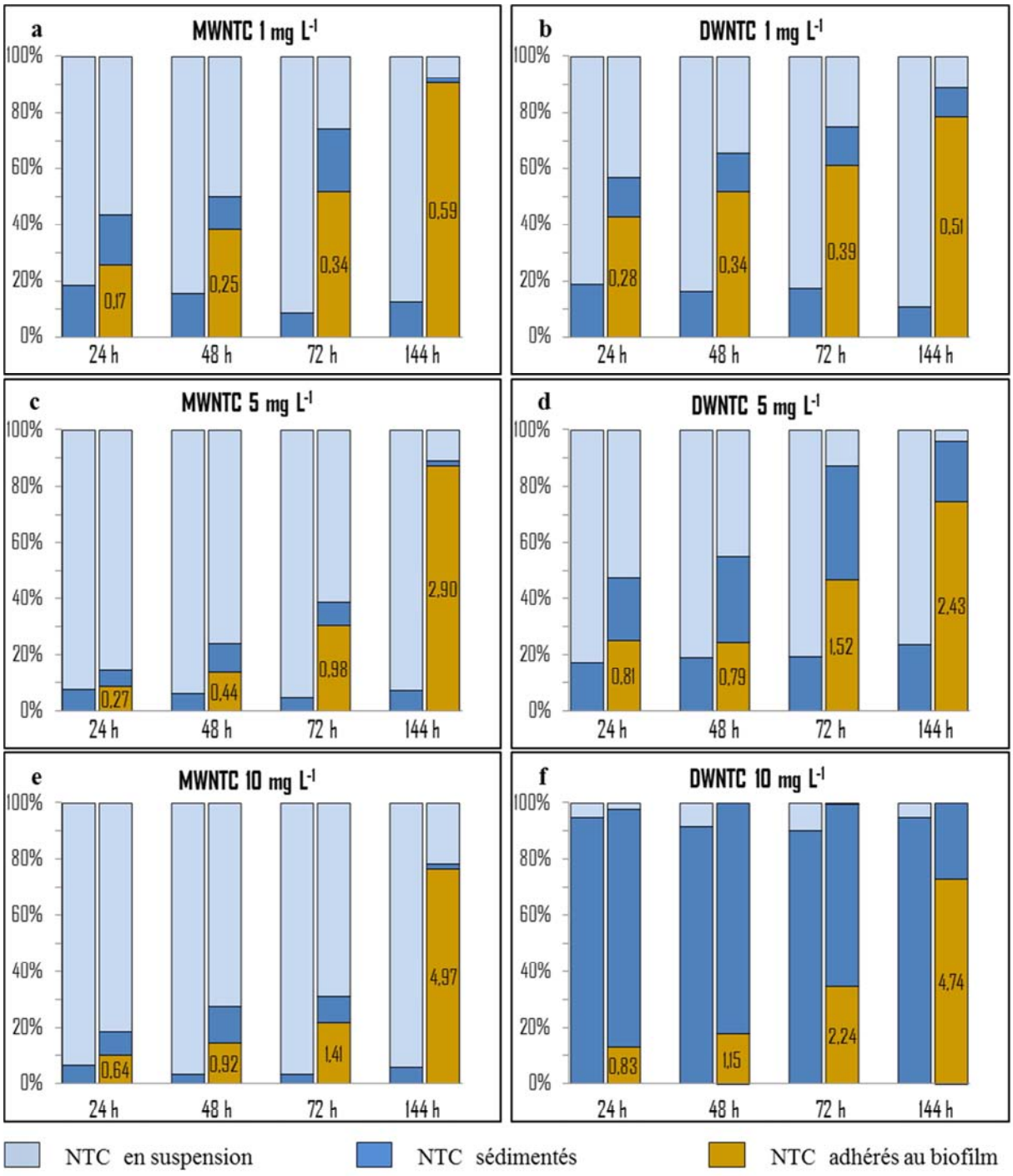


Figure 3 : Résultats de la quantification des NTC en suspension dans la colonne d'eau, sédimentés au fond et adhérés au biofilm. Dans le cas des DWNTC (a),(c),(e) et des MWNTC (b),(d),(f), respectivement pour une concentration totale de 1 mg L^{-1}, 5 mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}. Pour chaque temps, les barres de gauche présentent les résultats sans biofilm et les barres de droite, les résultats avec biofilm. Les quantités moyennes (n = 3) de NTC sont exprimées en µg cm^2 (surface totale d'un puits = 3.84 cm^2). Les concentrations inoculées par puits étaient : pour 1 mg L^{-1} = 2.5 µg (= 0.65 µg cm^2), pour : 5 mg L^{-1} = 12.5 µg (= 3.26 µg cm^2) et pour 10 mg L^{-1} = 25 µg (= 6.51µg cm^2). Les écarts types et les différences significatives sont donnés dans la section matériel Supplémentaire 2 (S2).

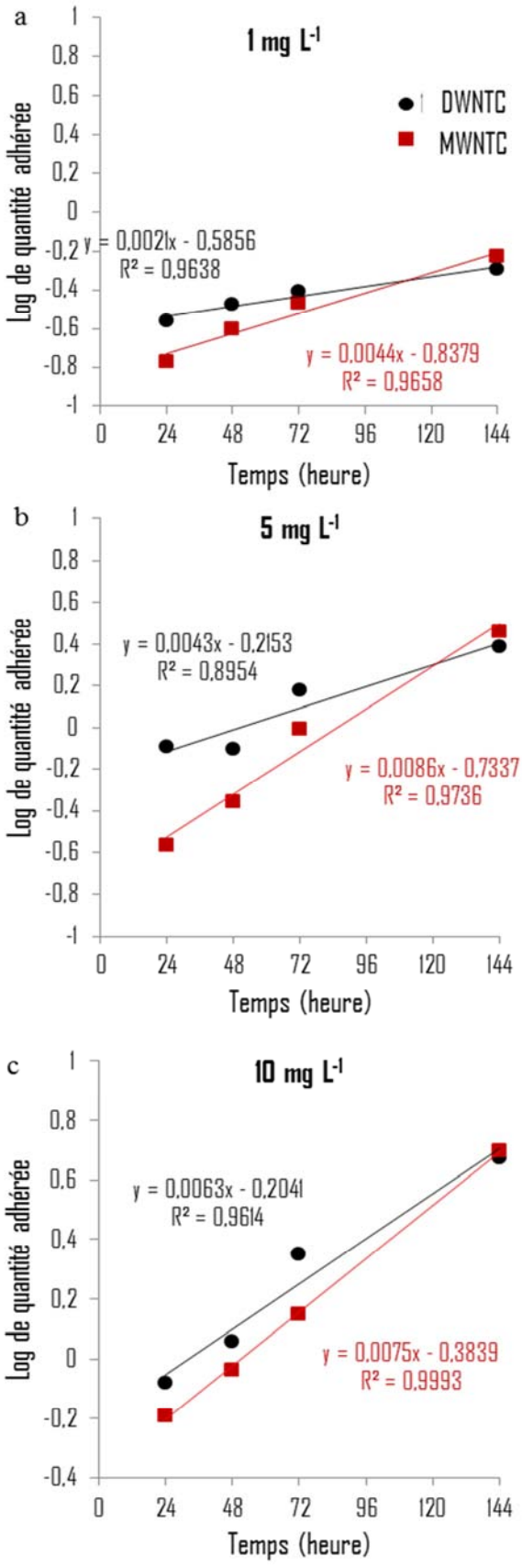


Figure 4 : Régressions linéaires basées sur les valeurs de logarithmes des quantités de NTC adhérées aux biofilm au cours du temps pour chaque type de NTC et chaque concentration testée. (a) 1 mg L^{-1}. (b) 5 mg L^{-1} et (c) 10 mg L^{-1}.

Effet du biofilm sur le comportement des NTC et cinétique d'adhérence

L'adhérence des NTC aux biofilms de *N. palea*, plus particulièrement aux SPE que cette diatomée produit, a déjà été observée (Verneuil et al., 2014). Dans cette étude, les quantités de NTC stables en suspension, sédimentés et adhérés au biofilm sont évaluées et comparés au comportement des NTC seuls dans le milieu (fig. 3 et S2).

Toutes les suspensions de MWNTC et DWNTC ont été dispersées avec 10 mg L^{-1} de MON. En l'absence de diatomée, les suspensions de MWNTC (1 mg L^{-1}, 5 mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}) sont stables sur toute la durée du test (fig. 3a, c, e). De plus, les NTC sont majoritairement suspendus dans la colonne d'eau dans le cas de $MWNTC_{1mg}$ (87.9 ± 4.9% des 2.5 µg / puits); $MWNTC_{5mg}$ (93.7 ± 1.2% des 12.5 µg / puits); $MWNTC_{10mg}$ (95.4 ± 1.6% des 25 µg / puits) et e $DWNTC_{1mg}$ (84.7 ± 4.1% des 2.5 µg / puits) ainsi que $DWNTC_{5mg}$ (80.2 ± 3.1% des 12.5 µg / puits), ces deux derniers présentant toutefois une tendance en baisse. Cette stabilité est confirmée par une absence de corrélation entre quantités présentes dans la colonne d'eau ou déposées et durée de l'expérience. (Pour MWNTC respectivement : 0.006, p = 0.97 et 0.0215, p = 0.97 ; et pour DWNTC respectivement : cor = -0.051, p = 0.77 et cor = 0.03, p = 0.86). Dès 24h, les $DWNTC_{10mg}$ avaient sédimenté en grande majorité et en moyenne, seuls 7.6 ± 2.3% des 25 µg / puits restaient en suspension durant l'expérience. Ainsi, la quantité de MON utilisée (10 mg L^{-1}) ne permettait pas de maintenir stables en suspension les $DWNTC_{10mg}$ qui avait déjà complètement sédimenté après 24h. Comme l'ont montré Zhang et al. (2012), ceci s'explique par les différences de surfaces spécifiques entre les DWNTC et les MWNTC (respectivement (980 m^2/g et 270 m^2/g).

En présence du biofilm de *N. palea*, une corrélation négative entre quantité de MWNTC sédimentés en fonction du temps est observée (cor = -0.45, p = 0.006). Cette tendance est la même dans le cas des NTC sédimentés (cor = -0.41, p = 0.001). Les tendances sont similaires avec les DWNTC en suspension (cor = -0.39, p = 0.02). Cette corrélation est en revanche non significative pour les variations des quantités de

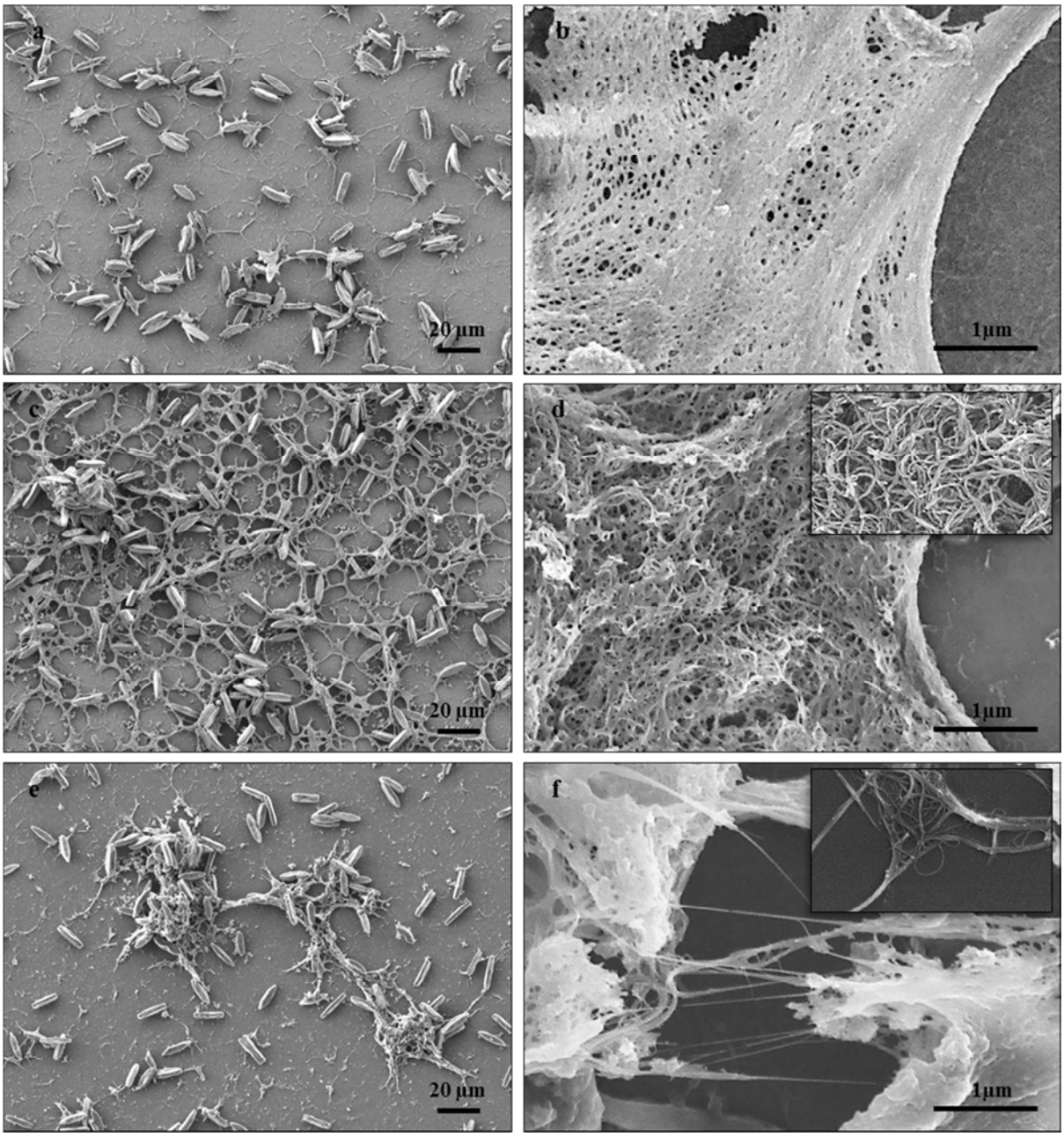


Figure 5 : Observation en Microscopie Electronique à Balayage (MEB), après fixation des SPE au bleu alcian, des cultures exposées ou non 48h aux NTC. (a) Biofilm control de *N. palea* cultivé seul : (a) vue générale et (b) détail des SPE. Biofilm exposé à $MWNTC_{10\ mg}$: (c) vue générale (d) détail de l'interaction EPS / MWNTC. Biofilm exposé à $DWCNT_{10\ mg}$: (c) vue générale (d) détail de l'interaction EPS / DWNTC. Les encadrés dans (d) et (f) présentent les NTC respectifs seuls.

DWNTC déposées (cor = -0.26 p = 0.125). Ce dernier résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'une majorité de NTC ont sédimenté indépendamment de la présence de biofilm, comme discuté plus haut. Parallèlement, la quantité de NTC adhérée au biofilm est fortement corrélée avec le temps d'exposition et leur concentration initiale, quelle que soit la nature des NTC : MWNTC (respectivement : cor = 0.69, $p < 0.001$ et cor = 0.48, p = 0.003) ou DWNTC (respectivement : cor = 0.61, $p < 0.001$ et cor = 0.61, $p < 0.001$). De plus, les figures 3 et 4 montrent que les quantités de DWNTC adhérées au biofilm sont plus importantes que celles des MWNTC après 24h d'exposition. De plus les pentes présentés en figure 4 montrent que l'efficacité de captage dans le temps est supérieure dans le cas des fortes concentrations en NTC. A la fois la moins bonne dispersion des DWNTC par la MON comparée à celle des

MWNTC ainsi que la plus grande fréquence de contact entre les NTC et le biofilm peuvent expliquer ce phénomène. Ainsi, alors que l'adhérence des MWNTC se fait de façon progressive à mesure de leur passage à proximité du biofilm, celle des DWNTC pourrait être liée à une sédimentation de petits agglomérats de DWNTC sur le biofilm au fond des puits. Toutefois, les quantités similaires de NTC adhérés au biofilm pour $DWNTC_{10mg}$ et $MWNTC_{10mg}$ ne permettent pas de confirmer cette hypothèse mais pourrait indiquer que les deux mécanismes sont impliqués de façon plus ou moins importante en fonction de l'état de dispersion des NTC.

Un autre résultat intéressant est que les quantités captées après 144h sont très similaires entre les deux types de NTC pour une même concentration. Le captage présente une courbe à tendance exponentielle, alors que la courbe de croissance du biofilm est clairement sigmoïde. Ceci pourrait indiquer une production continue d'SPE au cours du temps, y compris en phase plateau de croissance, comme cela a été montré chez différentes espèces de diatomées (De Brouwer et al., 2002 ; De Brouwer and Stal, 2002). Ainsi l'adhérence des NTC sur le biofilm ne serait pas uniquement fonction du nombre de cellules, mais aussi dépendante de la production de SPE.

Interaction des DWNTC et MNTC avec les SPE

Les observations en MEB mettent en avant une interaction des MWNTC et des DWNTC avec les SPE produits par *N. palea* (fig. 5). Les MWNTC adhérent aux SPE sans en déstructurer l'allure générale. En revanche, les DWNTC semblent s'agglomérer au biofilm en déstructurant fortement le réseau de SPE. Les DWNTC sont de plus fortement enrobés par les SPE. Ils sont également regroupés en amas, alors que les MWNTC semblent déposés à leur surface (fig. 5c-f). Ces résultats indiquent que les MWNTC, bien dispersés, adhérent individuellement au , majoritairement composées de protéines et de glucides, pourraient protéger les NTC vis-à-vis des défenses immunitaires des organismes et ainsi en faciliter l'entrée dans les organismes, biofilm. En revanche, dans le cas des DWNTC, ce sont leurs agglomérats qui viennent s'y fixer. Ces agglomérats semblent avoir fortement déstructuré le réseau des SPE ou du moins en gêner la mise en place naturelle. Compte tenu de la forte internalisation des DWNTC dans la matrice d'SPE (fig. 5f), un arrachage partiel de DWNTC provenant des agglomérats, favorisé par le mouvement produit par l'agitation est envisageable. La grande surface spécifique des DWNTC a également pu favoriser cet enrobage par les SPE. Enfin les images révèlent un recouvrement total des SPE par les MWNTC après 48h d'exposition. Ceci semble indiquer qu'une grande quantité des sites présents est recouverte et que l'augmentation des quantités captées au cours du temps résulte bien d'une interaction EPS-NTC associée à une production continue de SPE.

Implications environnementales et perspectives éco-toxicologiques

Les modèles prédisent une forte accumulation des NTC et globalement des NP dans les sédiments (Gottschalk et al., 2013). Une étude récente menée en mésocosmes aquatiques sur une période d'un an a de plus montré que les NTC se concentrent spécifiquement en surface du sédiment (Schierz et al., 2014). Ici, les résultats indiquent clairement que les biofilms se développant à la surface des sédiments et de divers autres substrats pourraient être responsables de ce phénomène. Ainsi, le biofilm pourrait limiter la migration en profondeur des NTC dans les sédiments. Cette présence en surface ou à faible profondeur pourrait de plus fortement augmenter les doses auxquelles les organismes benthiques vivant dans le biofilm et/ou le consommant pourraient être exposés, en comparaison avec des organismes pélagiques ou planctoniques vivant dans la colonne d'eau. L'interaction avec le biofilm, et plus particulièrement les SPE, pourrait également modifier l'état des NTC. Enrobés comme on le voit dans la figure 5, les SPE

tout en modifiant leurs effets (Mu et al., 2014; Tenzer et al., 2013). Cet enrobage des NTC avec les SPE nourrissant de nombreux organismes pourrait également favoriser leur ingestion lors

du broutage par les consommateurs primaires. Cela pourrait mener à une « bio-disponibilisation » des NTC pour leurs organismes prédateurs, augmentant fortement le risque de transfert des NTC vers les maillons supérieurs de nombreuses chaînes trophiques aquatiques.

Les NTC sont connus pour adsorber de nombreuses molécules toxiques et pesticides (Tuzen et al. 2008 ; Wang et al., 2007; Yan et al., 2006). Une concentration de NTC contaminés par divers toxiques pourrait également augmenter les concentrations d'exposition pour les organismes consommant le biofilm ou vivant à l'intérieur de celui-ci. Ainsi l'étude des effets de NTC en présence de pesticides et autres polluants pourrait être l'étape suivante dans l'évaluation des effets des NTC en condition environnementales.

Conclusion

Cette étude montre qu'un biofilm de *N. palea* peut capter de grandes quantités de NTC, indépendamment de leur nature ou de leur état de dispersion, avec une efficacité allant de 70% à plus de 90% après 6 jours d'exposition à 1 mg L^{-1}, 5mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}. De plus, cette étude montre que les biofilms peuvent fortement diminuer la stabilité de suspensions de NTC, *via* un captage et une agglomération importante de ces derniers par les SPE produites par *N. palea*. Ces informations vont pouvoir servir à l'évaluation et la compréhension de la répartition et éventuellement des transferts des NTC dans les milieux aquatiques et le long des chaînes trophiques en place dans ces écosystèmes. Cette étude apporte également un élément de réponse robuste pour expliquer la diminution souvent rapportée des effets des NTC sur les microorganismes photosynthétiques au cours du temps. Comme souvent évoqué dans la littérature, elle met également en avant le risque d'une exposition accrue des organismes benthiques aux NTC et probablement de nombreuses autres NPS. Du fait de la forte accumulation par les NTC de divers pesticides, un effet cumulé et accru de ces derniers et des NTC pourrait également être envisageable.

Références

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015. Toxicity of CeO2 nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. Chemosphere 120, 230–236.doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.012

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 203. Springer New York, New York, NY, pp. 87–103.

De Brouwer, J.F.., Bjelic, S., de Deckere, E.M.G.., Stal, L.., 2000. Interplay between biology and sedimentology in a mudflat (Biezelingse Ham, Westerschelde, The Netherlands). Continental Shelf Research 20, 1159–1177. doi:10.1016/S0278-4343(00)00017-0

De Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., 2002. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms Cylindrotheca closterium and Nitzschia sp. (Bacillariophyceae)1. Journal of Phycology 38, 464–472 doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01164.x

De Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Stal, L.J., 2002. Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. European Journal of Phycology 37, 37–44. doi:10.1017/S0967026201003419

Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes Chemical Communications 1442. doi:10.1039/b301514a

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. doi:10.1038/nrmicro2415

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. Environmental Pollution 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Joshi, N., Ngwenya, B.T., French, C.E., 2012. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. Journal of Hazardous Materials 241-242, 363–370. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057

Köhler, A.R., Som, C., Helland, A., Gottschalk, F., 2008. Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. Journal of Cleaner Production 16, 927–937. doi:10.1016/j.jclepro.2007.04.007

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. Environmental Science & Technology 46, 8458–8466. doi:10.1021/es301802g

Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environmental Pollution 157, 3034–3041. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.047

Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. Chemical Reviews 140613144559008. doi:10.1021/cr400295a

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O'Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., Chen, K.L., 2011. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. Environmental Science & Technology 45, 9837–9856. doi:10.1021/es201579y

Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T.,

Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. Environ. Sci.: Nano. doi:10.1039/C4EN00063C

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae

Caused by Shading and Agglomeration? Environmental Science & Technology 45, 6136–6144. doi:10.1021/es200506b

Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S.K., Stauber, R.H., 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nature Nanotechnology 8, 772–781. doi:10.1038/nnano.2013.181

Tuzen, M., Saygi, K.O., Usta, C., Soylak, M., 2008. Pseudomonas aeruginosa immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions. Bioresource Technology 99, 1563–1570. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.013

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea* : "A sticky story." Nanotoxicology 1–11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (Environment and biota): General considerations and conceptual casestudies. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 32–49. doi:10.1002/etc.723

Wang, S., Zhao, P., Min, G., Fang, G., 2007. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry.

Journal of Chromatography A 1165, 166–171. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.061

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, Dunaliella tertiolecta. Aquatic Toxicology 100, 194–201.

doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.001

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds.), 1999. Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Yan, H., Gong, A., He, H., Zhou, J., Wei, Y., Lv, L., 2006. Adsorption of microcystins by carbon nanotubes. Chemosphere 62, 142–148. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.075

Youn, S., Wang, R., Gao, J., Hovespyan, A., Ziegler, K.J., Bonzongo, J.-C.J., Bitton, G., 2012. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: P*seudokirchneriella*

subcapitata. Nanotoxicology 6, 161–172. doi:10.3109/17435390.2011.562329

Zhang, S., Shao, T., Kose, H.S., Karanfil, T., 2012. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 79–85. doi:10.1002/etc.724

Matériels supplémentaires

S1: résultats des tests de Holm-Sidak sur les croissances, entre chaque condition et pour un temps donné d'exposition. (a) après 24h, (b) après 48h, (c) après 72h et (d) après 144h. Les différences significative étaient marquées * p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,001. Les valeurs en rose sont celles des résultats des tests de comparaisons entre les deux NTC pour une même concentration.

(a)

24 h	$DWNTC_{1mg}$	$DWNTC_{5mg}$	$DWNTC_{10mg}$	$MWNTC_{1mg}$	$MWNTC_{5mg}$	$MWNTC_{10mg}$
Ctrl	***	***	***	***	***	***
$DWNTC_{1mg}$		***	0,57	***	***	***
$DWNTC_{5mg}$			***	***	0,99	0,93
$DWNTC_{10mg}$				***	***	***
$MWNTC_{1mg}$					***	***
$MWNTC_{5mg}$						0,99

(b)

48 h	$DWNTC_{1mg}$	$DWNTC_{5mg}$	$DWNTC_{10mg}$	$MWNTC_{1mg}$	$MWNTC_{5mg}$	$MWNTC_{10mg}$
Ctrl	***	***		**	***	***
$DWNTC_{1mg}$		***	0,73	0,14	0,08	***
$DWNTC_{5mg}$			***	***	***	***
$DWNTC_{10mg}$				***	0,22	**
$MWNTC_{1mg}$					***	***
$MWNTC_{5mg}$						0,12

(c)

72 h	$DWNTC_{1mg}$	$DWNTC_{5mg}$	$DWNTC_{10mg}$	$MWNTC_{1mg}$	$MWNTC_{5mg}$	$MWNTC_{10mg}$
Ctrl	0,99	0,98		0,94	0,99	***
$DWNTC_{1mg}$		0,99	**	0,99	0,98	**
$DWNTC_{5mg}$			**	***	0,84	**
$DWNTC_{10mg}$				***	***	0,99
$MWNTC_{1mg}$					0,99	***
$MWNTC_{5mg}$						***

(d)

144 h	$DWNTC_{1mg}$	$DWNTC_{5mg}$	$DWNTC_{10mg}$	$MWNTC_{1mg}$	$MWNTC_{5mg}$	$MWNTC_{10mg}$
Ctrl	0,99	0,99	0,82	0,98	0,95	***
$DWNTC_{1mg}$		0,98	0,99	0,99	0,9	*
$DWNTC_{5mg}$			0,6	0,99	0,99	***
$DWNTC_{10mg}$				0,99	0,93	0,13
$MWNTC_{1mg}$					0,99	*
$MWNTC_{5mg}$						**

S2 : Concentrations moyennes de NTC en µg / cm^2 de colonne d'eau. Dans le cas de : (a) MWNTC seuls, (b) DWNTC seuls, (c) DWNTC en présence de biofilm et (d) MWNTC en présence de biofilm. Les groupes d'une même ligne ne présentant aucune lettre en commun sont significativement différents (p = 0,05). ET = Ecart Type. Les flèches à droite présentent les tendances générales au cours de l'expérience pour chaque condition.

(a)

MWNTC seuls	24h Moyenne	ET		48h Moyenne	ET		72h Moyenne	ET		144h Moyenne	ET	
$1mg_{sus}$	0,53	0,06	a	0,60	0,01	a	0,59	0,02	a	0,57	0,02	a
$1mg_{sed}$	0,12	0,07	a	0,11	0,06	a	0,06	0,02	a	0,08	0,06	a
$5mg_{sus}$	3,02	0,07	a	3,06	0,05	a	3,10	0,06	a	3,02	0,07	a
$5mg_{sed}$	0,23	0,05	a	0,19	0,07	a	0,15	0,01	a	0,23	0,02	a
$10mg_{sus}$	6,11	0,02	a	6,30	0,15	a	6,30	0,03	a	6,14	0,17	a
$10mg_{sed}$	0,40	0,10	a	0,21	0,08	a	0,21	0,02	a	0,37	0,15	a

(b)

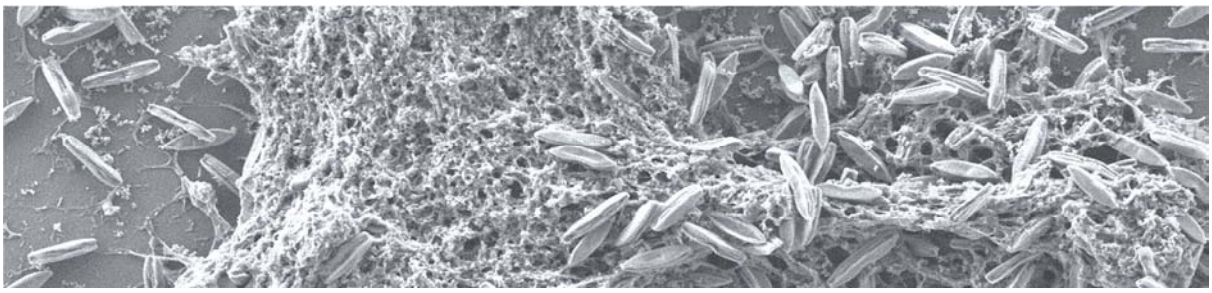
DWNTC seuls	24h Moyenne	ET		48h Moyenne	ET		72h Moyenne	ET		144h Moyenne	ET	
$1mg_{sus}$	0,53	0,14	a	0,57	0,05	a	0,53	0,02	a	0,58	0,06	a
$1mg_{sed}$	0,12	0,09	a	0,11	0,08	a	0,11	0,07	a	0,07	0,04	a
$5mg_{sus}$	2,70	0,05	a	2,64	0,04	a	2,63	0,07	a	2,47	0,38	a
$5mg_{sed}$	0,55	0,04	a	0,61	0,05	a	0,63	0,10	a	0,76	0,46	a
$10mg_{sus}$	0,36	0,06	a	0,58	0,04	a	0,66	0,36	a	0,37	0,07	a
$10mg_{sed}$	6,15	0,14	a	5,93	0,06	a	5,84	0,08	a	6,14	0,08	a

(c)

DWNTC + *N. palea*	24h Moyenne	ET		48h Moyenne	ET		72h Moyenne	ET		144h Moyenne	ET	
$1mg_{sus}$	0,29	0,11	a	0,23	0,03	a	0,20	0,10	a	0,07	0,02	a
$1mg_{sed}$	0,09	0,10	a	0,09	0,06	a	0,05	0,02	a	0,07	0,04	a
$1mg_{BF}$	0,27	0,09	a	0,34	0,08	a	0,40	0,08	a	0,51	0,03	a
$5mg_{sus}$	1,72	0,22	a	1,47	0,16	a	0,43	0,25	b	0,14	0,09	b
$5mg_{sed}$	0,73	0,13	a	1,00	0,28	a	1,31	0,42	a	0,69	0,15	a
$5mg_{BF}$	0,81	0,11	a	0,79	0,14	a	1,52	0,10	b	2,43	0,11	c
$10mg_{sus}$	0,16	0,05	a	-0,01	0,01	a	0,02	0,03	a	0,00	0,01	a
$10mg_{sed}$	5,52	0,23	a	5,37	0,05	a	4,23	0,45	b	1,77	0,25	c
$10mg_{BF}$	0,83	0,15	a	1,15	0,07	a	2,24	0,19	b	4,74	0,23	c

(d)

MWNTC + *N. palea*	24h Moyenne	ET		48h Moyenne	ET		72h Moyenne	ET		144h Moyenne	ET	
$1mg_{sus}$	0,41	0,06	a	0,29	0,02	a	0,17	0,06	ab	0,05	0,02	b
$1mg_{sed}$	0,13	0,05	a	0,07	0,04	a	0,15	0,04	a	0,01	0,03	a
$1mg_{BF}$	0,17	0,10	a	0,25	0,02	ab	0,34	0,05	ab	0,59	0,07	b
$5mg_{sus}$	2,79	0,04	a	2,48	0,00	a	1,40	0,04	b	0,38	0,03	c
$5mg_{sed}$	0,19	0,12	a	0,34	0,02	a	0,18	0,03	a	0,06	0,03	a
$5mg_{BF}$	0,27	0,13	a	0,44	0,00	a	1,67	0,05	b	2,90	0,03	c
$10mg_{sus}$	5,31	0,11	a	4,72	0,13	a	4,50	0,01	b	1,44	0,15	c
$10mg_{sed}$	0,56	0,15	a	0,87	0,20	b	0,60	0,12	a	0,10	0,01	c
$10mg_{BF}$	0,64	0,24	a	0,92	0,11	b	1,41	0,15	c	4,97	0,16	d



CHAPITRE 5

LES SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRES : UNE PROTECTION CONTRE LES NANOTUBES DE CARBONE ?

Contexte

Les deux chapitres précédents ont montré que : (i) les CNT inhibaient la croissance de *N. palea* sans induire de toxicité et que (ii) les CNT interagissaient fortement avec le biofilm et se liaient de façon préférentielle avec les EPS, et enfin, (iii) que les quantités de NTC adhérées au biofilm augmentaient au fur et à mesure de la durée d'exposition.

Il était suggéré que cette forte interaction entre les NTC et les SPE permettait une séquestration des NTC, réduisant ainsi leur contact direct avec les cellules et leurs effets au cours du temps.

La présente étude s'est intéressée à l'effet de DWNTC sur la même espèce de diatomée. Son but était d'apporter des éléments de comparaison sur la toxicité des deux types de NTC évalués dans cette thèse (DWNTC et MWNTC). Il était également d'évaluer l'effet de DWNTC sur la réponse de *N. palea* en termes de production de SPE. La finalité était l'évaluation de la contribution d'une surproduction de SPE dans l'inhibition de croissance observée (approche quantitative). Une attention particulière a également été portée sur le type d'interaction entre les SPE et le DWNTC via des extractions différentielles (fractions faiblement liées, liées par des liaisons hydrophobes et par des ponts ioniques ; approche qualitative).

Résultats marquants et conclusions

Cette étude a permis de mettre en avant la surproduction de SPE par *N. palea* en réponse à la présence de DWNTC. Il est supposé que cette surproduction constituait un compromis énergétique (Trade-off) réalisé par la diatomée, qui pourrait expliquer le retard de croissance observé en cas d'exposition aux NTC. Plus précisément, l'hypothèse formulée est que *N. palea* peut privilégier une allocation énergétique orientée vers la surproduction de SPE, plutôt que sur sa division en cas d'exposition à des NTC. La finalité de cela pourrait être la fuite, la séquestration des NTC et/ou l'éclaircissement de la colonne d'eau. Cette réponse pourrait constituer un élément important dans la compréhension des mécanismes causant le retard de croissance généralement observé chez les algues. Elle met également en avant le potentiel avantage adaptatif que représente la production de SPE face aux particules tel que les NTC.

Enfin, ces travaux ont mis en avant la nature majoritairement hydrophobe des interactions entre les SPE et les DWNTC. Une interaction mécanique (principe du filet) entre les SPE et les NTC est également envisageable et pourrait également favoriser l'adhérence.

Cette étude a abouti à la rédaction d'un article, accepté dans la revue Carbon :

Double-walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptive issue

Laurent Verneuil, Jérôme Silvestre, Irina Randrianjatovo, Claire-Emmanuelle Romain-Marcato, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Florence Mouchet, Emmanuel Flahaut, Laury Gauthier & Eric Pinelli

DOI : 10.1016/j.carbon.2015.02.053

Double-walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptive issue

Laurent Verneuil[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Irina Randrianjatovo[4], Claire-Emmanuelle Romain-Marcato[4], Elisabeth Girbal-Neuhauser[4], Florence Mouchet[1,2,3], Emmanuel Flahaut[5,6], Laury Gauthier[1,2,3] & Eric Pinelli[1,2,3]

[1]EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, INP, UPS, Université´ de Toulouse; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France
[2]CNRS; EcoLab; Castanet Tolosan, France,
[3]Laboratoire Commun NAUTILE (CNRS, UPS, INPT, ARKEMA), Laboratoires EcoLab, CIRIMAT, GRL, France
[4]LBAE, (Laboratoire de Biotechnologies Agro-alimentaire et Environnementale,Université de Toulouse, UPS EA 4565, Institut Universitaire de Technologie, 24 rue d'Embaquès, 32000 Auch, France
[5]Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France,
[6]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France

Abstract

The present study assessed the effects of double-wall carbon nanotubes (DWCNTs) dispersed in the presence of a realistic concentration of natural organic matter (NOM, 10mg.L^{-1}) on the benthic diatom *Nitzschia palea u*sing toxicity tests and quantitative/qualitative extracellular polymeric substances (EPS) assays. No toxic effect was observed. A growth delay was measured after 48 h of exposure to concentrations of DWCNTs ranging from 1mg.L^{-1}(~ 29%) to 50mg.L^{-1}(~ 84%) for an EC_{50} of 7.5mg.L^{-1}. Extracellular carbohydrates and proteins were extracted using a sequential multi-methods protocol to collect soluble, hydrophobic and ion-bridged extracellular polymeric substances (EPS). Extracted EPS were analyzed by colorimetric assays and size exclusion chromatography. The results highlighted a higher EPS concentration in exposed cultures that was primarily caused by an overproduction of protein-like polymers (protein or glycoproteins, PLPs). Such EPS overproduction and increase in the proteins/carbohydrates ratio can partially explain the observed growth inhibition. EPS were preferentially extracted using hydrophobic conditions and were mainly composed of PLPs with either low (10kDa) or high (174kDa) molecular weights. These data highlights the affinity between DWCNTs and EPS, which is primarily driven by both physical and hydrophobic interactions. This indicates that *N. palea* can respond to DWCNTs by forming an EPS network optimized for adhering to and efficiently wrapping DWCNTs.

Correspondance: Eric Pinelli, Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), Université de Toulouse; INP-ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, France.
Tel: +33 5 62 19 39 45. Fax: +33 5 62 19 39
E-mail: pinelli@ensat.fr

1 Introduction

After more than two decades of research and improvements in production processes, manufactured carbon nanotubes (CNTs) have found many applications in various fields. CNTs are already used in electronics, semiconductors, chemicals, polymers, batteries, capacitors, energy, medical, composites, aerospace and defense [1,2]. They are generally grouped into two classes: single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Among the latter, double-wall carbon nanotubes (DWCNTs) are composed of only two walls, which confer to them intermediate properties [3]. Although their production remains lower than that of MWCNTs, DWCNTs present great interest to high-tech industries that supply nanoprobes or develop composite reinforcements, energy storage media, displays, touch screens, and other electronic devices [4] They are also of particular interest for biomedical applications [5,6]. Considering their increased uses, sooner or later CNTs will be present in substantial concentrations in the environment [7] and especially in aquatics ecosystems, which are known to concentrate many contaminants. CNTs are presumed to be non-degradable in aqueous environments [8,9] or only slightly in the presence of specific bacterial species and after long term exposure [10]. Thus, CNTs, similar to other carbonaceous nanomaterial such as fullerenes, graphene and diamonds, might remain for prolonged periods of time and strongly accumulate in aquatic media. This makes CNTs particular interesting in the study of the effects of nanostructures on organisms. However, due to the strong physical interactions of CNTs with organisms, their interference with assays or labeling, and their strong light absorption, it is difficult to assess the effect of CNTs or to identify involved mechanisms using standard toxicological assays [11,12]. Although not properly a toxic effect, the shading of photosynthetic organisms that CNTs can cause at high concentrations can also increase the globally observed inhibition of growth, especially in the case of strong adherence to organisms [13–15]. The dispersion of organic compounds such as organic matter also alters the aggregation behavior of nanoparticles in surface water and potentially their interaction with organisms [16]. An underestimation of CNTs properties and dispersion can lead to the misestimating of real toxic effects. Several recent studies point in that direction, highlighting an increased or mitigated effect of CNTs when dispersed by organic compounds such as natural organic matter (NOM) [15,17–19]. This emphasizes the importance of testing the effects of nanoparticles in environmentally relevant conditions.

Low depth aquatic environments are colonized by many benthic microorganisms that form biofilms. At the base of aquatic food chains, these organisms play a key role for many primary consumers. Numerous benthic aquatic microorganisms produce extracellular polymeric substances (EPS). These EPS are mainly composed of carbohydrates and proteins and have different roles in the environment. They are primarily used by benthic microorganisms for their aggregation and grip to substrates. This feature is known to play an important role for sediment aggregation in natural environments driven by EPS production [20,21]. The mesh formed by these EPS also allows for the retention of exo-enzymes or cellular metabolites and nutrient sequestration from the aquatic environment [24]. They may be partially recycled by organisms using it as a nutrient storage area [25]. Finally, they provide protection against different biocides [22,23], and against nanoparticles or ions that they release [26,27]. Among benthic photosynthetic microorganisms, diatoms often represent the main component of photo-autotrophic biofilms and are ubiquitous in low depth aquatic environments. This makes them responsible for more than 25% of the worldwide primary production [28]. Moreover, diatoms possess a silicified cell wall called a frustule, which confers protection against environmental dangers such as abrasion [29]. The frustule of some species also presents nano-metric pores which can partially or completely prevent the internalization of nanoparticles [27,30]. These features make them of particular

interest for toxicity tests and understanding toxicity mechanisms [31].

In a previous study [27] we highlighted the strong interaction between multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and the extracellular polymeric substances (EPS) produced by the benthic diatoms Nitzschia palea (Kützing) W.Smith (N. palea). It was hypothesized that EPS conferred an efficient protection against MWCNTs to benthic diatoms and that an energetic trade-off could be made by N. palea by switching energetic allocation from growth to protection via EPS production. This could explain the growth inhibition often measured only at early stages of exposure [14,27]. In this study, the toxicity of DWCNTs dispersed by an environmentally relevant amount of NOM (as it commonly happens in rivers and lakes) on the common freshwater diatom N. palea was assessed, focusing on growth inhibition, viability and the photochemical quantum yield of photosystem II. This work was also interested in how the presence of DWCNTs can affect EPS production, focusing on the secretion of proteins and carbohydrates and using both colorimetric assay and size exclusion chromatography. Finally, the nature of the interaction between DWCNTs and EPS were specified using a sequential extraction protocol enabling the distinct disruption of weak bounds, hydrophobic bonds, and ionic bridges.

2 Experimental Methods

2.1 Diatoms strain and cultures

The axenic benthic diatom N*itzschia palea* (CPCC-160; *N. palea*) was purchased from the Canadian phycological culture center (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada). Cultures were grown in CHU n°10 basic medium (CHU10; 6.4<pH<6.6; http://uwaterloo.ca/canadian-phycologicalculture-centre/cultures/culture-media/chu-10).

All bioassays were performed in a growth room at 20 ± 1°C on a rotary shaker at 90 rpm under a light/dark regime of 16 h / 8 h provided by high pressure sodium lamps (VIALOX® NAV® (SON) SUPER 4Y®, 600W, OSRAM GmbH) with an luminous intensity of 1300 cd. The media was always renewed 72 h before the experiments

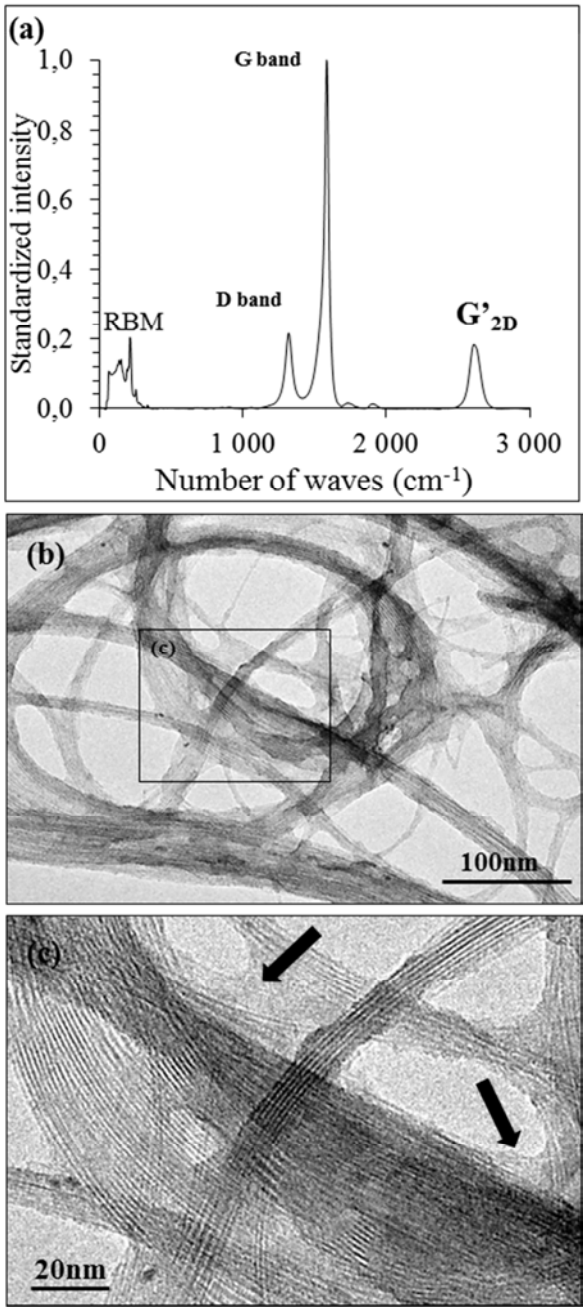


Figure 1 : (a) Raman spectra of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). In the upper right, the D-band is normalized with respect to the intensity of the G-band intensity of the same spectra. (b) General transmission electronic microscopy (TEM) view of DWCNTs after drying the DWCNTs suspension (10mg L^{-1}) dispersed with natural organic matter (NOM; 10mg L^{-1}). (c) A magnified view of (b) highlighting the affinity of NOM for DWCNTs. Arrows indicate the presence of NOM. Images of DWNTC without NOM are given in Supplementary material 1.

and prior to preparing the inoculum. All manipulations during the experiments were carried out under a class II microbiological safety cabinet (Faster BHA 36, Faster s.r.l, Cornaredo, MI, Italy).

2.2 Natural organic matter and DWCNT suspensions

Suwannee River natural organic matter (NOM) (Cat No. 1R101N) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS, St. Paul, MN, USA). Prior the beginning of the experiments, NOM was hydrated with CHU10 for one hour before being filtered (0.1-µm; Minisart high flow polyethersulfone membrane; SARTORIUS-STEDIM biotech).

DWCNTs were synthetized at the Inter-University Center for Research and Materials Engineering (Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France) by CCVD synthesis. The CNTs fraction contained DWCNTs (~80%), SWCNTs (~15%), and MWCNTs (~5%) [3]. Their length was between 1 and > 100µm with an outer diameter of between 1 and 3nm (determined by transmission electron microscopy) for a surface area of 980 m^2/g (determined using Brunauer, Emmett and Teller theory). The samples exhibited a Raman spectroscopy Id / Ig ratio of 0.24 ± 0.05 in (Fig. 1a; ± indicates the standard deviation; Horiba Jobin Yvon LabRAM HR800 Raman micro-spectrometer at 633nm, red laser excitation, He/Ne). The dry sample was composed (mass fraction) of carbon (92.13 ± 0.46%) cobalt (3 ± 0.15%), molybdenum (0.9 ± 0.04%) and iron (0, 04 ± 0.004%) [32].

Four DWCNTs suspensions (0.167 mg L^{-1}, 1.67 mg L^{-1}, 16.7 mg L^{-1}, 83.5 mg L^{-1}) were made using CHU10 from a stock suspension which was first sonicated for 1 hour (BRANSON digital sonifier S-250D; 200 W; amplitude: 35% 5 s/2 s). NOM (16.7 mg L^{-1}) followed by addition of the DWCNTs suspensions, which were then sonicated again for 20 min. These solutions were diluted in culture or CHU10 to obtain exposure concentrations of 0.1 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1} and 50 mg L^{-1} of DWCNTs and 10 mg L^{-1} of NOM. At this environmentally relevant concentration [33], NOM strongly coated both the individual and bundled DWCNTs (figure 1b-c). As assessed by optical density, the suspensions appeared stable for 0.1 mg L^{-1} to 1 mg L^{-1} while sedimentation occurred quickly from 10 mg L^{-1} (<1 h). Sonication did not cause disruption of the DWCNTs (determined by TEM and Raman analyses; Figure 1a, 1c). The main part of the metallic nanoparticles were from the catalyst and were encapsulated in a carbon shell or directly embedded in DWCNTs. The detectable CHU10-soluble metallic residues released by $DWCNTs_{50mg}$ after 48 h were cobalt (33.56 ± 0.18 µg L^{-1}), molybdenum (222.78 ± 1.85 µg L^{-1}) and Iron (176.41 ± 43.3 µg L^{-1}), (inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS; Agilent-7500ce, Agilent Technologies, Palo, CA).

2.3 Growth and toxicity tests

2.3.1 Exposure strategy

The toxicity of DWCNTs was assessed by determining the effects on growth, photochemical quantum yield of photosystem II, and viability. These tests were carried using the same device as in [27]. Briefly, two stacked 12-well plates allowed for the assessment of the total exposure effect, providing an estimation of shading using DWCNTs suspensions as external filters. Lower plates were inoculated with 1 mL per well of *N. palea* suspensions (2.5 10^5 cells/ml) and were grown for 24h in culture conditions but without shaking. This step allowed the diatoms to adhere, recover their growth and reach the exponential phase. Then, the bottom wells were filled with DWCNTs suspensions (1.5 mL), obtaining final DWCNTs concentrations of 0.1 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1} and 50 mg L^{-1} or with CHU10+NOM for controls and shading tests. Upper plates were prepared following the same protocol but the wells were filled using CHU10+NOM for exposure tests and with DWCNTs suspensions for shading tests, which used external light filters. The rest of the wells were filled with CHU10 to obtain the same final volume in each well. One plate per condition was prepared for the control and for exposure to each concentration of DWCNTs.

2.3.2 Growth tests

Shading caused by DWCNTs was assessed by

measuring photosynthetically active radiation (PAR; Li-250A light meter equipped with Li-COR Quantum sensor; Li-COR Biosciences, San Diego, CA) under the upper plates of the shaded plates at the beginning of the test. At 48h and 144h, 3 wells per plates were scraped, sampled and fixed in formaldehyde 3.6 %. The algal concentrations were determined using a Malassez cell counter performing two counts per well. Significant differences between conditions were determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD post-hoc tests using the statistical open source software "R" (SSR; R Development Core team 2012, Bio-RAD, Charlottesville, VA). At 48h of exposure during exponential growth of control cultures, the effective concentrations of 50% (EC_{50}) were determined with the Excel® macro REGTOX 7.0.3 (copyright© 2001, Eric Vindimian) using the Hill model. The 95% confidence intervals for the EC_{50} values were calculated by bootstrap simulations (n=500). The correlation between PAR and growth inhibition was assessed using Pearson's correlation test.

2.3.3 Viability tests

The lethal effect of CNTs was assessed under fluorescent microscopy using Sytox green®. This dye only penetrates injured or dead cells and labels their nuclei while it is excluded from entering healthy cells. After 48h of exposure, a part of the living samples from the growth tests were incubated for 10 min in Sytox green (120 nM in dimethylsulfoxyde) and then observed using a fluorescence microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA) equipped with an HG lamp (U-LH100HG, Olympus, Center Valley, PA) using a 470-490 nm / 520 nm excitation/emission filter and a 500 nm dichromatic filter (U-MNB2, Olympus, Center Valley, PA). The concentration of dye was calibrated to allow for efficient labeling without significant interference caused by DWCNTs [34]. Significant differences were assessed using non-parametric Kruskal–Wallis analysis of variance.

2.3.4 Effects on photosynthesis

The effects of DWCNTs on photosynthesis was evaluated after 48h of exposure by pulse amplitude modulation (PAM) using a Phyto-PAM (Heinz Waltz GmbH, Effeltich, Germany) to establish the effective quantum yield of photochemical energy conversion in photosystem II (PSII). This method measures electron transfer along the photosynthetic chain by establishing the ratio of emitted photons to chlorophyll-absorbed photons after an illumination pulse. The higher the value for PSII, the more efficient the electron transfer is and the less it is impacted by a pollutant. Measurements were done after 30 min in the dark. Significant differences between conditions were determined by Kruskal–Wallis analysis of variance.

2.4 Extracellular polymeric substance assays

2.4.1 Culture and extraction protocols

This experiment was conducted in plastic flasks (Corning® cell culture flasks ref. 431080, surface area 175cm^2, Corning Tewksbury MA, USA). Flasks were first inoculated with 100 mL of *N. palea* suspension (2.5 cell mL^{-1}) and grown for 24 h (at 20 ±1°C) without shaking. Then, DWCNT suspensions (150 mL) were added to cultures at concentrations of 0 mg L^{-1}, 1.67 mg L^{-1}, 16.7 mg L^{-1} to reach final concentrations in the flask of 0 mg L^{-1} (control), 1 mg L-1 and 10 mg L^{-1}, respectively. After 8 days of exposure, the samples reached the stationary phase and similar algal concentrations in all assessed conditions. The biofilms were scraped and vigorously shaken and centrifuged. EPS were then extracted following the multi-methods sequential protocol previously described by Ras *et al.* [35], but without sonication to prevent diatom lysis. One extraction sequence involving three steps was applied in sequence with intermediate centrifugations (3200 g; 10 min) to collect the supernatants, which contained the solubilized EPS. Pellets were first incubated for 1h at 20°C in 20 mL of phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. The recovered pellet was then incubated in 4 mL PBS containing Tween® 20 (0.25%) for 1 hour at 20°C. The third extraction step was performed using 4 mL of the cationic chelator EDTA (1% EDTA in Tris-HCl 0.3 mol.L^{-1}, pH 8.5) for 1 hour at 20°C. Supernatants were stocked at 4°C (<24h) before analyses. The remaining pellets (EPS residues + cells + DWCNTs) were diluted in 20 ml of PBS before

quantification of the residual fraction (cellular content + EPS residues).Each extraction step was done under gentle agitation using a rotary disc shaker. This separation method allowed for the isolation of EPS that was linked to DWCNTs through (i) weak bonds ($H2O_{extract}$ + $PBS_{extract}$), (ii) hydrophobic bonds ($TWEEN_{extract}$) and (iii) ionic bridges ($EDTA_{extract}$). Samples of pellets were obtained at the end of the extraction before quantification of the residual fraction, and the efficiency of extraction was controlled by light microscopy using Alcian blue as an EPS labeler [25]. Cellular integrity was controlled at the same time as described in the viability tests section.

2.4.2 Quantification of proteins and carbohydrates

Carbohydrate measurements were performed for each extract by the anthrone method [34]. 200µL of anthrone reagent (2% in sulfuric acid 96%) was added to 100µL of each extracted sample in 96-well plates. The mixtures were then incubated at 60°C for 60 min and then cooled at room temperature for 10 min before light absorbance was measured at 620nm using a microplate reader (FLUOstar, BGM Labtech, Orthenberg, Germany). Glucose was used as standard.

Proteins were measured using the bicinchoninic acid (BCA) reagent (Sigma-Aldrich). A 25 µL assay sample was added to 200 µL of BCA reagent in a microplate. When samples contained EDTA, a 20 µL assay sample was added to 1 mL of BCA reagent to avoid underestimation of the protein content due to chelation between EDTA and the Cu^{2+} contained in the BCA reagent. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard [37]. Absorbance was measured at 560 nm with a microplate reader (FLUOstar, BMG Labtech, Orthenberg, Germany).

The background signals of the DWCNT suspensions were always removed. No significant interference of the DWCNTs or of NOM was observed on reagents (anthrone and BCA) at the tested concentrations (data not shown). Significant differences between conditions were determined using SSR by analyses of variance (ANOVA) following by Tukey HSD post-hoc, when significance was observed. Correlations between DWCNT concentrations and measured protein and carbohydrate contents were determined by Pearson correlation tests when significant differences were observed.

2.4.3 Size distribution of extracellular polymeric substances

The size of EPS was determined using high performance liquid chromatography (HPLC; AKTA Purifier, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) equipped with a 500 µL injection loop. Size exclusion chromatography was performed using a 24mL column containing 13µm of a spherical composite matrix of cross-linked agarose and dextran with a separation range of 10,000 Da to 600,000 Da (Superdex 200 10/300 GL column; AKTA GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). Absorbance was measured at 210nm (non-specific absorbance) and 280 nm (absorbance specific to cyclic amino acids). The values of the extracting solutions (PBS, TWEEN® 0.25% in PBS and EDTA 1% in Tris-HCl) were removed from the various extract signals. The sizes of the extracted molecules were calculated from a calibration curve obtained using a mix of different proteins (dextran blue: 2106 kDa, tyroglobulin: 669 kDa, ferritin: 440 kDa, conalbumin: 75 kDa, ovalbumin: 44 kDa, carbon anhydrase: 29 kDa, ribonuclease: 13.7 kDa, aprotinin: 6.5 kDa) according to the following equation:

$y = 4\ 10^{8}\ x^{-5.876}$; $R^2 = 0.996$, where y is in Da and x is in mL (peak elution volume). Due to the risk of contamination by DWCNTs, the first peak corresponding to the large-sized molecules (> $2\ 10^{6}$ Da) was not considered.

2.5 Scanning electron microscopy

Interactions between DWCNTs and the biofilm of *N. palea* were investigated by field effect gun scanning electron microscopy (SEM) focusing on the adherence of DWCNTs to the biofilm.

N. palea was grown in the same devices as those used for toxicity tests but with glass coverslips placed at the depth of well. After 48 h of exposure to $DWCNTs_{10mg}$, the samples were fixed (Sigma-Aldrich, France) as described in [27]. Briefly, this process consisted of a 24h fixation in a solution of 0.1% Alcian blue (N°CAS: 33864-99-2), acetic acid (0.5M), paraformaldehyde (2%) and glutaraldehyde (2%) buffered using sodium cacodylate (0.15 M),

followed by a subsequent 2h post-fixation in a solution of potassium ferro-cyanide (1.5%) and OsO_4 (1%) buffered by cacodylate. After rinsing, the samples were dehydrated in an ascending ethanol gradient before being dried under N_2 flux at room temperature. They were finally placed on SEM mounts and platinum-coated before observation (JEOL JSM-6700F, 3kV, Tokyo, Japan).

3 Results

3.1 Toxicity tests

The results of the growth inhibition test are summarized in Table 1. 48h of direct exposure to DWCNT led to significant inhibition of growth at concentrations ranging from $DWCNTs_{1mg}$ (~30%) to $DWCNTs_{50mg}$ (~85%). The 48h EC_{50} was 7.5 mg L^{-1} (at a 95 % confidence interval of 3.9 / 13.3). Moreover, the inhibition was not significantly correlated with PAR (cor = 0.55; p = 0.06). The shading effect on growth was only significant at concentrations ranging from $DWCNTs_{10mg}$ (~20%) to $DWCNTs_{50mg}$ (~40%). It corresponds to the two DWCNTs concentrations where PAR significantly decreased relative to the control. Furthermore, inhibition in the shading tests was positively correlated with a decrease in PAR (cor = 0.86; $p < 0.001$). This was not the case for the direct exposure tests (cor = 0.54 p = 0.07). After 144h, the inhibition of growth was only significant for cultures directly exposed to $DWCNTs_{50mg}$ (~30%) indicating only a partial recovery of growth while all other conditions exhibited a complete growth recovery over the considered period. $DWCNTs_{50mg}$ did not induce mortality (6.63 ± 2.17%; ± indicates the standard deviation) compared to control (7.37 ± 1.1%). The PSII quantum yield was also unaffected by the presence of DWCNTs regardless of the concentration and always exhibited value of 0.65 ± 0.01.

3.2 Quantification of carbohydrate and protein contents of extracted EPS

After extraction with the multi-methods protocol, carbohydrates and proteins composing the total extracted EPS were quantified using colorimetric assays (Fig. 2). Proteins were significantly higher for samples exposed to DWCNTs (control: 31.23 ± 3.84 mg L^{-1}; $DWCNTs_{1mg}$: 49.95 ± 6.86 mg L^{-1} and $DWCNTs_{10mg}$: 49.06 ± 6.49 mg L^{-1}) and no significant difference was revealed between the two tested concentrations (± indicates the standard deviation). On the other hand, the carbohydrate assays showed no difference regardless of the DWCNTs concentration tested (control: 13.72 ± 4.13 mg L^{-1}, $DWCNTs_{1mg}$: 12.6 ± 3.33 mg L^{-1} and $DWCNTs_{10mg}$: 15.46 ± 3.3 mg L^{-1}). Thus, in the absence of DWCNTs, the total amount of extracted EPS was 44.95 ± 5.3 mg L^{-1} and corresponded to a proteins/carbohydrates ratio of 2.27. After exposure to $DWCNTs_{1mg}$ and $DWCNTs_{10mg}$, the EPS amounts were 62.56 ±

Table 1 : Summarized results of the toxicity tests. The first four lines represent the inhibition of growth (%) under direct exposure or shading. 48h-EC_{50} is the exposure concentration of DWCNTs that caused 50% inhibition of growth after 48h of direct exposure (during the exponential phase).. 48h-PSII are the values of the photochemical quantum yield of photosystem II after 48h of direct exposure to DWCNTs. Finally, the PAR values represent the photosynthetic active radiation received by diatoms after passing through DWCNTs suspensions. Gray values indicate the standard deviation. For any considered line, two groups without any letters in common are significantly different ($p < 0.05$).

	Control			$DWCNT_{0.1mg}$			$DWCNT_{1mg}$			$DWCNT_{10mg}$			$DWCNT_{50mg}$		
48h exposure (%)	0		a	13.7	8	a	29.2	1	b	46.6	3	c	84.1	10	d
48h shading (%)	0		a	3.9	5	a	-1.0	0.3	a	21.5	7	b	40.6	17	b
144h exposure (%)	0		a	-4.0	4	a	2.0	5	a	7.0	2	a	27.4	2	b
144h shading (%)	0		a	1.0	1	a	3.3	4	a	-3.5	3	a	-3.2	3	a
48h-EC_{50} (mg L^{-1})	7.5 (95% confidence interval : 3.9 / 13.3)														
PSII quantum yield	0.63	0.01	a	0.66	0.01	a	0.66	0.02	a	0.66	0.01	a	0.64	0.01	a
PAR (µmole s^{-1} m^{-2} µA)	23.9	1.5	a	21.9	1.4	a	23.7	1.3	a	17.3	1.3	b	14.9	3.4	b

5.26 mg $L^{-1}$and 65.14 ± 5.02 mg L^{-1} and corresponded to increased proteins/carbohydrates ratios of 3.96 and 3.05, respectively.

3.3 Characterization of extracted EPS by size exclusion HPLC

Global (210 nm) and protein (280 nm) profiles of the different EPS fractions ($PBS_{extract}$, $TWEEN_{extract}$, and $EDTA_{extract}$) extracted from the control, $DWCNT_{1mg}$ and $DWCNT_{10mg}$ cultures were analyzed by size exclusion HPLC (Fig. 3). Each fraction exhibited singular profiles and exposure to DWCNTs with affected peak amplitudes rather than molecular weight distributions. Indeed, $PBS_{extract}$ profiles at 210nm (Figure 3a) showed three main peaks in the control and treated cultures (elution volume: Ev = 19.7 mL ~ 10 kDa, 22.05 mL ~ 5kDa, 24.6 mL ~ 3 kDa). Meanwhile, the protein profile of the $PBS_{extract}$ at 280 nm (fig. 3d) showed one peak (Ev = 19.7 mL) with a similar area for the three analyzed PBS extracts. The $TWEEN_{extract}$ profiles at 210nm (Figure. 3b) showed six major peaks occupying the same positions on the chromatographs for different conditions (Ev = 11.2 mL ~ 273.4 kDa, 12.1 mL ~ 174 kDa, 16.1 mL ~ 32 kDa, 19.7 mL ~10 kDa, 22.7 mL ~ 4 kDa, 24.6 mL ~3 kDa) but with different amplitudes. This was especially the case for $DWCNTs_{10mg}$, in which the peaks that eluted between 16 to 23 ml were strongly increased. Among these, only two peaks were present at 280nm (12.1 mL ~ 174 kDa and 19.7 mL ~ 10 kDa; fig. 3e), suggesting that they were mainly composed of protein-like polymers (proteins or glycoproteins, PLPs) with either high or low molecular weights. Finally, the $EDTA_{extract}$ profiles showed four distinct peaks at 210 nm (Ev = 13.5 mL ~91 kDa, 15.6 mL ~39 kDa, 25.7 mL ~1 kDa; fig. 3c). At 280 nm, only two peaks (15.6 mL ~39 kDa; 19.7 mL ~10 kDa fig. 3f) were detected with higher amplitudes in the $DWCNTs_{10mg}$ extract compared to the control and $DWCNTs_{1mg}$ chromatographs. A Tris-EDTA signal between ~20 – 24 mL was over the detection limit and was not considered.

3.4 Chemical interactions between EPS and DWCNTs

A multi-method extraction processed allowed for the fractionation of EPS according to chemical and physical interactions within the biofilm. The collected EPS fractions can be divided according to their interactions with DWCNTs: (i) weakly linked ($H2O_{extract}$ + $PBS_{extract}$), (ii) linked by hydrophobic bonds ($TWEEN_{extract}$), and (iii) linked by ionic bridges ($EDTA_{extract}$). Figure 4 shows the quantitative distribution of carbohydrates and proteins in the recovered fractions after incubation in the absence (control) or in the presence of $DWCNTs_{1mg}$ and $DWCNTs_{10mg}$. The weakly bounded EPS fraction (Fig. 4a) showed no significant difference in either the carbohydrate or protein secretion ($p > 0.05$) between the three tested conditions. The $TWEEN_{extract}$ contained a significantly higher concentration of carbohydrates in $DWCNT_{10mg}$ ($p < 0.01$) than either the control or $DWCNTs_{1mg.}$ (Fig. 4b). Moreover, the concentrations of carbohydrates and DWCNTs were positively correlated (cor = 0.88; p = 0.001). The protein contents of $TWEEN_{extract}$ were significantly different under all conditions and were also strongly correlated (cor = 0.92; $p<0.001$) with the DWCNT concentration. $EDTA_{extract}$ exhibited no difference or correlation regardless of the concentration of DWCNTs (Fig. 4c). The residual fractions (EPS residues + cellular content + DWCNTs) were also assessed. Neither carbohydrates (control: 1.07 ± 0.11 pg $cell^{-1}$, $DWCNTs_{1mg}$: 1.20 ± 0.16 pg $cell^{-1}$, $DWCNTs_{10mg}$: 1.32 ± 0.21 pg $cell^{-1}$) nor proteins (control: 6.13 ± 0.1 pg $cell^{-1}$, $DWCNTs_{1mg}$: 6.51 ± 0.91pg $cell^{-1}$, $DWCNTs_{10mg}$: 5.99 ± 2.05 pg $cell^{-1}$) were significantly different between the different conditions. In addition, Alcian blue staining did not reveal any remaining EPS at the end of the extraction. There was also no difference in mortality between the three conditions tested (results not shown).

3.5 Physical interactions between DWCNTs and the biofilm

Fixation of EPS followed by SEM was implemented to visualize the interaction between the biofilm and DWCNTs (Fig. 5). Figure 5a shows a picture from the control culture revealing the thin EPS network produced by *N. palea*. Figure 5b shows the biofilm exposed to $DWCNTs_{10mg}$, emphasizing a strong disruption of

the EPS network in the presence of DWCNTs. However, no interaction between the frustule and DWCNTs was shown. A higher magnification (Figure 5c) revealed DWCNTs bundles inside the disrupted EPS. This picture also shows the strong affinity of EPS for DWCNTs, which was mostly coated by EPS.

4 Discussion

4.1 Toxicity of DWCNTs

In In this study, both the effects of direct exposure to DWCNTs and shading using DWCNTs as an external filter on *N. palea* growth were evaluated. DWCNTs toxicity was assessed using assays measuring the decreases in viability and PSII quantum yield. The results summarized in Table 1 are close to those previously obtained for the effect of MWCNTs on *N. palea* using identical experimental conditions [27]. After 48 h, externally shaded cultures showed a growth inhibition only from $DWCNTs_{10mg}$ (~22%) to $DWCNTs_{50mg}$ (~41%), which is well-correlated with PAR decreases ($DWCNTs_{10mg}$ ~27%; DWCNTs50mg ~37%; cor = 0.86 p <0.001). Over the same time period, direct exposure to 1 mg L^{-1} (~30%) to 50 mg L^{-1} (~84%) of DWCNTs resulted in a significant and dose-dependent growth inhibition. Even though this result was not significantly correlated with a PAR decrease (cor = 0.54 p = 0.07), a shading effect resulting from the agglomeration of DWCNTs to algae cannot be excluded at low concentrations and might partially act in the observed growth inhibition [38,39]. In contrast, after 6 days (144h) of direct exposure, cultures entirely recovered their growth rate in the range of DWCNTs 0.1mg to DWCNTs 10mg. This recovery was partial with DWCNTs 50mg (~30%). This temporary growth inhibition of algae has been frequently observed in the presence of CNTs and is generally explained by the agglomeration of CNTs facilitated by their specific affinity and the molecules produced by exposed organisms, which both decrease the interaction of CNTs with surfaces over time [14,40]. Finally, shaded cultures completely caught up their growth and presented a similar concentration of diatoms to the controls in stationary phase. Thus, in our experimental conditions, the PAR decreases caused by the highest concentrations of DWCNTs only limited cell division. This could also partially explain the growth recovery in the direct exposure tests. The presence of metallic impurities is occasionally put forward to explain the observed toxicity during exposure to CNTs [41,42]. In this study, concentrations of metal ions in solution from the DWCNT suspensions were ten times lower for cobalt (~ 34 µg L^{-1}) and forty times lower for molybdenum (~222 µg L^{-1}) than those causing effects on various unicellular green algae and diatoms [43–45]. Moreover, metallic residues were only observed in solutions obtained from DWCNTs. The iron content of the $DWCNT_{50mg}$ solution was only increased by ~ 7 % compared to the amount inherent to the CHU10 concentration (2.5 mg L^{-1}). Finally, no increase in mortality or decrease in PSII quantum yield was observed (Table 1). These results highlight a delaying effect of DWCNTs on the growth of *N. palea* rather than a toxic effect.

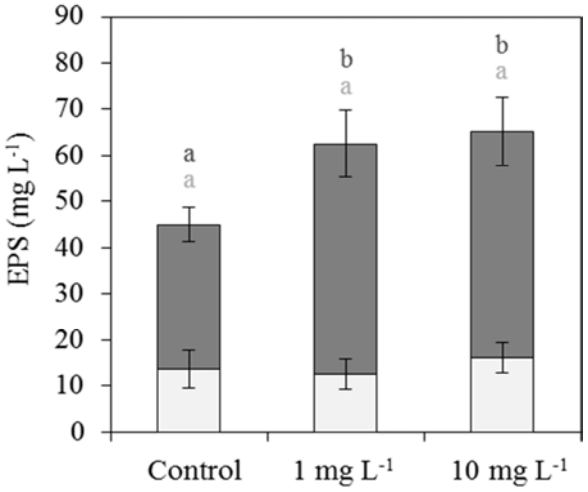


Figure 2 : Results of the assays measuring total amounts of carbohydrates (anthrone test) and protein-like polymers (BCA test) depending on the DWCNTs concentration. Dark bars are proteins (in an equivalent amount of bovine serum albumin) and bright are carbohydrates (in an equivalent amount of glucose). Two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). The details of each fraction are given in figure 4.

4.2 DWCNTs effect on EPS production and possible involvement in growth delay

The effects of DWCNTs on EPS production by *N. palea* was assessed using anthrone (carbohydrates) and BCA (proteins) colorimetric assays performed on extracted EPS fractions.

Unlike what is generally reported in the literature but has already been highlighted by some authors [46,47], this study found that protein was actually the primary part of extracted EPS. Thus, this fraction of EPS should always be considered in future studies dealing with the EPS of diatoms.

In this study, the data revealed a higher EPS production in cultures exposed to DWCNTs (Fig. 2), indicating that the amount of EPS produced by microorganisms can be driven by environmental conditions [35,48,49]. EPS allows for the adherence of benthic organisms to substrates. EPS secretions are also known to decrease water turbidity by aggregating suspended particles while allowing for the movement of diatoms to brighter areas [20,50,51]. In this work, the overproduction of EPS could therefore lead to decreased turbidity of the medium, increasing the catching efficiency of DWCNTs by the biofilm. It can also reflect the efficiency of the diatoms to move in an attempt to reach brighter areas while leaving behind the DWCNTs-adhered areas. EPS are also known to protect organisms from particulate abrasion [22,29] and against many biocides [23]. Some authors highlighted an enhanced resistance of bacteria against TiO2 and silver nanoparticles conferred by an overproduction of EPS [52,53] In the present study, EPS could perform the same function against the DWCNTs by covering them, reducing the possibility of direct contact between the DWCNTs and cells, as already reported by some authors [14,27,40,54] and highlighted by SEM (Figure 5). Another interesting finding is that the overproduction of EPS was similar between $DWCNTs_{1mg}$ and $DWCNTs_{10mg}$. On the one hand, it cannot be excluded that the decrease in PAR from $DWCNTs_{10mg}$ could have limited the photosynthetic activity and thus EPS production [55,56]. On the other hand, this result

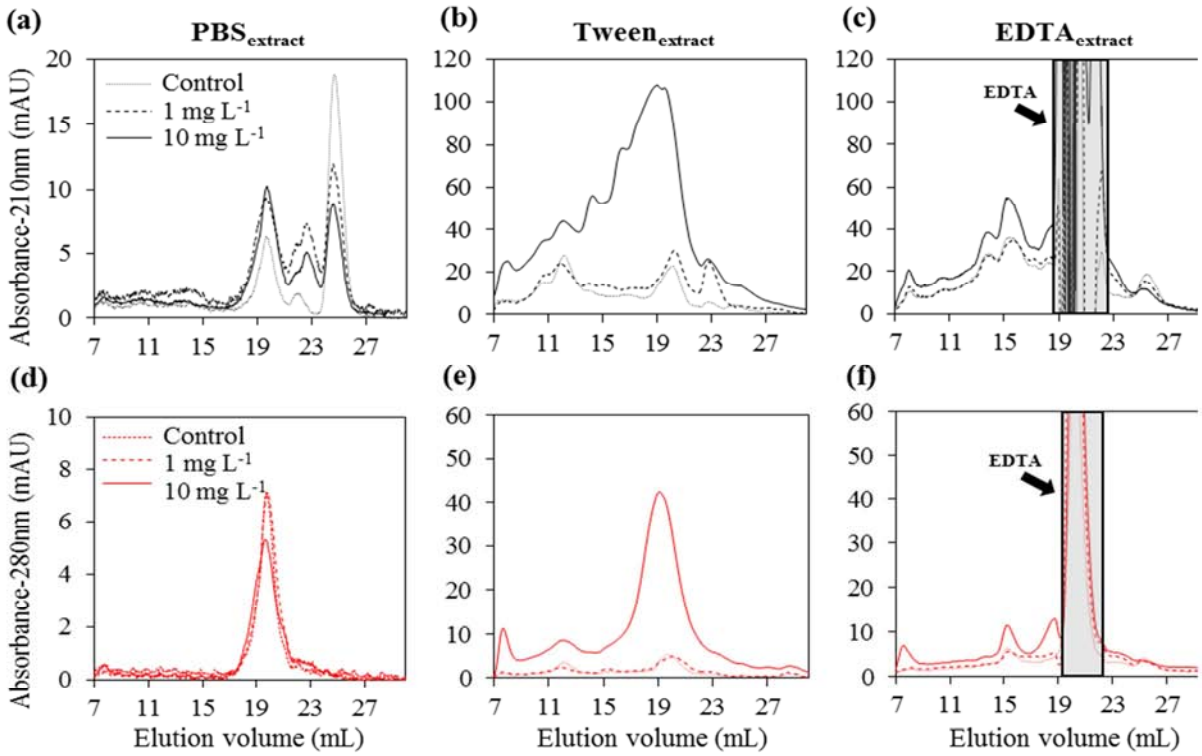


Figure 3 : Size exclusion high precision liquid chromatography (HPLC) profiles of EPS extracted with (a), (d) phosphate buffer saline ($PBS_{extract}$); (b), (e) TWEEN 20 ($TWEEN_{extract}$); and (c), (f) Tris-EDTA ($EDTA_{extract}$). (a), (b) and (c) are nonspecific absorbance profiles at 210 nm showing both carbohydrates and protein-like polymers, while (d), (e), (f) are absorbance profiles at 280 nm showing only protein-like polymers. Samples from the $Tween_{extracts}$ and $EDTA_{extracts}$ were 5 times more concentrated than those of the $PBS_{extracts}$ (Cf. materials section). Note that in (c) and (f), the peak starting at 19.6 corresponds to EDTA and not an extracted molecule. The first peak (~8mL) from each condition corresponds to large molecules or the assembly of molecules (or, potentially, remaining DWCNTs) that were excluded from the column.

suggests that *N. palea* responded in a massive way from exposure to $DWCNTs_{1mg}$ to both limit its contact with particles and to improve the brightness of the water column [55]. Despite the energetic cost, this response may constitute a considerable benefit in this case. From an adaptive perspective, the overproduction of EPS can provide maximum protection from weaker doses of CNTs. Some diatoms are also known to use extracellular carbohydrates as an energy reserve, and can use a portion of the carbohydrates produced on a daily basis to ensure the continuity of growth and cell function during the night [25, 56]. However, interactions between DWCNT and EPS might limit carbohydrate recycling during the night. The fact that the amounts of extracted carbohydrates were similar between the three assessed conditions suggests that DWCNTs did not appreciably limit the EPS recycling.

Finally, the overproduction of EPS could explain the higher growth delay observed in the 48h cultures directly exposed to $DWCNTs_{0.1mg}$ and $DWCNTs_{1mg}$ while neither a decrease in growth or in PAR were observed in the shaded cultures. Even if we cannot rule out the underestimation of the shading effect from the external filters, the energetic cost of EPS overproduction could at least partially explain the observed inhibition of directly exposed cells. From the growth inhibition results (Table 1) and EPS production (Fig. 2), the energy expenditure related to the overproduction of EPS seems to be responsible for ~100% of the growth inhibition in diatoms in direct contact with $DWCNTs_{1mg}$ whereas only ~60% of the growth inhibition in $DWCNTs_{10mg}$ is linked to EPS overproduction and ~ 40% is due to shading. These estimates are consistent with other works on C*hlorella sp* exposed to MWCNTs [40] but are different from other studies [15] in which the inhibition by shading during exposure was considered to be ~ 67%. This study underlines a potential additive effect

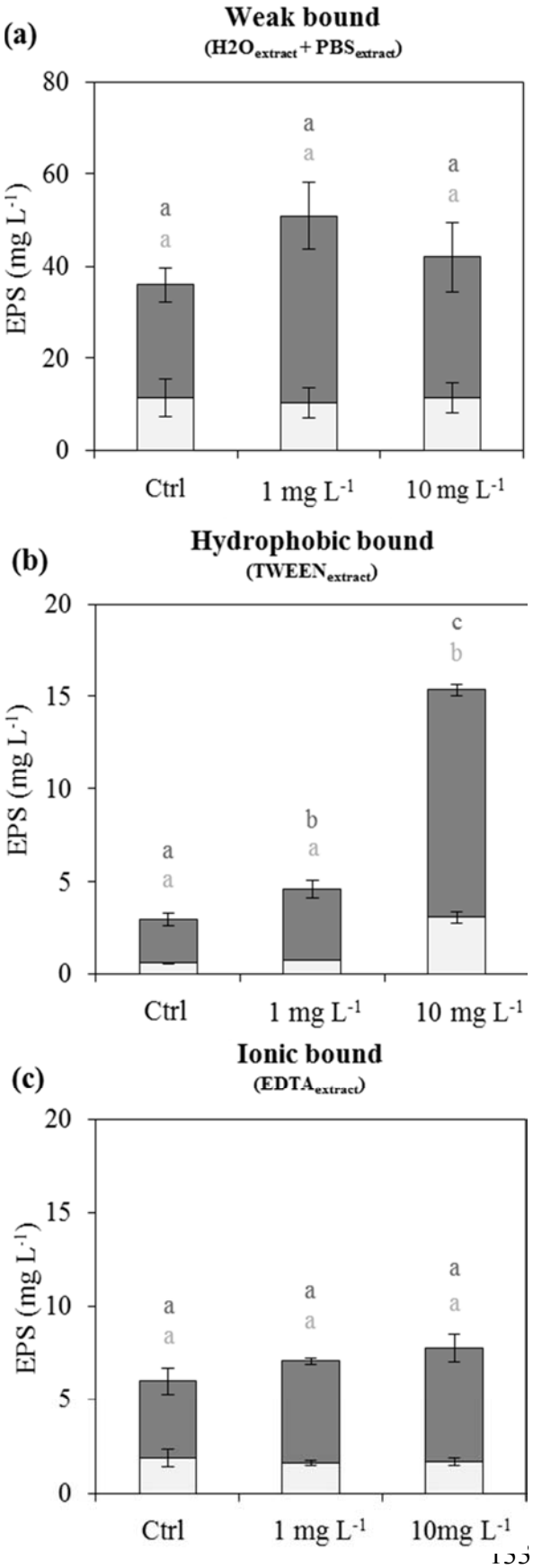


Figure 4 : Results from the colorimetric assays of each extracted fraction ranked by bonding properties. (a) Weak or mechanical bonds between DWCNTs and organisms ($H2O_{extract}$ + $PBS_{extract}$). (b) Linked by hydrophobic bound ($TWEEN_{extract}$). (c) Linked by ionic bridges ($EDTA_{extract}$). Error bars indicate the standard deviation. For each graph, two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). Global concentrations of extracted EPS (obtained from the addition of these different fractions) are given in Figure 2.

of two mechanisms that are responsible for the temporary growth inhibition of *N. plaea* when directly exposed to DWCNTs: (i) the energy cost of EPS overproduction, which can cause the agglomeration of MWCNTs both to themselves and to organisms, and (ii) the shading caused by MWCNTs.

4.3 Effects of DWCNT on EPS distribution

Analysis of the different EPS fractions by size exclusion chromatography revealed three distinct profiles with peak amplitudes related to the concentrations of DWCNTs (Fig. 3). This result, as well as those of the EPS assays (Fig. 2), indicates that in the presence of DWCNT, *N. palea* can increase EPS production (specifically PLPs) without strongly changing the size of molecules produced. In the $PBS_{extract}$, four separate peaks were detected at 210 nm that correspond to low molecular weight molecules with sizes ranging from 3 to 10 kDa. Among these molecules, only one (~10 kDa) was a PLP. These molecules can correspond to fragments of proteins or glycoproteins that were easily detached from the biofilm due to previous digestion of the matrix by extracellular proteases. Six distinct fractions were eluted from the column using TWEEN as a detergent for the extraction of hydrophobic molecules. The eluted molecules exhibited a wide range of sizes ranging from 273.4 to 3 kDa. Among these, two fractions were PLPs, one contained high molecular weight proteins approximately 174 kDa, and the last contained low molecular weight proteins approximately 10 kDa. Notably, a ~ 10 kDa PLP was present in large amounts in the $PBS_{extract,}$ the $TWEEN_{extract}$ and the $EDTA_{extract}$ and could be the same molecule in each sample. This finding indicates that this molecule might be heavily involved in the DWCNTs / EPS interaction. The EDTA extract contained four different molecules with sizes ranging from 1 kDa to 91 kDA (Fig. 3c). The 39 kDa and the 10 kDa fractions were detected at 280nm as PLPs. This indicates that the 10 kDa molecules might be heavily involved in the DWCNTs / EPS interaction and, even if a large part remains unlinked to DWCNTs, some of them are linked to the biofilm and can be extracted after the disruption of chemical interactions. Interestingly, a protein-like polymer

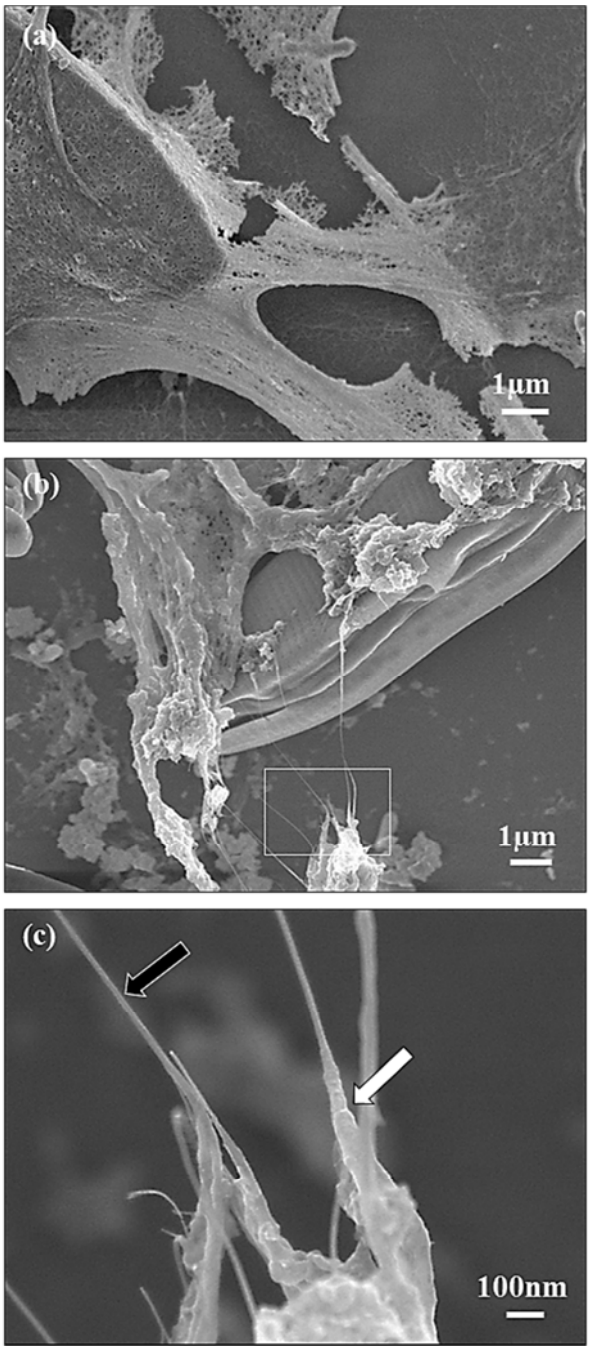


Figure 5 : Scanning electron microscopy observations of (a) the control biofilm and (b) the biofilm exposed to 10 mg L^{-1} of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). (c) A magnified view of (b) highlighting the thin interactions between EPS and DWCNTs and the disrupted aspects of EPS in the presence of DWCNTs. The black arrow indicates a DWCNTs bundle. The white arrow shows EPS wrapping around a bundle of DWCNTs.

with an intermediate molecular weight of 39 kDa was only found in the EDTA extract. The 39 kDa peak was, however, increased for $DWCNTs_{10mg}$, suggesting that this molecule could either bridge with divalent ions in functionalized areas of DWCNTs that contain structural imperfections or

non-covalently functionalize NOM to cover CNT. As previously described by Caudan *et al.* [57], anionic proteins and divalent calcium were reported to be key components for the aggregation of microbial granules involved in the elimination of organic components. Due to the presence of negative carboxyl groups on the glutamic and aspartic amino acids of proteins, this mechanism may be involved in the formation and stability of many other biological matrixes, including diatom biofilms.

4.4 Interactions between DWCNTs and EPS

The adhesion of CNTs to algae has often been observed [14,15,40,58]. In this study, HPLC (Figure 3) and carbohydrates/proteins assays (Figure 4) for each extracted fraction as well as SEM (Figure 5) were implemented to better understand the nature of the interactions between EPS and DWCNTs. Water-soluble and weak bonds between EPS and DWCNTs were obtained in the $H2O_{extract}$ / $PBS_{extract}$, hydrophobic bonds were obtained in the $TWEEN_{extract}$, and or bridged interactions between divalent ions were obtained in the $EDTA_{extract}$.

No significant difference was observed in the $H2O_{extract}$ / $PBS_{extract}$ after DCWNTs exposure. However, this sample constituted a majority of the produced EPS reaching ~50% and ~60% of the total EPS amount. These EPS could be involved in the mechanical action occasionally used to explain the interaction between DWCNTs and organisms [14, 15] or EPS [27, 54]. Tween 20 was used as a chemical substitute for hydrophobic bonds [59], freeing the EPS linked by hydrophobic interactions to DWCNTs. Considering the high solubility of polysaccharides, the hydrophobicity of EPS is mostly inherent to proteins [49, 60]. In this study, carbohydrates and PLPs from the $TWEEN_{extract}$ were strongly correlated (~ 0.95) with the concentration of DWCNTs. Moreover, the amount of PLPs extracted for each condition increased according to the concentration of DWCNTs. In contrast, the concentration of carbohydrates from the $TWEEN_{extract}$ was significantly higher only at the highest concentration of DWCNTs. As already observed with polystyrene nanoparticles [60], our results suggest a strong hydrophobic interaction between DWCNTs and EPS, which is mainly driven by PLPs. These results corroborate the HPLC results, which showed increases in two PLPs (~ 174 kDa, ~ 10 kDa) that could be strongly implicated in the observed hydrophobic interaction between EPS and DWCNTs. Tyrosine and tryptophan, which are cyclic amino acids, are especially involved in the CNTs-protein interaction [61]. This indicates that these two PLPs could contain a large amount of these two amino acids. In addition, the sharp increase in the protein/carbohydrates ratio of EPS in the exposed cultures appears to be an adaptive/adhesive response of *N. palea* that works by increasing the hydrophobicity of the EPS produced. EDTA was used to chelate ions responsible for the ionic bridge between DWCNTs and EPS, allowing for their extraction. The $EDTA_{extract}$ (Figure 4c) revealed no significant difference between conditions, although the amount extracted showed an increasing trend following that of DWCNTs. Thus, the involvement of ionic bonds was weak but they cannot be ruled out in the binding of DWCNTs to EPS. Structural defects in DWCNTs might be implicated in this type of interaction, and replicating the experiment using functionalized DWCNTs would better help us to grasp the potential of EPS to form ionic bonds with DWCNTs. NOM could also be involved in the interaction observed between EPS and DWCNTs either by reducing or promoting it. On the one hand, NOM can occupy hydrophobic areas that are inherent to DWCNTs, limiting interaction between DWCNTs and EPS [64]. On the other hand, NOM could promote the interaction between DWCNTs and EPS through forming different bonds such as electrostatic, hydrophobic, π–π and hydrogen-bond interactions [17,63] with both DWCNTs and EPS [17,50].

Due to the nano-particulate and fibrous nature of the DWCNTs as well as the structure of the EPS network, a mechanical interaction seems obvious. This is supported by SEM observations showing DWCNTs strongly entangled in the EPS (Figure 5). According to other authors, the assembly of DWCNTs and EPS is consistent with them encountering each other within a few seconds

[62] and occurs even under dynamic water flow, as in the used experimental setup. In the present study, a strong disruption in the EPS structure was also highlighted, which was already observed during the exposure of human mucus to MWCNTs [27] using other non-metallic nanoparticles [54]. This disruption could be a consequence of both mechanical phenomena and chemical interactions (mainly hydrophobic, figures 4b, 5c) between different EPS polymers and DWCNTs. This could increase the coating and retention of DWCNTs within the EPS that compose aquatic biofilms.

5 Conclusions

Exposure to 1 mg L^{-1} to 50 mg L^{-1} of DWCNTs dispersed by NOM led to a temporary growth inhibition of the diatom *N. palea*. However, no toxic effect was observed in either the viability or the PSII quantum yield. Shading seemed involved only in growth inhibition from $DWCNTs_{10mg}$, although the device used in the present study is believed to underestimate the shading effect at low concentrations of CNT. The EPS analysis revealed a DWCNTs-driven overproduction of EPS from $DWCNTs_{1mg}$. This was specifically the case for PLPs but not for carbohydrate polymers. Overproduction was stable for $DWCNTs_{1mg}$ to $DWCNTs_{10mg}$, indicating a strong response from low DWCNTs concentrations. An additive effect of shading and energetic trade-off between cell division and EPS production (focused on protection against DWCNTs) could explain the observed growth inhibition after 48 hours of contact.

This study has also shown that two distinct mechanisms were involved in the interaction between DWCNTs and EPS: (i) physical, via the EPS meshing, and (ii) chemical, mainly via hydrophobic interactions. Two PLPs seemed particularly involved in the latter but further studies are needed to better characterize the implicated molecules and understand the basics of the interaction. In general, our results show that EPS production by *N. palea* could be a general response to stress from both natural particles (clays and sediments) and anthropogenic particles (manufactured nanoparticles). However, it is unlikely that EPS production is changed similarly for algae under shading conditions and DWCNTs exposure. This might be confirmed by an additional study on EPS production, making the distinction between the role of direct interactions (contact between DWCNTs and diatoms) and the shading caused by DWCNTs.

Considering that the present and future concentrations of CNTs in aquatic environments are low in comparison to those of natural particles, only a minor impact of CNTs on EPS production at a worldwide scale is foreseen. In contrast, the covering of CNTs by EPS and probably by other hydrophobic nanoparticles could hide them from the recognition and defense systems of many organisms. Thus, EPS-coated nanoparticles could become Trojans overlooked by many organisms that consume the biofilms.

6 Acknowledgments

We acknowledge the Common Service for Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy of the University Paul Sabatier and Stephane Du Plouy for his help. Part of the present study was achieved in the framework of the public/private joint research laboratory NAUTILE (NAnotUbes et écoToxIcoLogiE; Arkema France–CNRS/INPT/UPS). This work is also integrated in the international research group ICEINT (International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology).

Declaration of interest

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

7 References

[1] MarketsandMarkets. 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. 2013.

[2] iRAP IR and P Inc. Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphene and nanodiamonds: A global technology survey and market analysis. Stamford, CT, US: 2011.

[3] Flahaut E, Bacsa R, Peigney A, Laurent C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. Chem Commun 2003:1442. doi:10.1039/b301514a.

[4] Endo M, Strano MS, Ajayan PM. Potential Applications of Carbon Nanotubes. Carbon Nanotub., vol. 111, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008, p. 13–61.

[5] Béduer A, Seichepine F, Flahaut E, Loubinoux I, Vaysse L, Vieu C. Elucidation of the Role of Carbon Nanotube Patterns on the Development of Cultured Neuronal Cells. Langmuir 2012;28:17363–71. doi:10.1021/la304278n.

[6] Neves V, Heister E, Costa S, Tîlmaciu C, Flahaut E, Soula B, et al. Design of double-walled carbon nanotubes for biomedical applications. Nanotechnology 2012;23:365102. doi:10.1088/0957-4484/23/36/365102.

[7] 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. doi:10.1021/es201579y.

[8] Kümmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. Chemosphere 2011;82:1387–92. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.069.

[9] Parks AN, Chandler GT, Ho KT, Burgess RM, Ferguson PL. Environmental biodegradability of [^{14}C]SWNT by *Trametes versicolor* and natural microbial cultures found in New Bedford Harbor sediment and aerated wastewater treatment plant sludge: Environmental biodegradability of [^{14}C]SWNT. Environ Toxicol Chem 2014:n/a – n/a. doi:10.1002/etc.2791.

[10] Zhang L, Petersen EJ, Habteselassie MY, Mao L, Huang Q. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. Environ Pollut 2013;181:335–9. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.058.

[11] Smart SK, Cassady AI, Lu GQ, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. Carbon 2006;44:1034–47. doi:10.1016/j.carbon.2005.10.011.

[12] Petersen EJ, Henry TB. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: Review. Environ Toxicol Chem 2012;31:60–72. doi:10.1002/etc.710.

[13] Wick P, Manser P, Limbach L, Dettlaffweglikowska U, Krumeich F, Roth S, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. Toxicol Lett 2007;168:121–31. doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.019.

[14] Wei L, Thakkar M, Chen Y, Ntim SA, Mitra S, Zhang X. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. Aquat Toxicol 2010;100:194–201. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.001.

[15] Schwab F, Bucheli TD, Lukhele LP, Magrez A, Nowack B, Sigg L, et al. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and

Agglomeration? Environ Sci Technol 2011;45:6136–44. doi:10.1021/es200506b.

[16] Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 2008;17:372–86. doi:10.1007/s10646-008-0214-0.

[17] Yang K, Xing B. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. Environ Pollut 2009;157:1095–100. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.007.

[18] Zhang S, Shao T, Kose HS, Karanfil T. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. Environ Toxicol Chem 2012;31:79–85. doi:10.1002/etc.724.

[19] Bourdiol F, Mouchet F, Perrault A, Fourquaux I, Datas L, Gancet C, et al. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. Carbon 2013;54:175–91. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024.

[20] Staats N, De Winder B, Stal L, Mur L. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelic diatoms C*ylindrotheca closterium* and N*avicula salinarum*. Eur J Phycol 1999;34:161–9. doi:10.1080/09670269910001736212.

[21] J. Tolhursf T., Gust G, M. Paterson D. The influence of an extracellular polymeric substance (EPS) on cohesive sediment stability. Proc. Mar. Sci., vol. 5, Elsevier; 2002, p. 409–25.

[22] Brouwer JFC, Wolfstein K, Ruddy GK, Jones TER, Stal LJ. Biogenic Stabilization of Intertidal Sediments: The Importance of Extracellular Polymeric Substances Produced by Benthic Diatoms. Microb Ecol 2005;49:501–12. doi:10.1007/s00248-004-0020-z.

[23] Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res 2001;43:1–8.

[24] Riding RE, Awramik SM, editors. Microbial Sediments. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2000.

[25] De Brouwer JFC, Stal LJ. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae)1. J Phycol 2002;38:464–72. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01164.x.

[26] Miao A-J, Schwehr KA, Xu C, Zhang S-J, Luo Z, Quigg A, et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ Pollut 2009;157:3034–41. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.047.

[27] Verneuil L, Silvestre J, Mouchet F, Flahaut E, Boutonnet J-C, Bourdiol F, et al. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea* : "A sticky story." Nanotoxicology 2014:1–11. doi:10.3109/17435390.2014.918202.

[28] Scala S, Bowler C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. Cell Mol Life Sci 2001;58:1666–73. doi:10.1007/PL00000804.

[29] Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, et al. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature

2003;421:841–3. doi:10.1038/nature01416.

[30] Losic D, Rosengarten G, Mitchell JG, Voelcker NH. Pore Architecture of Diatom Frustules: Potential Nanostructured Membranes for Molecular and Particle Separations. J Nanosci Nanotechnol 2006;6:982–9. doi:10.1166/jnn.2006.174.

[31] Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E. Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms. In: Whitacre DM, editor. Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol 203, vol. 203, New York, NY: Springer New York; 2010, p. 87–103.

[32] Landois P. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. Toulouse: Centre Interuniversitaire de la Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT), UMR 5085; Laboratoire D'Ecologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), UMR 5245; 2008.

[33] Oeurng C, Sauvage S, Coynel A, Maneux E, Etcheber H, Sánchez-Pérez J-M. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. Hydrol Process 2011;25:2365–78. doi:10.1002/hyp.7999.

[34] Horst AM, Vukanti R, Priester JH, Holden PA. An Assessment of Fluorescence- and Absorbance-Based Assays to Study Metal-Oxide Nanoparticle ROS Production and Effects on Bacterial Membranes. Small 2013;9:1753–64. doi:10.1002/smll.201201455.

[35] Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E, Girbal-Neuhauser E. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. Water Res 2011;45:1529–38. doi:10.1016/j.watres.2010.11.021.

[36] Dreywood R. Qualitative Test for Carbohydrate Material. Ind Eng Chem Anal Ed 1946;18:499–499. doi:10.1021/i560156a015.

[37] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985;150:76–85.

[38] Cleuvers M, Ratte HT. The importance of light intensity in algal tests with coloured substances. Water Res 2002;36:2173–8. doi:10.1016/S0043-1354(01)00455-9.

[39] OECD O. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Paris, France: OECD Publishing; 2002.

[40] Youn S, Wang R, Gao J, Hovespyan A, Ziegler KJ, Bonzongo J-CJ, et al. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green algae: P*seudokirchneriella subcapitata*. Nanotoxicology 2012;6:161–72. doi:10.3109/17435390.2011.562329.

[41] Ge C, Li Y, Yin J-J, Liu Y, Wang L, Zhao Y, et al. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. NPG Asia Mater 2012;4:e32. doi:10.1038/am.2012.60.

[42] Von Moos N, Slaveykova VI. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 2013:1–26. doi:10.3109/17435390.2013.809810.

[43] El-Sheekh MM, El-Naggar AH, Osman MEH, El-Mazaly E. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in

Monoraphidium minutum and *Nitzchia perminuta*. Braz J Plant Physiol 2003;15. doi:10.1590/S1677-04202003000300005.

[44] Nagpal NK, Golder Associates, British Columbia, Ministry of Water L and AP. Technical report, water quality guidelines for cobalt. [Victoria, B.C.]: Ministry of Water, Land and Air Protection; 2004.

[45] Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian environmental quality guidelines. Hull, QC: CCME; 1999.

[46] Khandeparker RD, Bhosle NB. Extracellular polymeric substances of the marine fouling diatom *Amphora rostrata* Wm.Sm. Biofouling 2001;17:117–27. doi:10.1080/08927010109378471.

[47] Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. Mar Freshw Res 2009;60:1201. doi:10.1071/MF08258.

[48] Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron K. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production1. J Phycol 2004;40:293–304. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x.

[49] Chen Y-P, Zhang P, Guo J-S, Fang F, Gao X, Li C. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. Chemosphere 2013;92:633–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.059.

[50] Stal LJ. Microphytobenthos, their Extracellular Polymeric Substances, and the Morphogenesis of Intertidal Sediments. Geomicrobiol J 2003;20:463–78. doi:10.1080/713851126.

[51] Poulíčková A, Hašler P, Lysáková M, Spears B. The ecology of freshwater epipelic algae: an update. Phycologia 2008;47:437–50. doi:10.2216/07-59.1.

[52] Joshi N, Ngwenya BT, French CE. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. J Hazard Mater 2012;241-242:363–70. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057.

[53] Hessler CM, Wu M-Y, Xue Z, Choi H, Seo Y. The influence of capsular extracellular polymeric substances on the interaction between TiO2 nanoparticles and planktonic bacteria. Water Res 2012;46:4687–96. doi:10.1016/j.watres.2012.06.009.

[54] Wang Y-Y, Lai SK, So C, Schneider C, Cone R, Hanes J. Mucoadhesive Nanoparticles May Disrupt the Protective Human Mucus Barrier by Altering Its Microstructure. PLoS ONE 2011;6:e21547. doi:10.1371/journal.pone.0021547.

[55] Smith DJ, Underwood JC. Exopolymer production by intertidal epipelic diatoms. Limnol Oceanogr 1998;7:1578–91.

[56] Wolfstein K, Stal L. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effect of irradiance and temperature. Mar Ecol Prog Ser 2002;236:13–22. doi:10.3354/meps236013.

[57] Caudan C, Filali A, Lefebvre D, Spérandio M, Girbal-Neuhauser E. Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Aerobic Granular Sludges: Extraction, Fractionation, and Anionic Properties. Appl Biochem Biotechnol 2012;166:1685–702. doi:10.1007/s12010-012-9569-z.

[58] Long Z, Ji J, Yang K, Lin D, Wu F. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. Environ Sci Technol 2012;46:8458–66. doi:10.1021/es301802g.

[59] Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. Mater Methods 2013;3. doi:10.13070/mm.en.3.163.

[60] Chen C-S, Anaya JM, Zhang S, Spurgin J, Chuang C-Y, Xu C, et al. Effects of Engineered Nanoparticles on the Assembly of Exopolymeric Substances from Phytoplankton. PLoS ONE 2011;6:e21865. doi:10.1371/journal.pone.0021865.

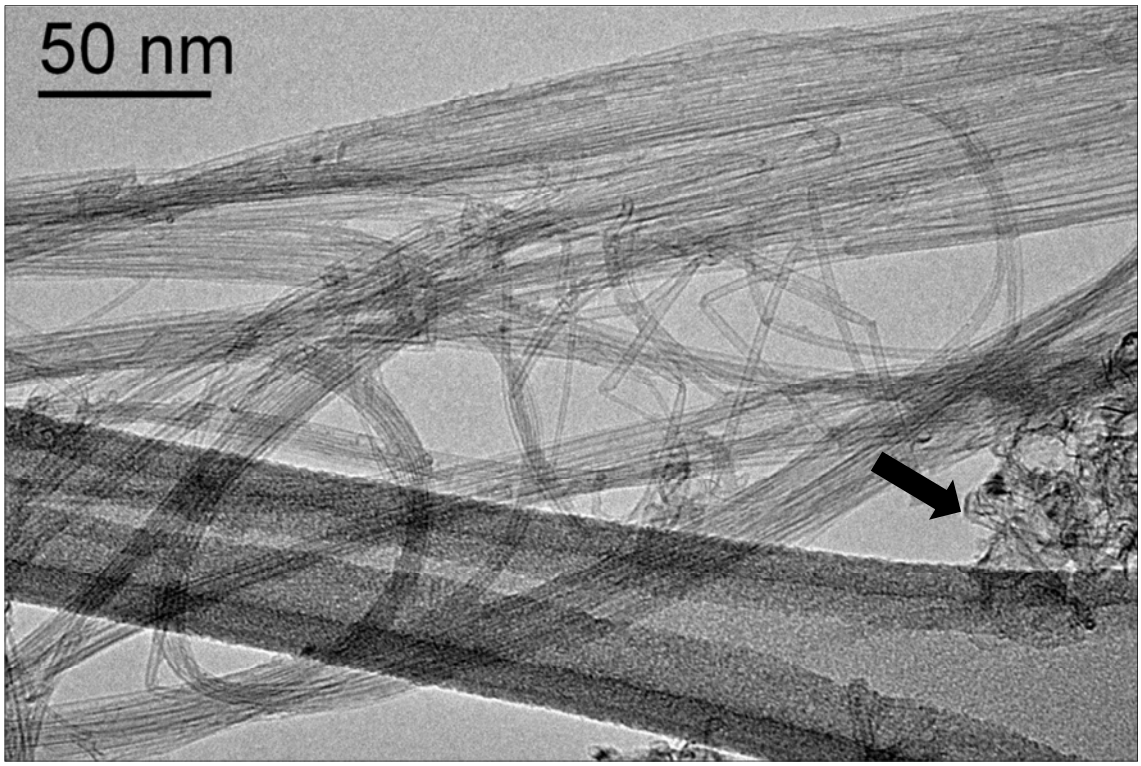
[61] Mu Q, Jiang G, Chen L, Zhou H, Fourches D, Tropsha A, et al. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. Chem Rev 2014:140613144559008. doi:10.1021/cr400295a.

[62] Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nat Nanotechnol 2013;8:772–81. doi:10.1038/nnano.2013.181.

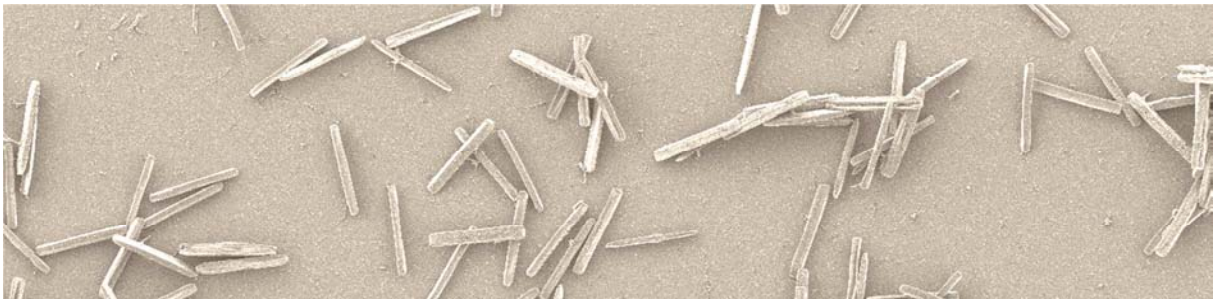
[63] Zhou X, Shu L, Zhao H, Guo X, Wang X, Tao S, et al. Suspending Multi-Walled Carbon Nanotubes by Humic Acids from a Peat Soil. Environ Sci Technol 2012;46:3891–7. doi:10.1021/es204657k.

[64] 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. doi:10.1002/etc.309.

Supplementary material



Supplementary material 1: TEM images of DWCNTs sonicated in culture medium without NOM. The arrow shows amorphous carbon.



CHAPITRE 6

AUTRE ESPECE, AUTRES EFFETS : EFFETS TOXIQUES, GENOTOXIQUES ET TERATOGENES DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LA DIATOMEE *NITZSCHIA LINEARIS*

Contexte

Dans les études précédentes, aucun des résultats obtenus n'a permis de montrer des effets toxiques des deux types de nanotubes de carbone dispersés ou non par de la MON. De même, ces études n'ont pu mettre en évidence une internalisation des NTC comme cela est parfois rapporté dans la littérature.

Dans cette dernière étude, nous avons testé l'effet de MWNTC toujours dispersés avec de la MON sur une autre espèce de diatomée benthique : *N. linearis*. Bien qu'appartenant au même genre que *N. palea*, cette diatomée benthique présente une taille bien supérieure et des caractéristiques écologiques différentes Chapitre 2 Cf. § 1.3). Les dimensions de *N . linearis* ont rendu possible une mise en œuvre aisée de tests de génotoxicité et de tératogènicité (respectivement quantification de cellules présentant des micronoyaux et celles présentant des anomalies de frustule), en plus des autres tests effectués sur *N. palea* (inhibition de croissance, intégrité cellulaire, inhibition des photosystèmes II). Une étude de l'interaction entre MWNTC et SPE, ainsi que l'étude structurelle des frustules de cette espèce, a également été mise œuvre.

Résultats marquants et conclusion

Cette dernière étude a permis de mettre en avant un effet génotoxique à partir de 1 mg L^{-1} et tératogène à 10 mg L^{-1} des MWNTC. L'intégrité cellulaire était également compromise en présence de MWNTC. Différentes approches microscopiques (fond clair, fluorescence et microscopie bi-photonique) ont également révélé une internalisation de MWNTC par *N. linearis*. De plus, ces derniers semblaient se concentrer en périphérie du noyau. Cette internalisation semblait donc à l'origine des effets observés. De plus, L'observation en MEB a révélé une taille des pores des frustules de *N. linearis* largement supérieure au diamètre des NTC et un passage de ces deniers à travers la paroi a pu être montré. Nos résultats ont aussi permis d'observer une forte interaction entre les EPS produits par *N. linearis* et les MWNTC, comme cela avait été observé chez *N. palea*. Enfin, cette étude a permis de mettre encore une fois en avant le rôle protecteur des SPE qui, en interagissant avec les MWCNT, permettait aux cellules algales, sur des temps longs, de reprendre leur croissance.

Ce chapitre est structuré sous la forme d'un article en préparation qui s'intitule:

Toxicity, genotoxicity and teratogenicity of Multi-walled carbon nanotubes on the freshwater benthic diatom *Nitzschia linearis*

Laurent Verneuil, Jérôme Silvestre, Olivier Giovannaï, Florence Mouchet, Laury Gauthier, Emmanuel Flahaut, Jean-Charles Boutonnet et Eric Pinelli

Toxicity, genotoxicity and teratogenicity of multi-walled carbon nanotubes on a common freshwater benthic diatom

Laurent Verneuil[1, 2], Jérôme Silvestre[1, 2], Olivier Giovannaï[1, 2], Florence Mouchet[1, 2,3], Laury Gauthier[1, 2,3], Emmanuel Flahaut[3,4,5], Jean-Charles Boutonnet[3,4,5] et Eric Pinelli[1, 2,3]

[1]EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, INP, UPS, Universite´ de Toulouse; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France
[2]CNRS; EcoLab; Castanet Tolosan, France
[3]Laboratoire Commun NAUTILE (CNRS, UPS, INPT, ARKEMA), Laboratoires EcoLab, CIRIMAT, GRL, France
[4]Institut Carnot CIRIMAT (Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France
[5]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France, and 6Toxicology & Environment Department Manager, ARKEMA, Colombes, France

Abstract

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in the presence of natural organic matter (NOM) were investigated for their potential toxicity, genotoxicity and teratogenicity in the benthic freshwater diatom *Nitzschia linearis* (Agardh) W. Smith (*N. linearis*). The results showed a significant toxicity after 48 h of cell exposure to $MWCNTs_{+NOM}$. The EC_{50} was 12.9 mg L^{-1}, and the number of cells presenting nuclear anomalies (micronuclei) in exposed diatoms was four times higher at 1 mg L^{-1} and six times higher at 10 mg L^{-1} than in the control cultures. Frustule abnormalities were two times higher in the cultures exposed to 10 mg L^{-1} MWCNTs. After 144 h of exposure, a global decrease in the effects was observed over time, and only significant growth inhibition was observed in cultures exposed to 10 mg L^{-1} MWCNTs. The presence of MWCNTs in some cells, mainly around the nucleus, was observed by bright field microscopy and confirmed by two-photon excitation microscopy (TPEM). Scanning electron microscopy (SEM) also showed that the frustule of *N. linearis* was inefficient in preventing the uptake of MWCNTs. Finally, strong affinity of MWCNTs for the biofilm was observed. Staining with Alcian blue followed by microscopic observation revealed an interaction between MWCNTs and extracellular polymeric substances (EPS) produced by *N. linearis*. The strong adherence and agglomeration of MWCNTs to EPS could have increased the growth inhibition by providing shade at an early time of exposure. This could also explain the growth resumes of *N. linearis* exposed to weak MWCNT concentrations (0.1 mg L^{-1}; 1 mg L^{-1}) that was observed over time.

Correspondance: Eric Pinelli, Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), Université de Toulouse; INP-ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, France.
Tel: +33 5 62 19 39 45. Fax: +33 5 62 19 39
E-mail: pinelli@ensat.fr

Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) are a form of allotropic carbon. They are one-dimensional nanoscale objects structured as a graphene sheet rolled up to form a cylinder, and the size and structure of CNTs confer particular properties that are applicable to many fields (Bouchard *et al.*, 2012; De Volder *et al.*, 2013; MarketsandMarkets, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012). This increased use has recently led to a sharp increase in their production at the industrial scale, mainly in the form of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Thus, the estimated annual production of CNTs has increased from approximately 0.5 Kt / year in 2007 (Mueller and Nowack, 2008) to more than 3 Kt / year in 2013 (Keller *et al.*, 2013). The production for 2015 is estimated to reach 9.2 Kt (iRAP, 2011) and is expected to reach 10.5 - 12 Kt in 2020 (Future

Markets Inc, 2013). The increased production and use of CNTs raise the question of their potential release and fate within the environment. This is especially the case for aquatic ecosystems where manufactured nanoparticles (NPs) are expected to accumulate at high concentrations (Gottschalk *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). This could be particularly the case of CNTs, supposed to be few or no biodegraded in aquatic environments (Kümmerer *et al.*, 2011; Parks *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). Thus, organisms inhabiting aquatic environments might be particularly exposed to CNTs.

Unicellular algae comprise the main part of the primary compartment of aquatic environments and are responsible for approximately 45% of the primary production in the world (Falkowski, 2004, 1994; Scala and Bowler, 2001). However, nano-toxicologists have only expressed mild interest in this area (von Moos and Slaveykova, 2013). Though algae play a vital role in the carbon cycle, to our knowledge the first studies on the effects of CNTs on, were only published in 2009 and onwards. However, several studies on other organisms have demonstrated that CNTs can cause harmful effects at various scales. They are known to be easily taken up by different prokaryotic and eukaryotic cells (Kostarelos *et al.*, 2007). Upon internalization, CNTs can interact with various cellular organelles (Kostarelos *et al.*, 2007; Magdolenova *et al.*, 2013 Moore, 2006; Mu *et al.*, 2014). This is particularly true for the actin cytoskeleton, which plays a key role in maintaining cell structure and is crucial for cytoplasmic transit and cytokinesis (Holt *et al.*, 2012; Shams *et al.*, 2014). It was also shown that disruption of the cellular machinery and cytoskeleton (centrosomes, and microtubules kinetocores) by CNTs could cause deficient migration of chromosomes during mitosis, leading to the formation of nuclear abnormalities (such as an incorrectly located nucleus, micronuclei, pycnosis, kariolysis, and aneuploidy; Sargent *et al.*, 2012, 2009; Zhu *et al.*, 2007). Other studies have also shown that CNTs and, more globally, NPs could interact with DNA, changing its conformation and gene expression (Heller, 2006; Hughes *et al.*, 2007; Stoccoro *et al.*, 2013; Zheng, 2003). Further works also suggest that CNTs could promote oxidative damage by inducing the overproduction of reactive oxygen species (ROS), especially in cases of cellular uptake (Petersen and Nelson, 2010). The presence of CNTs in cells as well as the overproduction of ROS can lead to teratogenic and genotoxic effects (Jacobsen *et al.*, 2008; Lindberg *et al.*, 2013; Magdolenova *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2007). Investigating the uptake of MWCNTs into organisms seems to be a key feature of understanding their toxicity. Thus, it is also important to evaluate and understand the means by which organisms defend against MWCNT contact and uptake.

Diatoms are unicellular algae widely distributed both in freshwater and marine ecosystems and are responsible for 25 % of the global primary production (Dugdale and Wilkerson, 1998). Diatoms are known to possess defensive means against natural particles. The first is the silicified cell wall called a frustule which constitutes an efficient protection against abrasion and the uptake of natural particles (Hamm *et al.*, 2003; Losic *et al.*, 2006). The frustule is also surrounded by a thin organic polymeric layer composed of carbohydrates and proteins (the diatotepum; Round *et al.*, 1990) which can also act as a physicochemical barrier against biocides and particulate matter. The morphological features of the frustule is species-specific and the shape and size of the pores (which enable exchange between the external and intracellular medium) strongly vary depending upon the species. Many diatom species are benthic and are able, like many other microorganisms, to form biofilms in the photic zone of aquatic environments. This feature is related to the diatom's ability to produce large amounts of extracellular polymeric substances (EPS). EPS are mainly composed of polysaccharides and proteins that form a microenvironment that is conducive to the development of diatoms and many other organisms. The also EPS represent a source of nutrients, either endogenously (mainly carbohydrates and proteins) or by entrapping soluble molecules and ions required for the proper development of organisms. EPS, like animal mucus, are known or expected to provide efficient protection against various biocides,

toxic metal ions and nanoparticles (Chen *et al.*, 2011; Flemming and Wingender, 2010; Verneuil *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010)
This study assessed the various effects of MWCNTs on the benthic freshwater diatom *Nitzschia linearis* (*N. linearis*). For an ecotoxicological purpose, this work was performed in the presence of an environmentally relevant concentration of natural organic matter (NOM; 10 mg L^{-1}) encountered in aquatic freshwater environments (Oeurng *et al.*, 2011). The first part of this study focused on the quantitative effects (growth inhibition, viability and photosynthetic quantum yield decreases, genotoxicity and teratogenicity). In an attempt to provide an explanation for the different observed effects, particular attention was paid to the cellular location of the MWNTCs *via* various non-destructive microscopy approaches, such as bright field microscopy and two photons excitation microscopy (TPEM). TPEM is a technique which allowing precise layer by layer observations, while limiting self-shadowing by the upper layers of the sample as well as the background noise caused by fluorescence from outside the focal plane (Denk et al., 1990). It was also shown that it also able to visualize CNTs into plant cells (Wild and Jones, 2009). Ways of MWCNTs uptake into cells was investigated with scanning electron microscopy (SEM). Finally, the role of the interaction between EPS and MWCNTs was also considered and discussed.

Methods

Algal strain and cultures

A strain of *Nitzschia linearis* (Agardh) W. Smith (*N. linearis*) was isolated from the Lot River (France, + 44° 28' 28.14", + 1° 38' 55.38") and was grown in SPE-1 medium (see S.1, pH 6.5 ± 0.1; autoclaved 20 min, 121 °C, 1 Bar). All bioassays were performed in a growth room at 15 ± 1 °C under a light/dark period of 16 h / 8 h provided by high pressure sodium lamps (VIALOX® NAV® SON SUPER 4Y®, 600 W, OSRAM GmbH) with an illumination of 40 µmol m^{-2} s^{-1}. Culture medium was always replaced with fresh medium 72 h before the experiments and prior to preparing the inoculum. All manipulations during the experiments were carried out in a class II Microbiological Safety Cabinet (Faster BHA 36, Faster s.r.l, Cornaredo, MI, Italy).

Natural organic matter and MWCNTs

MWCNTs (Graphistength® C100; Arkema-France) have 5 to 15 walls and an outer diameter ranging from a few nanometers to 20 nm. Their specific surface is 270m^2 g^{-1}. Elementary composition of MWCNTs was: Carbon (> 90 of total weight), Aluminum (1.4%), Iron (0.9%), and Molybdenum (735 ppm). However, metallic nanoparticles remaining from synthesis were always encapsulated in carbon shells or embedded in MWCNTs (determined by transmission electron microscopy). The NOM (Swannee river natural organic matter; Cat No. 1R101N; IHSS, St. Paul, MN, USA) and the preparation of suspensions were the same as those used by Verneuil *et al.* (2014). Briefly, three MWCNT suspensions (0.167 mg L^{-1}; 1.67 mg L^{-1}; 16.7 mg L^{-1}) were prepared from a stock suspension (100 mg L^{-1}) and sonicated for one hour. Then, they were autoclaved (20 min, 121°C, 1 bar). Finally, 16.7 mg of sterile NOM was added and sonicated again (as above) for 20 minutes prior to the experiments. A control was prepared as MWCNT suspensions but without adding any MWCNTs. In the absence of diatoms, all of the suspensions were stable over the considered period (144 h. Determined by optical density) and all MWCNTs tend to be individualized in the suspension (determined by Transmission electron microscopy; Verneuil *et al.*, 2014). Quantifiable residual metals in solution were Molybdenum (< 25 µg L^{-1} in a suspension containing 50 mg L^{-1}; determined by ICP-MS). The pH of suspensions were never significantly modified neither by the adding of MWCNTs nor of NOM.

Toxicity assays and sampling.

All biological assays were performed in 12 well plates (COSTAR 3513, Corning Incorporated). One plate was attributed per condition, with a negative control (Ctrl- ; SPE-1 + 10 mg L^{-1} of NOM), a positive control (Ctrl+ for genotoxicity assay; SPE1 + Hydrazine maleic at 5 10^{-6} M + 10

mg L^{-1} of NOM. Additional information is detailed below in the Assessment of Genotoxic and Teratogenic effects section) and MWCNTs treatments dispersed into 10 mg L^{-1} NOM ($MWCNTs_{0.1mg,}$ $MWCNTs_{1mg}$ and $MWCNTs_{10mg}$ corresponding to exposure concentrations of 0.1 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1} and 10 mg L^{-1}, respectively). Twenty four hours before the beginning of the exposure, each plate was inoculated with 1 mL of algal inoculum (1.25 10^4 cells mL^{-1}) to allow for growth recovery and adherence of *N. linearis* to the bottom of wells. Then, 1.5 ml of the MWCNTs suspensions were added to each well to a final volume of 2.5 mL and final concentrations of MWCNTs of 0.1, 1, 10 mg $L^{-1;}$ respectively $MWCNT_{0.1mg}$, $MWCNT_{1mg}$ and $MWCNT_{10mg}$, and a number of cells of $5x10^3$ cell mL^{-1}. The negative control plate was filled with 1.5 mL of $SPE\text{-}1.5_{+NOM}$ while the positive control plate was filled with SPE-1+NOM+Maleic Hydrazine (MH, described further in the Assessment of Genotoxic and Teratogenic effects section). After 48 and 144 h of exposure to MWCNTs, PSII measurements were performed directly in wells and three wells of each plate were scraped. These stages corresponded to the exponential growth phase (48 h) and the beginning of the stationary phase (144 h). A part of each sample was kept living and immediately used for viability tests (see below) while the rest was fixed using formaldehyde solution (3.6%; CAS: 50-00-0) for growth rates, genotoxicity and teratogenicity assessments.

Growth tests

Cell growth was assessed using a quick-read precision cell™ (Globe Scientific inc., Paramus, NJ) under a light microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA/US). Every day, three wells were scraped and counted twice. The growth rate (r) was calculated using the following equation corresponding to the growth factor of the original population:

$$r = \frac{n_x - n_0}{n_0}$$

n0 = 5 10^3 = number of cells in mL^{-1} at the beginning of the experiment, nx = the number of cells after x hours of growth, and x = 24 h, 48 h, 72 h or 144 h. For example, a growth rate of 4.2 corresponds to a cell number of n_0 * 4.2 + n_0 = 26000 cell mL^{-1}.

Viability tests

The lethal effects of MWCNTs on diatoms were assessed. Living samples were incubated for 10 min in Sytox green® (75 nM; Molecular Probes, Inc. 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402), a DNA intercalating agent which only penetrates cells with compromised plasma membranes. Then, the samples were observed using a fluorescence microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA/US) equipped with an Hg lamp (U-LH100HG, Olympus) using a 470 nm – 490 nm / 520 nm excitation/emission filter and a 500 nm dichromatic filter (U-MNB2, Olympus). The nuclei of dead (or injured) cells fluoresced in green while the nuclei of intact cells were not stained. Two counts were implemented per well. The rate of dead cells per 1,000 live cells (%) was determined as follows:

$$\dagger\,(\%) = \frac{\beta}{(\beta + \alpha)}\,100$$

$\dagger$ = rate of dead cells, β = the number of counted dead cells, and α = the number of living cells counted = 1000.

The interference between Sytox green and MWCNTs was assessed following the works of Horst *et al.* (2013). This method consists of labeling diatoms just before or right after the addition of MWCNTs and comparing the efficiency of labeling.

Effect on photosystem II quantum yield

The effect of exposure to MWCNTs on the photosystem II quantum yield ($PSII_{QY}$) was investigated using a pulse amplitude modulated fluorometer (Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) as described by Verneuil *et al.* (2014). Measurements were performed after 48 h and 144 h of exposure directly in well bottoms (Three measures per well, three wells per conditions) after a dark period of 30 min.

Assessment of Genotoxic and Teratogenic effects

The genotoxicity and teratogenicity of MWCNTs in *N. linearis* was assessed after 48 h of exposure using micronucleus assays (Debenest *et al.*, 2008) and by observation of frustule abnormalities. Maleic Hydrazine (1, 2-dihydro-3, 6-pyridazinedione, CAS n° 123-33-1; MH, 5 10^{-6} M) was used as a positive control. This molecule presents antimitotic properties, inducing the formation of micronuclei (Debenest *et al.*, 2008; El Hajjouji *et al.*, 2007; Marcano *et al.*, 2004) and frustule abnormalities in diatom cell cultures (Debenest *et al.*, 2008).

Genotoxicity tests were realized after labeling nuclei with Hoechst 33342 (stock solution: 2 g / L in deionized water; CAS n° 23491-52-3) diluted in samples to obtain a concentration of 40 µg mL^{-1}. Cells were then observed with a fluorescence microscope (Olympus BX41; λ excitation = 330 nm – 385 nm / λ emission = 420 nm – 700 nm, λ dichromatic filter = 500 nm; U-MWU2; Olympus America Inc. Center Valley, PA USA). The average number of micronucleated cells (MN) formed per cell cycle was calculated using the following equation:

$$MN\ (‰) = \frac{\frac{MN_{tot}}{\Delta}}{n_0}\ 1000$$

MN (‰) = Percentage per thousand of cells with micronucleus formed by cellular cycle, MN_{tot} = $\frac{\text{Micronucleated cells}}{\text{(Micronucleated cells + Normal cells)}}$ * n_x = total number of micronucleated cells in the considered population at a given exposure time (n_x = number of cells mL^{-1} after x hours of growth), Δ = ln (n_x/n_0) / ln (2) = number of cellular cycle, and n_0= number of cells mL^{-1} at the beginning of the experiment ($n_0 = 5\ 10^3$).

This equation was chosen considering that mitosis is necessary for the formation of both micronuclei and abnormal frustules and that the growth (number of mitoses) differed highly between conditions. Thus, a normalization of the counted number of anomalies per division cycle, which gave the number of abnormalities generated per cell cycle, appeared to be more pertinent and gave easily comparable results between conditions. The results obtained for Ctrl- and Ctrl+ (SPE1+NOM+MH) conditions were very similar to those obtained by Debenest *et al.* (2008).

The teratogenicity of MWCNTs was assessed by observing frustule abnormalities. Samples were treated with boiling hydrogen peroxide (H_2O_2, 30 %) for 10 min and then boiling hydrochloric acid (HCl, 35 %) for 5 min to digest all of the cell contents and extracellular-polymeric substances (AFNOR NF EN 13946). Samples were rinsed twice with deionized water, dried on a microscope slide and fixed with Meltmounts™ (diffraction index = 1.704; Cargille Meltmounts™). There are many types of morphological abnormalities described (*eg*. Deformed valve outline, Raphe modifications, change in striation pattern; Debenest *et al.*, 2008; Falasco *et al.*, 2009). Only cells with deformed valve outline (examples are shown in figure 3c and 4a) were quantified in this study. The number of abnormal frustules was expressed as a percentage calculated from the following equation:

$$AF\ (\%) = \frac{\frac{AFtot}{\Delta}}{n0}\ 100$$

AF (%) = Percentage of abnormal frustules formed per cellular cycle, *AFtot* = $\frac{\text{Abnormal frustules}}{\text{(abnormal frustules+ Normal frustules)}}$ n_x = the total number of abnormal frustules in the considered population at a given exposure time (n_x = number of cells mL^{-1} after x hours of growth), Δ = ln (n_x/n_0) / ln (2) = number of cellular cycle, and n_0= number of cells mL^{-1} at the beginning of the experiment ($n_0 = 5\ 10^3$).

Investigation of MWCNTs inside cells

MWCNT uptake by *N. linearis* was investigated by TPEM (LSM 7 *MP*, ZEISS, Oberkochen, Germany). The principle is similar to confocal microscopy. However, it allows the sample to be simultaneously excited two distinct wavelengths, while limiting self-shadowing by the upper layers of the sample and the background noise caused by fluorescence from outside the focal

plane.Samples were exposed for 48 h to MWCNTs, as in the toxicity tests. They were then fixed with formaldehyde (3.6 %) for 1 h before rinsing twice with ultra-pure water. A droplet was then prepared on a microscope slide before observation (excitation: 880 nm {~ 440 nm}, dichroic beam splitter: 760 nm, path 0.670 µm, filters < 485 nm / 500 nm - 550 nm; magnification: x400). Obtained images were then converted to 3D using the 3D plugin in ImageJ software (Rasband, 1997).

Extracellular carbohydrates labeling and frustule observations

Extracellular polymeric substances produced after 48 h of exposure were stained using Alcian blue following the protocol described by Verneuil *et al.* (2014). Briefly, culture medium was replaced with a staining solution of Alcian blue (0.1%; CAS n° 33864-99-2), acid acetic (0.5 M), formaldehyde (2%) and glutaraldehyde (2%) prepared in cacodylate buffer (0.15 M). Samples were incubated 24 h. The staining solution was then removed and samples were rinsed twice with cacodylate buffer (0.15 M) before being observed in situ with an inverted microscope (IW51, Olympus, Center Valley, PA, X 100). In the case of SEM observations, samples were prepared as above but the diatoms were grown and exposed on a microscope slide. After fixation and drying, the slides were stacked on an SEM mount and platinum-coated prior to observation (JEOL JSM-6700F; 3kV; detection mode; Secondary Electron Imaging). The structure of the frustules was also observed by SEM. Organic compounds (cellular content and EPS) were digested following the normalized AFNOR protocol (NF EN 13946) as previously described. After rinsing, samples were dried on the SEM mount and observed as above with the voltage switched to 5kV.

Statistical analyses

All statistical analyses were implemented using Sigmaplot 12.0 statistical software (Systat Software, San Jose, CA). Significant differences between conditions for growth, viability and MN were determined by analyses of variance (ANOVAs). In the case of significant differences, the Holm-Sidak multiple comparison method was subsequently implemented. Due to the non-parametric results of $PSII_{QY}$ and the frustule abnormalities (48 h), ANOVA on ranks was preferred. In all cases, two conditions were considered significantly different when $p < 0.05$, and ± indicates the Standard Deviation.

Results

Growth, viability and PSII quantum yield

Different indicators of toxicity were used to assess the potential effects of MWCNTs on the freshwater benthic diatoms *N. linearis*. The results are summarized in Table 1. After 24 h of

Table 1: Summary results of toxicity tests. Lines one to four are growth rates after a given exposure time (24, 48, 72 h and 144 h). Lines five and six are the results of the quantum yield of photosystem II ($PSII_{QY}$) mesurements after 48 h and 144 h of exposure, respectively. Lines seven and eight shows the viability test results as a percentage of dead or injured cells after 48 h and 144 h of exposure, respectively. Values in gray represent the standard deviation. The groups on the same line that do not have identical letters are significantly different (p = 0.05).

	Control		Maleic Hydrazine		0.1 mg L^{-1}		1 mg L^{-1}		10 mg L^{-1}	
24h - Growth	0.63 0.19	a	1.13 0.40	a	0.65 0.19	a	0.56 0.18	a	0.38 0.15	a
48h - Growth	1.50 0.20	ab	1.40 0.30	ab	1.64 0.44	ab	1.85 0.19	a	0.80 0.48	b
72h - Growth	4.20 0.60	a	2.20 0.72	b	4.50 0.36	a	2.87 0.31	b	2.11 0.17	b
144h - Growth	6.33 0.64	a	3.42 0.32	b	6.37 0.96	a	5.42 0.78	a	2.43 0.36	c
48h - PSII	0.66 0.04	a	0.65 0.03	a	0.65 0.12	a	0.58 0.03	a	0.62 0.08	a
144h - PSII	0.65 0.01	a	0.68 0.05	a	0.64 0.06	a	0.59 0.01	a	0.61 0.04	a
48h - injured cells (%)	7.1 1.8	a	7.7 2.9	ab	9.4 3.3	ab	13.7 1.3	b	nc	
144h – injured cells (%)	2.9 1.0	a	4.2 1.9	a	3.2 0.2	a	5.5 3.9	a	nc	

exposure, no significant difference in growth was observed ($p = 0.29$). At 48 h, the growth of *N. linearis* was significantly lower in the presence of $MWCNTs_{10mg}$ while a hormesis effect was visible with $MWCNTs_{1mg}$. After 72 h of exposure to either $MWCNTs_{1mg}$ or $MWCNTs_{10mg}$, growth inhibition was significant. After 144 h of exposure, growth inhibition was significant only for diatoms exposed to $MWCNTs_{10mg}$. After 72 h and 144 h, a negative effect of MH on growth was observed. The EC_{50} of the assessed MWCNTs was 12.87 $mg.L^{-1}$ (Hill number = 2.89) after 48 h of exposure.

Viability tests revealed a significantly higher mortality rate of diatoms exposed to $MWCNTs_{1mg}$ compared to the Ctrl-. Viability assays in culture exposed to $MWCNTs_{10mg}$ were not assessed. Indeed, preliminary experiments showed that interference between the Sytox green and CNTs disrupted the responsiveness of the test.

$PSII_{QY}$ was not significantly affected either by the presence of either MWCNTs or MH regardless of concentration.

Genotoxicity and teratogenicity

Genotoxicity was evaluated by quantifying the number of micronucleated cells (figure 1a-b) induced by cell division. After 48 h of exposure, the amount of MN was ~ 4 times higher (24‰) for $MWCNTs_{1mg}$ and ~ 6 times higher (33‰) for $MWCNTs_{10mg}$ than in Ctrl- (5.9‰). Note that the MN for diatoms exposed to $MWCNTs_{10mg}$ is comparable to the MN of diatoms exposed to MH. However, $MWCNTs_{0.1mg}$ did not cause a significant increase in the number of micronucleated cells despite an increasing tendency (11.3‰).

Teratogenicity was evaluated by quantifying the number of abnormal frustules formed per cell cycle (figure 1c-d). After 48 h of exposure, only cultures exposed to $MWCNTs_{10mg}$ presented a

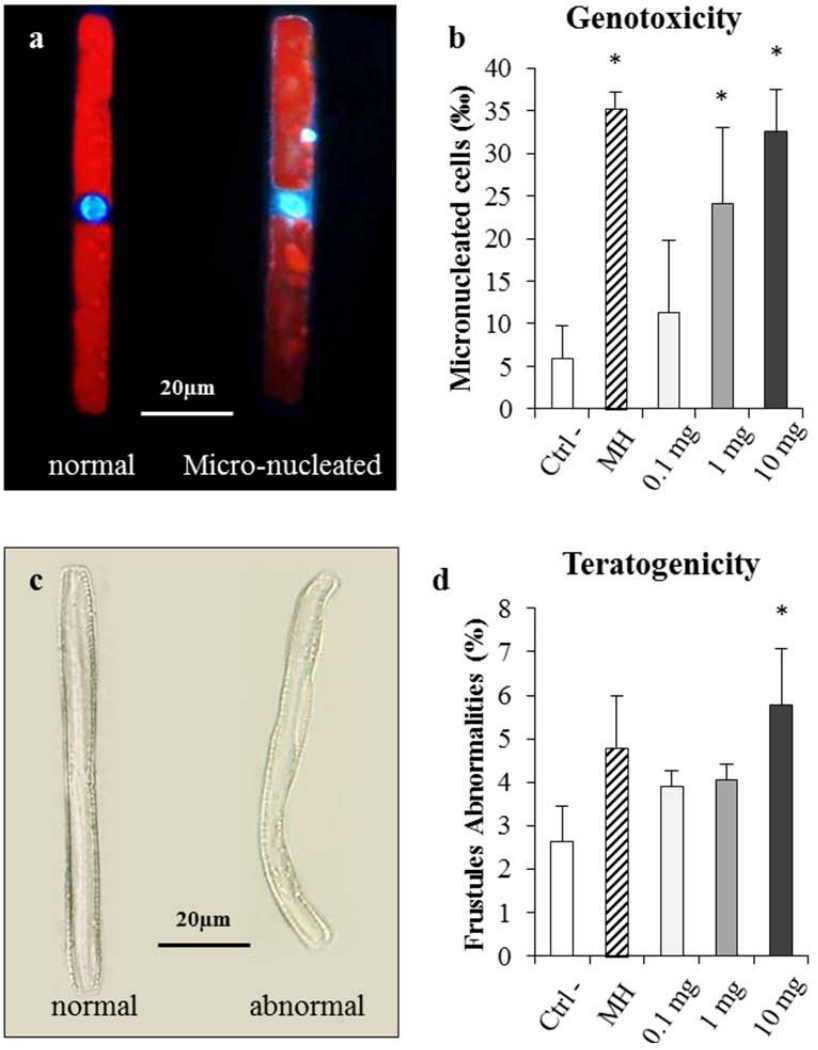


Figure 1: Results of genotoxicity and teratogenicity assays after 48 h of exposure. (a) Examples of a normal cell and a micro-nucleated cell observed by fluorescence microscopy after labeling DNA with Hoechst 33342. A pycnosis (condensation of the DNA inside the nucleus) is observed in the case of the micro-nucleated cell. (b) The number of micronucleated cells formed by the cell cycle after 48 h of exposure to MWCNTs and Maleic-hydrazine (MH). (c) Examples of a normal frustule and a frustule presenting abnormalities. (d) The results of counting frustules with abnormalities after 48 h of exposure (error bars are the standard deviation, and * represents a significant difference compared to the negative control (Ctrl- = negative control). CTRL+ = exposed to maleic hydrazine; MH = positive control.

significant increase of frustule abnormalities, which was approximately two times higher (5.8%) than in Ctrl- (2.5%).

Interactions between MWCNTs and frustule

The potential uptake of MWCNTs into the cell was investigated with SEM of both the external and internal views of the diatoms (Figure 4). The observation of samples exposed to $MWCNTs_{1mg}$ revealed MWCNTs adhering to the frustule surface (Figure 4a-b). Some of the MWCNTs had one extremity entering into the pores (Figure 4c). A specific observation of the frustule ornamentations showed no secondary network in the external view of the pores. An internal view of these pores allowed for observation of a heterogeneous internal network presenting inside mesh diameters up to one hundred nanometers. These diameters were significantly larger than those of the MWCNTs used (Figure 4d-e).

MWCNT uptake and cellular location.

The presence of MWCNTs in the cytoplasm was investigated by bright field microscopy (Figure 2a), fluorescence microscopy (Figure 2b) and TPEM (Figure 3). Bright field microscopy revealed the presence of dark and ellipsoid structures in the cytoplasm of some cells that were similar in color to the MWCNTs. These structures were found almost exclusively in the area near the nucleus (Figure 2a-b). The TPEM confirmed the presence of MWCNTs in the cytoplasm. Furthermore, the observation of the internal cell highlighted the specific accumulation of MWCNTs in the area surrounding the nucleus (Figure 3c-d). However, neither observation provided any evidence that MWCNTs are found inside the nucleus.

Adherence to the biofilm

The adherence of MWCNTs to the biofilm formed by *N. linearis* was investigated by photonic microscopy after the EPS was fixed and labeled using Alcian blue. Direct observations of the bottom of the well with an inverted microscope revealed that after 48 h exposure to different concentrations of MWCNTs, MWCNTs were preferentially distributed on the EPS (Figure 5). In the case of $MWCNTs_{1mg+NOM}$, most of the EPS was still visible. However, there were many small clusters on the surfaces of the MWCNTs. In the diatoms exposed to $MWCNTs_{10mg}$, the entire surface of the EPS was covered by MWCNTs. SEM observations led to similar conclusions.



Figure 2: Microscopy observation of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) cells after 48 h of exposure to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotube dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$). (a) Bright field microscopy highlighting globular dark structures located around the nucleus (largest red circle), which probably contain $MWCNTs_{+NOM}$. (b) Observation of the same cell in fluorescence microscopy after DNA staining with Hoechst 33342. DNA appears blue. It can be noted that the dark structures previously observed are also visible hiding a part of the nucleus (small embedded red ellipse).

Discussion

Effect of MWCNTs on growth, cellular integrity and PSII quantum yield

This study shows a significant dose-dependent growth inhibition caused by MWCNTs on *N. linearis* (Table 1, S.2). A similar response to the same MWCNTs on another diatom species of the same genus was already reported (Verneuil *et al.*, 2014). Though not assessed here, the growth decreases may be partially explained by shading

caused by MWCNTs, which is commonly observed in algae in the ranges of concentrations at which MWCNTs are used (Long *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2011). A decrease in cellular integrity from exposure to $MWCNTs_{1mg}$ was also observed (Table 1). This could be caused by the physicochemical perturbation of the cell membrane by MWCNTs. This perturbation could leaded to oxidative stress generated by ROS overproduction, which has already been observed in different cell types exposed to CNTs (Kang *et al.*, 2008a; Long *et al.*, 2012; Shvedova *et al.*, 2012). Alternatively, disruption to the cell wall and cell membrane could induce cellular apoptosis or necrosis. Such effects may have caused the observed growth inhibition. ROS is also known to have deleterious effects on $PSII_{QY}$ by inhibiting the repair of photo-damaged PSII (Nishiyama *et al.*, 2006; Saison *et al.*, 2010). In this study, $PSII_{QY}$ was never significantly affected by MWCNTs. This lack of effect on the $PSII_{QY}$ indicates the weak role of ROS in the toxicity of the tested CNTs. These results are in line with previous studies which expected that the effects of CNTs on photosystems are more related to the presence of toxic concentrations of metals from CNTs synthesis than the presence of CNTs themselves (Schwab *et al.*, 2011; Verneuil *et al.*, 2014; Pulskamp *et al.*, 2007). In this study, the deleterious effects caused by MWCNTs could not have been related to the overproduction of intracellular ROS.

Genotoxicity

Numerous studies using different biological models have highlighted the genotoxicity of NPs (Magdolenova *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Several of these were concerned with the genotoxic effects of CNTs and assessed the formation of micronucleated cells (Magdolenova *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2009). Micronuclei are nuclear aberrations formed during cell division that result from errors in the migration of whole or partial chromosomes during mitosis. This can result from (i) a double-stranded break in DNA that prevents binding of the chromosomal fragments to the mitotic spindles (clastogenic effect), or (ii) a disruption of molecules that control cell division, such as the centrosomes, microtubules or kinetochores (aneugenic effect) (Larmarcovai *et al.*, 2007). The results of this study highlighted an increased number of micronucleated cells formed per cellular cycle after 48 hours of exposure to $MWCNTs_{1mg}$ and $MWCNTs_{10mg}$ (figure 1a-b). As already observed in the assessment of the effects of SWCNTs, this increase appeared to be dose-dependent (Lindberg *et al.*, 2013). Thus, the exposure to $MWCNTs_{1mg}$ and $MWCNTs_{10mg}$ led to approximately four-fold and six-fold higher quantities of MN, respectively. Moreover, the number of MN in the case of $MWCNTs_{10mg}$ was similar to that observed for Ctrl+. The genotoxic effects of CNTs are often attributed to two mechanisms. The first is an overproduction of ROS resulting from the direct contact of CNTs and the cell surface or the presence of CNTs inside the cells. An excessive presence of ROS can disrupt cellular metabolism, and in the case of CNT uptake. Direct interaction with the cytoskeleton or centrosomes and other proteins can also disrupt chromosome migration (Magdolenova *et al.*, 2013; Sargent *et al.*, 2012). Though not assessed in this study, the lack of a decrease in $PSII_{QY}$ indicates that ROS overproduction did not occur in any appreciable manner. Moreover, the presence of MWCNTs around the nucleus favor a direct interaction between MWCNTs and the molecules implicated in mitosis. However, further studies are needed to fully understand the implication of these different mechanisms in the observed effects.

Teratogenicity

The abundance of abnormal frustules, which demonstrate teratogenic effects, can be used as a sub-lethal toxicity indicator of various pollutants (Debenest *et al.*, 2008). Micronuclei are abnormalities related to cellular dysfunctions that appear during the reformation of each additional frustule valve at the end of mitosis. Frustule abnormalities are expected as the result of perturbations of the cytoskeleton and other proteins implicated in silica vesicle transport and deposition (Debenest *et al.*, 2010). In this study, a significant increase in the abnormal frustules was observed after 48 h of exposure to $MWCNTs_{10mg}$ (Figures 3c-d). This could result from a direct

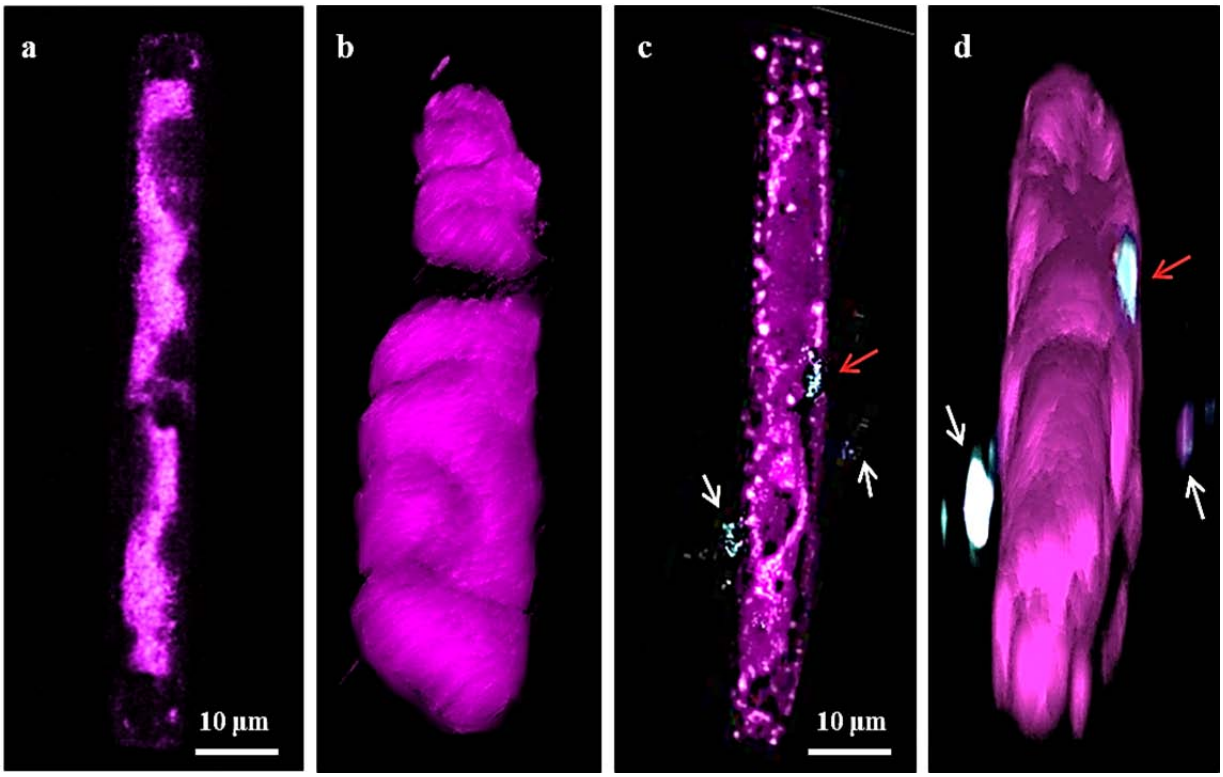


Figure 3 : Two photon excitation microscopy (TPEM) observation of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) after 48 h of growth in control culture (a-b) and in culture exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$). (a) Tomographic Image of the central plane of the cell. (b) 3D reconstruction of the cells from different planes observed during exposure. Chloroplasts appear in purple while MWCNTs are in blue (false colors). (c) Tomographic Image of the central plane of the cell showing MWCNTs both on the outside of the cell (white arrows) and centrally located inside the cell (red arrow). MWCNTs inside the cell seem to fit the shape of the nucleus. (d) Tomographic reconstruction of the cells from different planes observed. White arrows indicate $MWCNTs_{+NOM}$ outside the cell while red arrows indicate internalized $MWCNTs_{+NOM}$.

interaction of MWCNTs with the constituting proteins of the cytoskeleton, such as the microtubules system and other microfilaments involved in cell division (Holt *et al.*, 2012; Shams *et al.*, 2014). The interaction of MWCNTs with the organelles surrounding the nucleus could have also disrupted their functioning. For example, the interactions of MWCNTs with the rough endoplasmic reticulum (RER) and ribosomes as well as RNA that they translate may have perturbed normal protein synthesis (Moore, 2006; Yuan *et al.*, 2011). Thus, the direct interaction between MWCNTs and molecules involved in silica transport and deposition in addition to the disruption of their synthesis could have contributed to errors in the migration and layout of silica vesicles during frustule synthesis.

Tracking MWCNTs inside the cells

The cellular uptake of MWCNTs has often been reported in the literature and highlighted as being responsible for numerous deleterious effects at the cellular level. CNTs uptake by different cell types has been previously observed (Chen *et al.*, 2010; Sargent *et al.*, 2012), including unicellular algae (Long *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2012). In this study, different microscopy approaches were implemented in investigating the uptake of MWCNTs by *N. linearis* in an attempt to explain the toxic, genotoxic and teratogenic effects observed. These methods were performed after conservative preparation methods. An initial approach consisted of bright field and fluorescence microscopy observations, which revealed dark globular structures mainly located around the nucleus in some of the cells exposed to MWCNTs (Figure 2). Unfortunately, these easily implementable techniques did not enable us to distinguish the exact cellular location of the MWCNTs or determine whether they surrounded the nucleus or were within the nucleus. Moreover, this conclusion was only based on the

observations of darkened cellular areas, which can be attributed to MWCNTs, cellular inclusions or necrotic figures. Nonetheless, these observations have motivated further investigations. TPEM has confirmed the presence of MWCNTs in some *N. linearis* cells (Figure 3). This technique, which is similar in principle to confocal microscopy, allows for the specific visualization of MWCNTs and their exact subcellular location (Wild and Jones, 2009). As already observed in other cellular models (Chen *et al.*, 2010) and based on the observations made with bright light and fluorescence microscopy (figure 2), the MWCNTs appeared to preferentially accumulate around the nucleus. MWCNTs could accumulate in organelles such as the rough endoplasmic reticulum (RER) and the Golgi through endosomes resulting from endocytosis (Kam *et al.*, 2006; Kam and Dai, 2005; Shi *et al.*, 2011), though the modalities of endocytosis (fluid phase, clathrin-coated pit, caveolae-mediated, etc.) remain uncertain (Moore, 2006). This accumulation could have potentially caused disruptions at the cellular and molecular scale, which may have caused the genotoxic and teratogenic effects.

Frustule patency to MWCNTs

The frustule constitutes a physical barrier between the external environment and the cell membrane, presenting pores as privileged exchange areas between the extracellular and

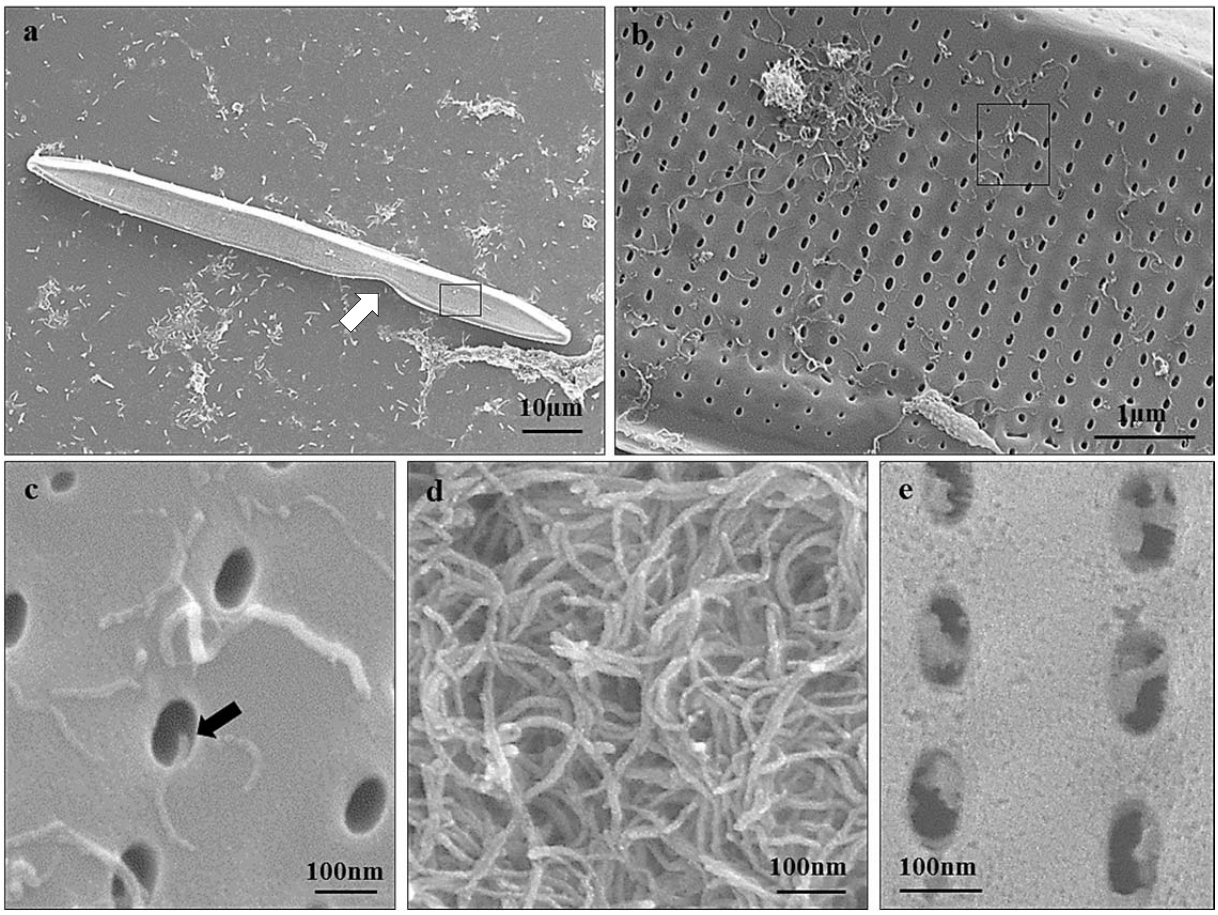


Figure 4 : SEM observations. (a) *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes ($MWCNTs_{1mg}$) dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$) for 48 h and fixed with a solution of alcian blue. A frustule abnormality can be noted (black arrow). (b) Higher magnification of (a) revealed the predominant presence of individual MWCNTs on the surface of the frustule. (c) Higher magnification of (b) highlighting an individual MWCNT penetrating into a pore (black arrow). (d) A sample of $MWCNTs_{+NOM}$ used for this study. (e) Internal view of the frustule of *N. linearis* showing the internal pore structure after digesting of cell contents and extracellular-polymeric substances (AFNOR protocol ; NF EN 13946). This view clearly highlights the pore size (up to ~ 100 nm), which is far greater than the diameter of MWCNTs, suggesting a possible contact between the MWCNTs and the cell membrane.

intracellular environment. Despite this, the frustule is expected to provide efficient protection against various particulate entities such as viruses, bacteria and natural particles (Hamm *et al.*, 2003; Losic *et al.*, 2006) and MWCNTs (Verneuil *et al.*, 2014). This is due to both the composition (amorphous silica) of the frustule, the nanometric mesh inside the pores, as well as the diatotepum. The pores themselves and their internal mesh, however, vary widely depending on the species. Their apertures may vary from a few nanometers to several hundred nanometers (Hofmann *et al.*, 2013; Losic *et al.*, 2006 ; Round *et al.*, 1990). They might therefore provide more or less efficient protection against the uptake of MWCNTs into the cell depending on the species. The results of this study highlighted the presence of MWCNTs inside some cells of *N. linearis* as well as genotoxic and teratogenic effects, indicating that MWCNTs were internalized despite the presence of a frustule and a surrounding diatotepum. In this study, SEM was used to understand the extent to which the frustule of *N. linearis* was permeable to MWCNTs. Observations of the external side of the frustule in exposed cultures revealed that MWCNTs enter into the pores through one tip (Figure 4c), as described in liver cells (Shi *et al.*, 2011). Analysis of the internal surfaces of the frustule of *N. linearis* confirmed this by revealing nanoscale uneven mesh within the pores. The mesh presents apertures up to one hundred nanometers (Figure 4d-e). Thus, contrary to what was observed for *N. palea* (Verneuil *et al.*, 2014), the internal structure of the pores of *N. linearis* did not represent an efficient barrier against the penetration of MWCNTs into the cells. These observations also emphasize a direct interaction between the frustule and some individual MWCNTs (Figure 4a, b). This adherence may result from the interaction of biological molecules on the surface of the frustule, such as the EPS or the diatotepum constitutive polymers surrounding the frustule (Mu *et al.*, 2014). Interestingly, this interaction was not observed in *N. palea* (Verneuil *et al.*, 2014) and could result in a different composition of molecules surrounding the frustule. The presence of mostly individualized MWCNTs close to the pores may facilitate their internalization by the cell. In the case of *N. linearis*, the cellular uptake of MWCNTs clearly seemed to occur through these pores. In addition to the previous results obtained with *N. palea*, these findings highlight the pore structure of frustules as a critical parameter in the cellular uptake of MWCNTs by diatoms.

The role of EPS

The adherence and agglomeration of MWCNTs onto algae is often evoked to explain their effects. Some authors suggest an interaction between CNTs and the cell wall, especially in the presence of dispersed CNTs (Kang *et al.*, 2008a; Kang *et al.*, 2008b; Long *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2011). The interaction of CNTs with biomolecules produced by organisms, such as hydrophobic EPS, can strongly promote the adherence of MWCNTs on algae (Chen *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2014).

The observations of biofilms after EPS labeling showed that MWCNTs bound to the EPS produced by *N. linearis* after 48 h of exposure (Figure 5). In the case of $MWCNTs_{10mg,}$ EPS seemed entirely covered (figure 5c). Moreover, many cells were entirely wrapped in MWCNTs at the same concentration. This could explain the increased inhibition caused by $MWCNTs_{10mg}$ after 144 h of exposure. These results are consistent with a previous study that showed a strong interaction and agglomeration between dispersed MWCNTs and the EPS produced by the benthic diatom *N. palea* (Verneuil *et al.*, 2014). This adherence can lead to a decrease in the reactive surfaces of MWCNTs by wrapping the MWCNTs in EPS, promoting the formation of dense micrometric MWCNTs clusters. This mechanism could have also led to reduced quantities of MWCNTs dispersed in the water column, which has been observed in the aquatic environment with natural particles (Brouwer *et al.*, 2005; Staats *et al.*, 1999) and in vitro with manufactured nanoparticles (Jachak *et al.*, 2012; Luongo and Zhang, 2010). This can explain the recovery in the viability of *N. linearis* after 144 h of exposure and could also decrease the global toxicity of MWCNTs over time. EPS-promoted agglomeration might therefore constitute a global protection against both natural and manufactured

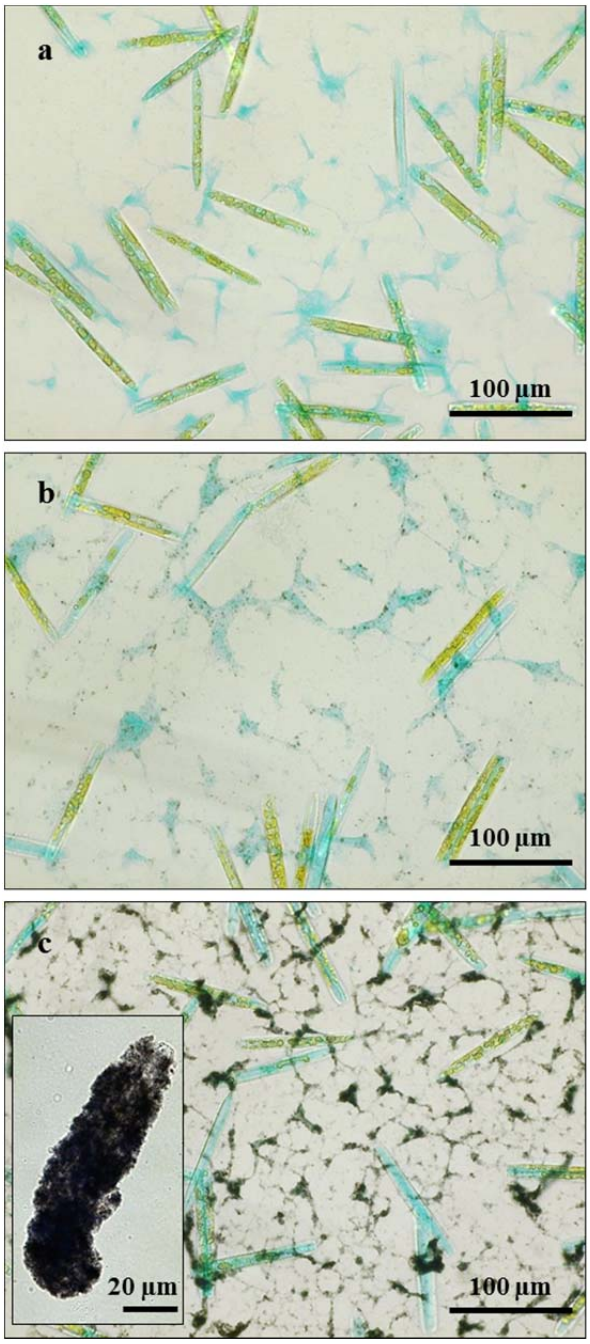


Figure 5 : In situ observation using an inverted microscope of biofilms of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) after labeling EPS with alcian blue. (a) Control culture. (b) Culture exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes ($MWCNTs_{1mg}$) dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$) for 48 h. (c) Culture exposed to 10 mg L-1 of MWCNTs dispersed with 10 mg L^{-1} of organic matter ($MWCNTs_{10mg+NOM}$) for 48 h. The left picture shows an *N. linearis* cell entirely wrapped in $MWCNTs_{+NOM}$. One extremity of the frustule can be observed on the upper right side. It is noted in (c) that the EPS network appears to be totally covered by MWCNTs whereas it is only partially covered in (b).

nanoparticles by (i) decreasing specific surface area and increasing agglomerate size, and (ii) chemically and physically isolating particles. However, this phenomenon could increase the persistence of MWCNTs in photoautotrophic biofilms.

Conclusion

The different effects of MWCNTs (0.1 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}) dispersed in the presence of NOM (10 mg L^{-1}) on *N. linearis*, a freshwater benthic diatom species, were investigated over a period of 144 h. It appeared that MWCNTs caused a dose-dependent growth inhibition after 48 h of exposure. A complete recovery of growth was observed for $MWCNTs_{0.1mg}$, whereas recovery was partial in the case of $MWCNTs_{1mg}$, and increased inhibition occurred for $MWCNTs_{10mg}$. A significant mortality induced by $MWCNTs_{1mg}$ was also observed after 48 h of exposure. The presence of MN in cultures exposed to MWCNTs was observed in a dose-dependent manner, as was an increase in frustule abnormalities, indicated that MWCNTs caused genotoxic and teratogenic effects in the diatom *N. linearis*. Microscopic observations revealed the presence of MWCNTs inside the cells and, specifically, the accumulation of MWCNTs close to nucleus. The accumulation in this region probably favors the development of genotoxic and teratogenic effects by interference probably both with DNA, RE and cytoskeleton. The uptake of MWCNTs appeared to occur via the pores of the frustule and seems responsible for the observed effects. Unlike another species of the same genus (*N. palea*, (Verneuil *et al.*, 2014), the frustule of *N. linearis* does not have a fine enough pore structure to prevent the MWCNT uptake. This indicates that the cellular uptake of MWCNTs by diatoms can be determined by the size and structure of the frustule pores.

Acknowledgments

We thank the Lacq Research Group (Arkema, France) for supplying the MWCNT suspensions. Part of the present study was achieved in the framework of the public/private joint research laboratory NAUTILE (NAnotUbes et ecoToxIcoLogiE; Arkema France–

CNRS/INPT/UPS). We acknowledge Stephane Du Plouy from the Common Service for Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy (Université Paul Sabatier, Toulouse, France) for his help. We also acknowledge the common service for two photon excitation microscopy and Elisabeth Bellard from the IPBS (Institut de pharmacologie et de Biologie Structurale; Université Paul Sabatier, Toulouse, France).

Declaration of interest

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

Bouchard, D., Zhang, W., Powell, T., Rattanaudompol, U., 2012. Aggregation Kinetics and Transport of Single-Walled Carbon Nanotubes at Low Surfactant Concentrations. Environ. Sci. Technol. 46, 4458–4465. doi:10.1021/es204618v

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. Carbon 54, 175–191. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024

Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., Stal, L.J., 2005. Biogenic Stabilization of Intertidal Sediments: The Importance of Extracellular Polymeric Substances Produced by Benthic Diatoms. Microb. Ecol. 49, 501–512. doi:10.1007/s00248-004-0020-z

Chen, C.-S., Anaya, J.M., Zhang, S., Spurgin, J., Chuang, C.-Y., Xu, C., Miao, A.-J., Chen, E.Y.-T., Schwehr, K.A., Jiang, Y., Quigg, A., Santschi, P.H., Chin, W.-C., 2011. Effects of Engineered Nanoparticles on the Assembly of Exopolymeric Substances from Phytoplankton. PLoS ONE 6, e21865. doi:10.1371/journal.pone.0021865

Chen, R., Ratnikova, T.A., Stone, M.B., Lin, S., Lard, M., Huang, G., Hudson, J.S., Ke, P.C., 2010. Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. Small 6, 612–617. doi:10.1002/smll.200901911

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. Aquat. Toxicol. 88, 88–94. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.011

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 203. Springer New York, New York, NY, pp. 87–103.

Denk, W., Strickler, J., Webb, W., 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science 248, 73–76. doi:10.1126/science.2321027

De Volder, M.F.L., Tawfick, S.H., Baughman, R.H., Hart, A.J., 2013. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. Science 339, 535–539. doi:10.1126/science.1222453

Dugdale, R.C., Wilkerson, F.P., 1998. Silicate regulation of new production in the equatorial Pacific upwelling. Nature 270–273. doi:10.1038/34630

El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guiresse, M., Merlina, G., Revel, J.-C., Hafidi, M., 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. Mutat. Res. 634, 25–31. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.015

Falasco, E., Bona, F., Ginepro, M., Hlúbiková, D., Hoffmann, L., Ector, L., 2009. Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. Water SA 35. doi:10.4314/wsa.v35i5.49185

Falkowski, P.G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. Photosynth. Res. 39, 235–258. doi:10.1007/BF00014586

Falkowski, P.G., 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. Science 305, 354–360. doi:10.1126/science.1095964

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. doi:10.1038/nrmicro2415

Future Markets Inc, 2013. The global market for carbon nanotubes to 2020 (No. 70). Future Markets Inc, Dublin, Ireland.

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. Environ. Pollut. 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Hamm, C.E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., Smetacek, V., 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature 421, 841–843. doi:10.1038/nature01416

Heller, D.A., 2006. Optical Detection of DNA Conformational Polymorphism on Single-Walled Carbon Nanotubes. Science 311, 508–511. doi:10.1126/science.1120792

Hofmann, G., Werum, M., Lange-Bertalot, H., 2013. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Koeltz Scientific Books, Königstein.

Holt, B.D., Shams, H., Horst, T.A., Basu, S., Rape, A.D., Wang, Y.-L., Rohde, G.K., Mofrad, M.R.K., Islam, M.F., Dahl, K.N., 2012. Altered Cell Mechanics from the Inside: Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin. J. Funct. Biomater. 3, 398–417. doi:10.3390/jfb3020398

Hughes, M.E., Brandin, E., Golovchenko, J.A., 2007. Optical Absorption of DNA−Carbon Nanotube Structures. Nano Lett. 7, 1191–1194. doi:10.1021/nl062906u

iRAP, I.R. and P., Inc, 2011. Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphene and nanodiamonds: A global technology survey and market analysis. (No. ET-113). Stamford, CT, US.

Jachak, A., Lai, S.K., Hida, K., Suk, J.S., Markovic, N., Biswal, S., Breysse, P.N., Hanes, J., 2012. Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. Nanotoxicology 6, 614–622. doi:10.3109/17435390.2011.598244

Jacobsen, N.R., Pojana, G., White, P., Møller, P., Cohn, C.A., Smith Korsholm, K., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., Wallin, H., 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C_{60} fullerenes in the FE1-Muta^{TM}Mouse lung epithelial cells. Environ. Mol. Mutagen. 49, 476–487. doi:10.1002/em.20406

Kam, N.W.S., Dai, H., 2005. Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality. J. Am. Chem. Soc. 127, 6021–6026. doi:10.1021/ja050062v

Kam, N.W.S., Liu, Z., Dai, H., 2006. Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. Angew. Chem. 118, 591–595. doi:10.1002/ange.200503389

Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2008a. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! Langmuir 24, 6409–6413. doi:10.1021/la800951v

Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M., 2008b. Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotube Bacterial Cytotoxicity. Environ. Sci. Technol. 42, 7528–7534. doi:10.1021/es8010173

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.-P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A., 2007. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nat. Nanotechnol. 2, 108–113. doi:10.1038/nnano.2006.209

Kümmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. Chemosphere 2011;82:1387–92. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.069.

Larmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2007. Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. Bull. Cancer (Paris) 94.

Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Singh, R., Suhonen, S., Järventaus, H., Vanhala, E., Catalán, J., Farmer, P.B., Savolainen, K.M., Norppa, H., 2013. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. Toxicology 313, 24–37. doi:10.1016/j.tox.2012.12.008

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. Environ. Sci. Technol. 46, 8458–8466. doi:10.1021/es301802g

Losic, D., Rosengarten, G., Mitchell, J.G., Voelcker, N.H., 2006. Pore Architecture of Diatom Frustules: Potential Nanostructured Membranes for Molecular and Particle Separations. J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 982–989. doi:10.1166/jnn.2006.174

Luongo, L.A., Zhang, X. (Jackie), 2010. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. J. Hazard. Mater. 178, 356–362. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.01.087

Magdolenova, Z., Collins, A.R., Kumar, A., Dhawam, A., Stone, V., Dusinska, M., 2013. Mechanisms of Genotoxicity. Review of Recent in vitro and in vivo Studies with Engineered Nanoparticles. Nanotoxicology 1–73. doi:10.3109/17435390.2013.773464

Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A., Montiel, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of Allium cepa L. Environ. Res. 94, 221–226.

MarketsandMarkets, 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 (No. AD 2183).

Miranda, A.A., Shaikh, S.M., Sarode, P.R., Desai, P.V., 2012. Carbon Nanoparticle Toxicity to marine algae *Navicula longa* and *isochrysis galbana*. Indian J. Geo-Mar. Sci. 41, 331–337.

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ. Int. 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014

Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. Environ. Sci. Technol. 42, 4447–4453. doi:10.1021/es7029637

Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. Chem. Rev. 140613144559008. doi:10.1021/cr400295a

Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1757, 742–749. doi:10.1016/j.bbabio.2006.05.013

Oeurng, C., Sauvage, S., Coynel, A., Maneux, E., Etcheber, H., Sánchez-Pérez, J.-M., 2011. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. Hydrol. Process. 25, 2365–2378. doi:10.1002/hyp.7999

Parks AN, Chandler GT, Ho KT, Burgess RM, Ferguson PL. Environmental biodegradability of [^{14} C]SWNT by *Trametes versicolor* and natural microbial cultures found in New Bedford Harbor sediment and aerated wastewater treatment plant sludge: Environmental biodegradability of [^{14} C]SWNT. Environ Toxicol Chem 2014:n/a – n/a. doi:10.1002/etc.2791.

Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. Anal. Bioanal. Chem. 398, 613–650. doi:10.1007/s00216-010-3881-7

Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O'Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., Chen, K.L., 2011. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. Environ. Sci. Technol. 45, 9837–9856. doi:10.1021/es201579y

Pulskamp, K., Diabate, S., Krug, H., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol. Lett. 168, 58–74. doi:10.1016/j.toxlet.2006.11.001

Rasband, W.S., 1997. ImageJ.

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. The Diatoms: biology & morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge [England]; New York.

Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., Popovic, R., 2010. Effect of core–shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, Chlamydomonas reinhardtii. Aquat. Toxicol. 96, 109–114. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.002

Sargent, L.M., Hubbs, A.F., Young, S.-H., Kashon, M.L., Dinu, C.Z., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Siegrist, K.J., Battelli, L., Mastovich, J., Sturgeon, J.L., Bunker, K.L., Shvedova, A.A., Reynolds, S.H., 2012. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 745, 28–37. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.017

Sargent, L.M., Shvedova, A.A., Hubbs, A.F., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Friend, S., McKinstry, K.T., Battelli, L., Reynolds, S.H., 2009. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. Environ. Mol. Mutagen. 50, 708–717. doi:10.1002/em.20529

Scala, S., Bowler, C., 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. Cell. Mol. Life Sci. 58, 1666–1673. doi:10.1007/PL00000804

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? Environ. Sci. Technol. 45, 6136–6144. doi:10.1021/es200506b

Shams, H., Holt, B.D., Mahboobi, S.H., Jahed, Z., Islam, M.F., Dahl, K.N., Mofrad, M.R.K., 2014. Actin Reorganization through Dynamic Interactions with Single-Wall Carbon Nanotubes. ACS Nano 8, 188–197. doi:10.1021/nn402865e

Shi, X., von dem Bussche, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., Gao, H., 2011. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. Nat. Nanotechnol. 6, 714–719. doi:10.1038/nnano.2011.151

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E., 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharmacol. 261, 121–133. doi:10.1016/j.taap.2012.03.023

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30, 3891–3914. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.009

Staats, N., De Winder, B., Stal, L., Mur, L., 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. Eur. J. Phycol. 34, 161–169. doi:10.1080/09670269910001736212

Stoccoro, A., Karlsson, H.L., Coppedè, F., Migliore, L., 2013. Epigenetic effects of nano-sized materials. Toxicology 313, 3–14. doi:10.1016/j.tox.2012.12.002

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environ. Pollut. 185, 69–76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F.,

Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: "A sticky story." Nanotoxicology 1–11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Von Moos, N., Slaveykova, V.I., 2013. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 1–26. doi:10.3109/17435390.2013.809810

Wang, H., Wu, F., Meng, W., White, J.C., Holden, P.A., Xing, B., 2013. Engineered Nanoparticles May Induce Genotoxicity. Environ. Sci. Technol. 47, 13212–13214. doi:10.1021/es404527d

Wang, Y.-Y., Lai, S.K., So, C., Schneider, C., Cone, R., Hanes, J., 2011. Mucoadhesive Nanoparticles May Disrupt the Protective Human Mucus Barrier by Altering Its Microstructure. PLoS ONE 6, e21547. doi:10.1371/journal.pone.0021547

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. Aquat. Toxicol. 100, 194–201. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.001

Wild, E., Jones, K.C., 2009. Novel Method for the Direct Visualization of in Vivo Nanomaterials and Chemical Interactions in Plants. Environ. Sci. Technol. 43, 5290–5294. doi:10.1021/es900065h

Yuan, J., Gao, H., Sui, J., Chen, W.N., Ching, C.B., 2011. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on human hepatoma HepG2 cells: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA 25, 1820–1827. doi:10.1016/j.tiv.2011.09.022

Zhang L, Petersen EJ, Habteselassie MY, Mao L, Huang Q. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. Environ Pollut 2013;181:335–9. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.058.

Zhang, S., Shao, T., Kose, H.S., Karanfil, T., 2012. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. Environ. Toxicol. Chem. 31, 79–85. doi:10.1002/etc.724

Zheng, M., 2003. Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly. Science 302, 1545–1548. doi:10.1126/science.1091911

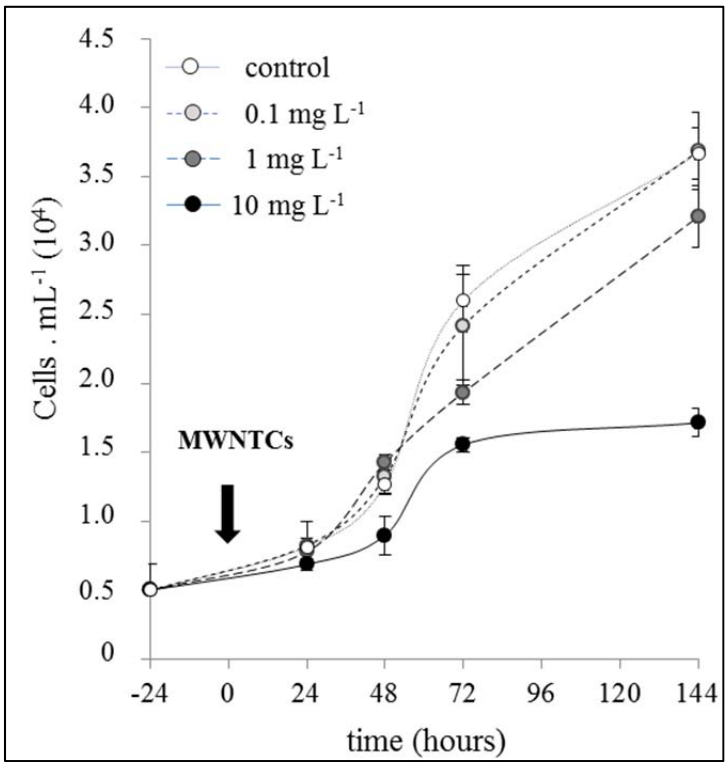
Zhou, X., Shu, L., Zhao, H., Guo, X., Wang, X., Tao, S., Xing, B., 2012. Suspending Multi-Walled Carbon Nanotubes by Humic Acids from a Peat Soil. Environ. Sci. Technol. 46, 3891–3897. doi:10.1021/es204657k

Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., Hong, Y., 2007. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. Nano Lett. 7, 3592–3597. doi:10.1021/nl071303v

Supplementary material:

Composition	Molecular weight	CAS N°	Concentration (mg L^{-1})
$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$	236.15	13477-34-4	60
$MgSO_4$ $7H_2O$	246.48	10034-99-8	25
K_2HPO_4	174.18	7758-11-045	10
Na_2CO_3	105.99	497-19-8	20
Na_2SiO_3 $5H_2O$	212.14	10213-79-3	60
H_3BO_3	61.83	10043-35-3	2.8
Na_2EDTA $2H_2O$	372.2	6381-92-6	4.36
$FeSO_4$ $7H_2O$	270.3	7782-63-0	1.5
$MnCl_2$ $4H_2O$	197.84	13446-34-9	0.18
$CuSO_4$ $5H_2O$	249.61	7758-99-8	0.0001
$ZnSO_4$ 7H2O	287.54	7446-20-0	0.02
$CoCl_2$ $6H_2O$	237.84	7791-13-1	0.01
Na_2MoO_4 $2H_2O$	241.92	10102-40-6	0.02
H_2SeO_3	128.97	7783-00-8	0.0016
$NaVO_3$	121.93	13718-26-8	0.0012
Thiamine HCl : $C_{12}H_{17}CI$ N_4OS. HCL	300.18	67-03-8	0.01
Vitamine B12 : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1355.37	68-19-9	0.0005
Biotine (B7) : $C_{10}H_{16}N_2SO_3$	244.31	58-85-5	0.00055

Supplementary material 1: SPE-1 medium composition. The pH was adjusted to a range of 6.4 to 6.6 with HCl and autoclaved for 20 min at 121°C and 1 Bar. The medium is a combined composition of CHU10 medium for macro-elements and a Combo medium for iron, microelements and vitamins.



Supplementary material 2: Growth kinetics of *N. linearis* over time under the different assessed conditions. Significant differences between conditions are given in Table 1.



CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

1 Comparaison des effets des DWNTC et des MWNTC chez *N. palea*

Les effets des nanotubes de carbone double-paroi (DWNTC) et multi-parois (MWNTC) sur la croissance, l'intégrité des photosystèmes II (PSII) *via* des mesures du rendement photochimique quantique des photosystèmes II, et la viabilité de *Nitzschia palea* (*N. palea*), ont été évalués selon la même méthodologie, après dispersion par ultrasons en présence ou non d'une concentration réaliste d'un point de vue environnemental de matière organique naturelle (MON ; 10 mg L^{-1}). Les effets de MWNTC dispersés avec de la MON ont également été évalués sur la diatomée *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) dans des conditions expérimentales similaires.

En l'absence de MON, l'effet des DWNTC est toujours supérieur à celui des MWNTC. Ainsi, la CE_{50} après 48h d'exposition des DWNTC est estimée à 44,25 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 36,27/64,78 mg L^{-1} ; N de Hill 1,42), alors que celle des MWNTC est d'environ 119 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 77/201 mg L^{-1} ; N de Hill 1.642). En revanche, ni l'intégrité des photosystèmes II (PSII), ni l'intégrité cellulaire ne sont impactés par l'exposition directe aux nanotubes de carbone (NTC) chez cette espèce. Le fait que les DWNTC causent un effet plus important que les MWNTC sans dispersion par de la MON pourrait s'expliquer par une taille plus importante de agglomérats dans le cas des MWNTC, mais aussi par une surface spécifique beaucoup plus importante des DWNTC (980 m^2 g^{-1}) par rapport aux MWNTC (270 m^2 g^{-1}). Ainsi, pour une même concentration pondérale, les surfaces de contact des DWNTC sont théoriquement toujours plus importantes.

Les DWNTC et MWNTC dispersés avec de la MON causent une inhibition de croissance plus importante que sans MON. Cependant, l'inhibition est similaire entre les deux types de NTC. Dans le cas des DWNTC, la CE_{50} à 48h est de 7,49 mg L^{-1} pour la première expérience ($IC_{95\%}$ = 3,92/13,31 mg L^{-1} ; N de Hill 0,59 ; Chapitre 3), et de 3.45 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 2.26/4.85 mg L^{-1} ; N de Hill 0.518 ; Chapitre 4) pour la seconde expérience. Dans le cas des MWNTC, elle est de 2,83 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 0,84/8,82 mg L^{-1} ; N de Hill 0,49 ; Chapitre 5) pour la première expérience, et de 2.53 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 1.99/3.53 mg L^{-1} ; N de Hill 1.225 ; Chapitre 4) pour la seconde. Ainsi, bien qu'ayant un diamètre inférieur à celui des MWNTC, les DWNTC causent un effet similaire après dispersion avec la MON. Ce résultat va à l'encontre de la plupart de ceux répertoriés dans la littérature indiquant une toxicité plus importante des NTC de faible diamètre (SWNTC et DWNTC) en comparaison de ceux à plus gros diamètres (MWNT ;

Jackson *et al.*, 2013). Ceci pourrait s'expliquer par une surface apparente qui semble similaire entre les MWNTC et DWNTC dispersés par la MON. Plus précisément, les observations microscopiques révèlent de nombreux DWNTC assemblés en faisceaux, y compris après dispersion par la MON, alors que les MWNTC sont bien individualisés. Ces faisceaux sont de diamètres similaires aux MWNTC individualisés (Chapitre 2 : Figures 5, 6 et 7). Partant de l'hypothèse que ce sont des surfaces de contact des NTC dont dépend l'importance des effets (Jackson *et al.*, 2013 ; Mouchet *et al.*, 2007), il est probable que, bien qu'ayant des surface spécifiques très différentes (voir ci-dessus), des surfaces apparentes (*i.e.* pouvant réellement entrer en contact avec les algues) similaires, entre les DWNTC assemblés en faisceaux, et les MWNTC individualisés, puissent causer des effets comparables, Ceci reste toutefois à confirmer car la méthode utilisée pour les observations au MET nécessitait une déshydratation des échantillons pouvant causer une certaine agglomération des NTC entre eux et ainsi mener à une mauvaise évaluation de la dispersion réelle en suspension dans l'eau.

La dispersion augmente fortement l'effet opacifiant des NTC en les suspendant de façon homogène dans la colonne d'eau. Ces résultats conduisent à une autre hypothèse qui est qu'une dispersion stable des NTC peut, en augmentant l'ombrage (particulièrement dans le cas d'organismes benthiques), fortement accroître l'inhibition de croissance. Cette hypothèse a été vérifiée à l'aide des dispositifs à double compartiments superposés (Chapitre 3 : Figure 1). Ainsi, alors qu'aucun effet d'ombrage significatif n'est causé par les NTC en absence de MON, leur dispersion par la MON en augmente indéniablement leur pouvoir obscurcissant (Chapitre 3 : Figure 3). Plus précisément, l'ombrage dans le cas de NTC jouerait un rôle prépondérant dans l'inhibition de croissance à partir de 10 mg L^{-1} de NTC. En revanche, il n'explique pas les effets significatifs observés à partir de 0,1 mg L^{-1} dans le cas des MWNTC (Chapitre 3 : Figure 3) et de 1 mg L^{-1} dans le cas des DWNTC (Chapitre 5 : Table 1). Ces résultats amènent à penser que les effets d'inhibition de croissance pourraient être associés à un contact direct entre les NTC et les algues. La nature de ces effets reste toutefois à déterminer.

Des paramètres de toxicité tels que l'intégrité des photosystèmes II (par mesures du rendement photochimique quantique des photosystèmes II; phyto-PAM) et la viabilité cellulaire (Sytox green®) ont alors été évalués. Aucun de ces paramètres n'est pourtant affecté chez *N. palea*, quelle que soit la concentration en NTC testée. Ces résultats indiquent que les NTC ne semblent pas perturber l'intégrité membranaire des cellules. Plusieurs études montrent que les effets observés sur les photosystèmes en présence de NTC sont plus

liés à une présence importante de résidus de synthèse métalliques (sous forme ionique ou nano-particulaire) qu'aux NTC eux-mêmes (Ge *et al.*, 2012 ; Kagan *et al.*, 2006 ; Matorin *et al.*, 2010 ; Shvedova *et al.*, 2012). Ici, les NTC utilisés ont été correctement purifiés et ne présentent que de faibles concentrations de résidus métalliques. Ainsi, à la concentration de DWNTC maximale utilisée (50 mg L^{-1}), les concentrations en Cobalt (~ 34 µg L^{-1}) et en Molybdène (~222 µg L^{-1}), représentent des doses respectivement 10 et 40 fois inférieures à celle causant un effet visible sur les algues (Chapitre 5 ; Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999 ; El-Sheekh *et al.*, 2003 ; Nagpal *et al.*, 2004). Dans le cas des MWNTC (50 mg L^{-1}) seule la concentration en Molybdène (~20 µg L^{-1}) augmente significativement (2 fois plus que dans le milieu de culture CHU n°10), mais reste environ 750 fois inférieure à celle connue pour causer de la toxicité chez les algues (Chapitre 3).

La comparaison de l'ensemble de ces résultats avec ceux de la littérature évaluant les effets de MWNTC chez différentes algues (principalement des algues vertes) met en avant des effets similaires, que ce soit en termes de CE_{50} (ou IC_{50}) ou d'inhibition des PSII. Ainsi, en absence de MON, Long *et al.* (2012) mesurent des valeurs d' IC_{50} à 96h pour l'algue *Chlorella* sp. variant de 41,0 ± 3 mg L^{-1} pour des MWNTC bruts d'environ 10 nm de diamètre, à 8,4 ± 4 mg L^{-1} pour des MWNTC d'environ 100 nm de diamètre. Schwab *et al.* (2011), évaluant cette fois les effets de MWNTC d'une dizaine de nm de diamètre, mesurent sur *Chlorella vulgaris* des CE_{50} à 96h de 24 mg L^{-1} et sur *Pseudokirchneriella subcapitata* de 36 mg L^{-1} dans des conditions comparables. La dispersion de ces mêmes MWNTC par de la MON (60 mg L^{-1}) diminue significativement les valeurs de CE_{50} à 96h pour *C. vulgaris* à 1,8 mg L^{-1} et, dans une moindre mesure, à 20 mg L^{-1} pour *P. subcapitata*. En utilisant des DWNTC synthétisés de la même manière que ceux de cette thèse, (Ø ~ 2,1 nm) et ayant été soit agités continuellement pendant deux semaines, soit soniqués pendant deux heures, Kwok *et al.* (2010) ont quantifié des $IC_{50\ à}$ 96h de respectivement et 22,7 mg L^{-1} et 1,86 mg L^{-1} sur la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana*. Dans tous les cas, les NTC dispersés, dans la mesure où le dispersant utilisé ne présente pas de toxicité propre, présentent des effets sur la croissance des algues très similaires entre eux et ceci indépendamment de leur nombre de parois ou de leur diamètre. Ces différentes études supposent l'action de trois mécanismes principaux pour expliquer les effets des NTC sur les algues : (i) l'ombrage (particulièrement dans le cas de NTC dispersés), (ii) l'induction de stress oxydant et (iii) l'agglomération aux organismes, ce dernier mécanisme pouvant conduire à l'aggravation des deux autres.

L'augmentation de la surface de contact entre les NTC et les cellules par la dispersion joue probablement un rôle important dans l'inhibition de croissance observée. En effet, alors que

les NTC sont en temps normal agglomérés entre eux et forment des pelotes micrométriques à millimétriques (Chapitre 3 : Figure 4), la dispersion les maintient individualisés et donc à des tailles nanométriques. Une surface de contact plus importante entre les organismes et les NTC pourrait conduire à des interactions physico-chimiques importantes (*e.g.* forces de Van Der Waals), limitant ainsi les échanges gazeux, et les transferts de nutriments entre le milieu extracellulaire et les cellules. Ce phénomène est d'ailleurs suspecté être responsable de la déstructuration des parois et membranes, pouvant conduire à des disfonctionnements de ces dernières, voire conduire à une lyse cellulaire (Long *et al.*, 2012). Cette interaction est également suspectée être la cause d'une surproduction de radicaux libres oxygénés à l'origine d'un stress oxydant (Shvedova *et al.*, 2012 ; von Moos and Slaveykova, 2013). Cependant, l'absence d'effet toxique, notamment au niveau des PSII, décrits comme étant une cible importante du stress oxydant, ne va pas dans ce sens (Nishiyama *et al.*, 2006 ; Saison *et al.*, 2010). De plus, dans l'ensemble des expériences menées durant cette thèse, les mesures du rendement photochimique quantique des photosystèmes II, pour *N. palea* comme pour *N. linearis* n'ont jamais indiquées d'effet négatif des NTC sur l'intégrité des PSII (Chapitres 3, 5, 6). Ces résultats indiquent que, bien que ce dernier ne soit pas évalué dans cette thèse, le stress oxydant n'est pas ici un facteur déterminant dans les effets observés. Il est à souligner que la production modérée de radicaux oxygénés constitue, chez de nombreux organismes benthiques (*e.g.* bactéries, cultures cellulaires), un signal d'adhésion cellulaire à un substrat (Nachin *et al.*, 2005 ; Segui, 2004). Les organismes benthiques, tels que les diatomées, sont donc théoriquement tout à fait capables de gérer ce messager secondaire lors de leur adhésion aux substrats qu'elles colonisent, ainsi peut-être qu'en présence de NTC dans nos conditions expérimentales.

L'adhérence des NTC aux cellules peut perturber le fonctionnement des membranes et des parois, voire conduire à leur rupture. Comme nous l'avons vu, ce contact peut également limiter les échanges entre le milieu extérieur et la cellule et surtout, elle peut conduire à une diminution drastique de la quantité de lumière disponible pour les algues par un enrobage important de la cellule par les NTC, comme l'illustre bien la Figure 5c présentée dans le Chapitre 6. Il n'est pas non plus exclu qu'un enrobage important (c'est particulièrement le cas pour les expositions à 10 mg L^{-1} et 50 mg L^{-1} de MWNTC) puisse gêner par contrainte physique la mitose, particulièrement durant la cytodiérèse, en empêchant une bonne séparation des deux cellules filles. Ceci pourrait perturber une synthèse correcte de la nouvelle hypo-valve.

2 Comparaison des effets observés chez *N. linearis* et *N. palea* en présence de MWCNTs dispersés

Dans le cas de *N. linearis*, les MWNTC dispersés avec la MON présentent une CE_{50} à 48h de 12,87 mg L^{-1} ($IC_{95\%}$ = 10,37/36,86 mg L^{-1} ; N de Hill 2,89). Cette CE_{50} s'avère significativement plus importante que celles observées pour *N. palea* (~3 mg L^{-1}). Ces résultats pourraient en partie s'expliquer par une différence importante du taux de croissance de ces deux algues, le taux de croissance de *N. palea* étant cinq fois supérieur (dans les cultures contrôles après 48h) à celui de *N. linearis* dans nos conditions expérimentales. Cette différence est liée à l'écologie de l'espèce et aux conditions d'éclairement et de températures différentes pour chaque algue : *N. linearis* (3280 lux [= 40 µmol m^{-2} s^{-1}], 15±1°C et *N. palea* (5500 lux [= 66 µmol m^{-2} s^{-1}], 20±1°C) nécessaire à une bonne croissance de chacune des espèces étudiées. L'intégrité des PSII de *N. linearis* n'est pas non plus impacté par la présence des MWNTC. En revanche et contrairement à *N. palea*, une augmentation modérée, mais significative, de la mortalité (*i.e.* perte d'intégrité cellulaire) est observée (13,7% à 1 mg L^{-1} de MWNTC contre 7,1% pour les cultures contrôles). Ces résultats traduisent un mode d'action différent chez les algues exposées à ce type de NTC.

La faible taille de *N. palea* (la souche CPCC160) n'a pas permis une étude aisée d'anomalies génétiques en microscopie. Du fait de nombreuses anomalies des frustules, inhérentes à cette souche (probablement résultant des nombreuses années de culture in vitro ; Chapitre 2 Figure 1), l'évaluation des effets tératogènes n'a pas non plus semblé pertinente. En revanche, la souche de *N. linearis* (Chapitre 6) isolée pendant la thèse et présentant une taille cinq à six fois supérieure à celle de *N. palea* (100-120 µm contre 15-20 µm) a rendu possible ce type d'investigation. Il a été observé l'induction d'anomalies génétiques (micronoyaux) et d'effets tératogènes (anomalies de frustules) en présence de MWNTC dispersés avec de la MON. Plus précisément, le pourcentage de cellules micro-nucléées générées par cycle de division est multiplié par quatre après 48h d'exposition à 1 mg L^{-1} de MWNTC et par six dans le cas d'expositions à 10 mg L^{-1} de ces mêmes MWNTC.

Comme discuté dans le Chapitre 6, Les effets génotoxiques et tératogènes observés chez les organismes peuvent être liés à différents mécanismes. Concernant la génotoxicité, elle peut résulter à la fois d'effets clastogènes, c'est-à-dire de rupture double brin de l'ADN, et/ou d'effets aneugènes qui sont liés à un dysfonctionnement de la machinerie cellulaire

(centrosomes, cytosquelette, perturbation de la synthèse des protéines impliquées dans la division cellulaire...).

Les Micronoyaux sont des fragments de chromosomes ou des chromosomes isolés du reste du noyau principal. Ils résultent d'un dysfonctionnement cellulaire lors de la mitose. Plus précisément, ils se forment en cas de mauvaise migration d'un ou d'une partie d'un chromosome. Ceci peut résulter d'une action indirecte des NTC *via* l'induction de stress oxydant (Sargent *et al.*, 2012, 2009). Ce phénomène pourrait également se produire en cas d'interaction directe entre les MWCNT et différents constituants cellulaires. En effet, les résultats obtenus en microscopie photonique ainsi qu'en microscopie bi-photonique, mettent en évidence la présence de MWCNT à la périphérie des noyaux à l'intérieur des algues, témoignant d'interactions directes possibles des MWNTC avec l'ADN, le cytosquelette et/ou les protéines impliquées dans la division cellulaire (Chapitre 6 : Figures 2 et 3 ; Sargent *et al.*, 2012, 2009). Une action directe des NTC sur la machinerie impliquée dans la division cellulaire semble donc une hypothèse très probable. Une interaction entre les NTC et l'ADN est également envisageable.

Les effets tératogènes sur les diatomées (anomalies de frustule) peuvent, comme pour les effets génotoxiques, résulter d'une interaction avec le cytosquelette responsable de la structure cellulaire et de la migration des vésicules de silice lors de la reformation de l'hypo-valve du frustule en fin de mitose. Ils pourraient également interagir directement avec ces vésicules de silice ou avec les protéines responsables de leur migration jusqu'aux sites de déposition appropriés.

L'hypothèse qu'une internalisation des NTC dans les cellules puissent causer les effets délétères (génotoxiques, tératogènes, diminution de la viabilité) observés chez *N. linearis* semblait la plus plausible. Pour valider cette hypothèse, différentes techniques de microscopie, permettant de visualiser l'entrée et la localisation de MWNTC dans le cytoplasme de *N. linearis*, ont été mises en œuvre et ont permis de la confirmer (Chapitre 6). Ces dernières ont permis de valider une internalisation de NTC chez *N. linearis*. Des observations de cultures de *N. palea* en microscopie bi-photonique ont plus récemment été mises en œuvre (Annexe 5). Celles-ci confirment l'hypothèse d'une non-pénétration des MWNTC dans les cellules de *N. palea* comme cela est suggéré dans le Chapitre 3. Ceci est en accord avec le maintien de l'intégrité cellulaire rapportée chez cette espèce lors d'expositions à différentes concentrations de NTC.

Pour mieux comprendre comment les NTC ont pu entrer dans la cellule, et s'ils ont pu entrer

en contact avec la membrane dans le cas de *N. palea*, des études en MEB de la structure des frustules ont été mises en œuvre chez cette espèce et chez *N. linearis*.

Notre étude a clairement mis en avant le facteur déterminant que représente le frustule dans l'entrée des NTC dans la cellule chez les diatomées. En effet, la taille des pores et celle de leur maillage interne semblent déterminantes. Ainsi *N. palea* (la souche CPCC 160, dans nos conditions de culture) présente une maille de diamètre bien inférieur (< 10 nm) à celui de la grande majorité des MWNTC utilisés. En revanche, le maillage interne des pores de *N. linearis* présente des ouvertures d'un diamètre pouvant aller jusqu'à une centaine de nanomètres, taille bien supérieure au diamètre des plus gros MWNTC utilisés. De plus, des MWNTC pénétrant à l'intérieur des pores ont pu être observé (Chapitre 6 : Figure 4). Ces résultats confirment les hypothèses concernant les effets des MWNTC chez *N. linearis*. Ils vont également dans le sens d'une impossibilité de contact entre les CNT et la membrane chez *N. palea*, expliquant ainsi l'absence de perturbation de l'intégrité cellulaire chez cette espèce en cas d'exposition aux NTC (Chapitre 3 et 5).

3 Importance des substances polymériques extracellulaires sur les effets observés

Une diminution de l'inhibition de croissance causée par les DWNTC et MWNTC a été observée au cours du temps chez *N. palea*. Ceci est également vrai dans le cas des faibles concentrations de MWNTC (0,1 mg L^{-1} et 1 mg L^{-1}) chez *N. linearis*. Pour cette espèce, la diminution de l'intégrité cellulaire, les effets génotoxiques (cellules micro-nucléées) et tératogènes (anomalies de frustule ; Annexe 7, en complément de l'article présenté en Chapitre 6) n'étaient plus significatifs après 144h d'exposition. Ainsi, une diminution générale des effets des NTC au cours du temps était observée. Cette baisse des effets au cours du temps est également constaté par plusieurs auteurs chez diverses algues unicellulaires (Long *et al.*, 2012 ; Schwab *et al.*, 2011), et est souvent associée à l'auto agglomération des NTC entre eux. Cette agglomération conduit à une augmentation de la taille de particules présentes, tout en diminuant les surfaces de contacts entre les NTC et les cellules. Dans les différentes études présentées dans ce manuscrit, ce phénomène est également observé (Chapitre 3, 4, 5, 6). Pour mieux le caractériser et comprendre l'implication réelle de ce mécanisme sur la diminution des effets des NTC au cours du temps, différentes approches qualitatives et quantitatives ont été mises en œuvre. La première a permis de mettre en avant et de visualiser l'interaction entre les NTC et le biofilm. Plus

particulièrement, l'interaction se fait spécifiquement avec les SPE produites par *N. palea* (Chapitre 3). Ce phénomène est également observé chez *N. linearis* avec également une interaction entre des MWNTC et le frustule (qui pourrait d'ailleurs favoriser l'entrée des NTC par les pores de ce dernier ; Chapitre 6 : Figures 4 et 5). Cette interaction semble augmenter de façon évidente la taille des agglomérats de NTC (dans le cas de NTC dispersés par la MON) et semble isoler physiquement et probablement chimiquement les NTC vis-à-vis des diatomées (Chapitre 5 : Figure 5c).
Une autre étude montre que le biofilm de *N. palea* peut capter et agglomérer de façon continue et croissante les NTC. De plus, ce « captage » se fait dans des proportions similaires avec les deux types de NTC étudiés au cours du temps et ceci indépendamment de leur état de dispersion (Chapitre 4).

Enfin, l'étude qualitative et quantitative de l'interaction entre DWNTC et SPE révèle une surproduction des SPE, et plus particulièrement de protéines à caractère hydrophobe (Chapitre 5). La nature hydrophobe de l'interaction entre les SPE et les DWNTC a été également mise en évidence, indiquant une réponse de *N. palea* ciblée et optimisée sur l'adhérence. Toutefois, la nature du substrat et la turbidité sont souvent cités comme une cause possible de l'induction de la production de SPE par les organismes composants les biofilms (Chen *et al.*, 2013 ; Renner and Weibel, 2011 ; Stevenson *et al.*, 1996). Ainsi, l'ombrage associé à la présence de particules pourrait stimuler la production de SPE. La surproduction de SPE et leur interaction directe avec les NTC a pu, comme cela est observé dans le cas des nanoparticules métalliques (Ag et TiO_2), fortement limiter les effets des NTC en les agglomérant et les isolant des diatomées (Hessler *et al.*, 2012 ; Joshi *et al.*, 2012).

4 Rôle des biofilms photo-autotrophes sur le devenir des NTC dans l'environnement

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis de montrer une adhérence importante et continue des NTC aux biofilms de diatomées, et plus particulièrement aux SPE qu'elles produisent. Ils expliquent l'accumulation des NTC en surface des sédiments comme le montre les modèles et les études traitant du sujet (Gottschalk *et al.*, 2013 ; Schierz *et al.*, 2014) et comme cela a été observé avec d'autres NP (Cleveland *et al.*, 2012 ; Ferry *et al.*, 2009 ; Kulacki *et al.*, 2012). Tout en restant conscient qu'une multitude de paramètres environnementaux, à la fois biotiques (dynamique de croissance des biofilm, succession d'espèces au cours de l'année, broutage…) et abiotiques (physicochimie de l'eau et des

substrats colonisés, régime hydrique…) peuvent influer sur ce processus, il semble que le biofilm puisse à la fois servir à détoxiquer la colonne d'eau, tout en concentrant les NTC (et potentiellement d'autres NP) dans les SPE au niveau du substrat. Cette accumulation va induire une augmentation potentielle et localisée des concentrations d'exposition des différents organismes présents dans le biofilm ou le consommant (algues, bactéries, larves d'insectes, gastéropodes…). La consommation des biofilms contaminés en NTC par les consommateurs primaires pourrait favoriser leur transfert le long des chaînes trophiques aquatiques, ceci *via* l'accumulation passagère de NTC dans le tube digestif des organismes brouteurs (avant excrétion). En revanche, la littérature ne laisse pas présager d'une forte bioaccumulation des NTC dans les organes ou tissus des organismes (Mouchet et al 2007 ; Jackson *et al.*, 2013 ; Schierz *et al.*, 2014), bien qu'une forte entrée et accumulation des NTC dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires, y compris des diatomées (dans le cas de *N. linearis* ; Chapitre 6) soit souvent observé dans des cultures cellulaires *in vitro* (Chen *et al.*, 2010 ; Ge *et al.*, 2012 ; Miranda *et al.*, 2012 ; Sargent *et al.*, 2012).
Toutefois, dans l'hypothèse d'une accumulation de NTC par certains organismes, leur consommation par des brouteurs (pour les algues et autres organismes des biofilms), leurs prédateurs (poissons, crustacées, insectes...) et les prédateurs terrestres de ces prédateurs (faune piscivore, ou insectivore…), pourraient également conduire à des transferts vers les écosystèmes terrestres (Figure 1).

Un autre point qui n'est pas directement abordé dans ces travaux est lié au potentiel de captage et de concentration de nombreux polluants par les NTC, particulièrement les composés organiques (*e.g.* pesticides) et métaux lourd (Li *et al.*, 2003a, 2003b, 2002 ; Wang *et al.*, 2007). Ainsi, la concentration de ces divers toxiques à la surface des NTC pourrait localement augmenter les concentrations de ces substances en cas d'adhérence des NTC sur les biofilms photo-autotrophes. Les organismes composants ces biofilms ainsi que leurs consommateurs pourraient alors être exposés, à la fois à une concentration élevée en pesticides et en NTC. Un effet synergétique des NTC et des polluants qu'ils ont adsorbés (d'ailleurs exploité dans le cas des nano-pesticides ; Kah et Hofmann, 2009) est également envisageable.

À l'heure actuelle, il est encore difficile d'estimer les quantités de nanotubes de carbone potentiellement présente dans l'environnement et donc d'évaluer les répercussions de leur présence dans l'environnement. Concernant la surproduction et la déstructuration du réseau de SPE (Chapitre 4 et 5) causée par les NTC, il est important de souligner que ce

phénomène est général et peut être causé également par la présence de nombreuses particules naturelles (argiles, silice, fragments de feuilles…) et autres substrats (Chen *et al.*, 2013 ; Xue *et al.*, 2012). Compte tenu de la très forte abondance de ces particules naturelles, l'hypothèse énoncée qu'une augmentation des quantités de NP manufacturées dans l'environnement puisse, en perturbant la structure des SPE, jouer un rôle sur le cycle du carbone (Chen *et al.*, 2011) semble très improbable.

De plus, à court/moyen terme, si l'on considère les faibles quantités de NTC pouvant se rencontrer dans les milieux naturels et en tenant compte de la capacité des algues que nous avons étudié à isoler ces nanoparticules (agglomération et isolement physico-chimique rapide des NTC par les EPS), il est possible de conclure que les NTC ne présentent que de très faibles risques d'impacter les communautés de diatomées benthiques.

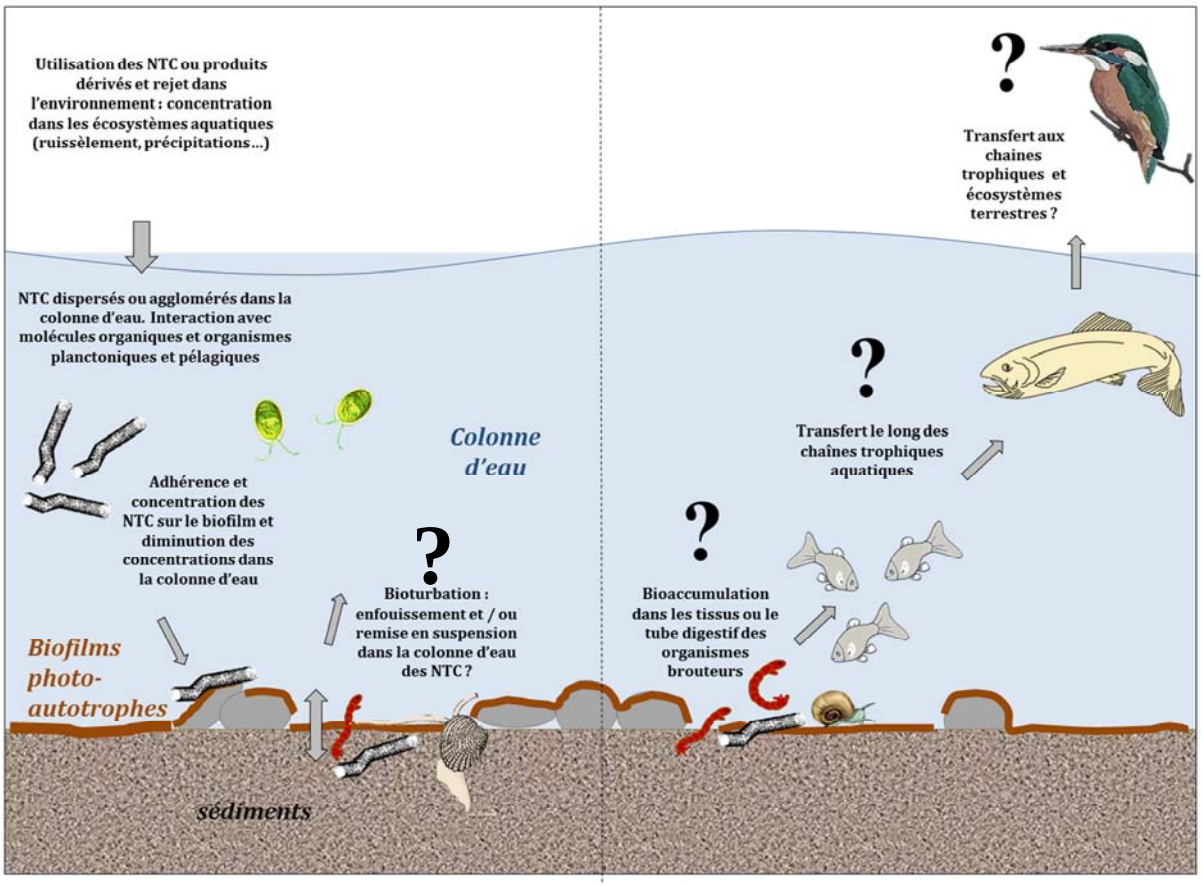


Figure 1 : Modèle simplifié de transfert des NTC vers les biofilms photo-autotrophes ainsi que les différents mécanismes avérés et attendus en cas de rejet de NTC dans l'environnement. La partie de droite (matérialisée par la ligne en pointillés) est spéculative et va dépendre des mécanismes de bioaccumulation (probablement dépendant des organismes considérés). Des études en systèmes complexes et variés de type mésocosmes pourraient apporter des éléments de réponse à cela.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les effets des NTC évalués lors de cette thèse en présence de MON, utilisée comme dispersant environnemental, sont très similaires entre eux en termes d'inhibition de croissance, d'absence d'effets sur l'intégrité des PSII et, dans une moindre mesure, sur la mortalité (ou en tous cas l'intégrité cellulaire). En revanche, des effets génotoxiques et tératogènes sont observés dans le cas de *N. linearis*, alors qu'ils ne sont pas suspecté chez *N. palea*. Ce résultat s'explique par une internalisation des MWNTC chez *N. linearis*, confirmée par microscopie bi-photonique, alors qu'elle n'est pas visible sur *N. palea*. Une analyse fine de la structure du frustule chez ces deux espèces apporte une explication à cette différence d'effet. La taille du maillage interne des pores des frustules (zone d'échange privilégiée entre le milieu extérieur et intracellulaire) est très différente entre *N. palea* et *N. linearis*. Les mailles chez *N. palea* sont inférieures au diamètre des MWNTC, alors qu'elles sont largement supérieures chez *N. linearis*. Enfin, des MWNTC en cours d'internalisation sont observés chez cette espèce, confirmant cette hypothèse. La diminution globale des effets au cours du temps trouve probablement son explication dans l'affinité des NTC pour les SPE. Ainsi, les NTC s'agglomèrent sur les SPE et entre eux de façon croissante au cours du temps *via* des interactions hydrophobes. De plus, une augmentation de la production de l'excrétion de ces SPE par *N. palea* a pu être mesurée, montrant notamment une évolution dans la composition de ces SPE. En présence de DWNTC, *N. palea* produirait plus de protéines (~ 60% de plus), dont une partie au moins était responsable des interactions hydrophobes observées entre les NTC et les SPE. Par contre, la production de carbohydrates reste inchangée. Cette forte interaction et accumulation des NTC avec la matrice exo-polymérique engendre une forte agglomération des nanoparticules au niveau des biofilms photo-autotrophes. Du fait du rôle prépondérant de ces biofilms comme source de nutriment pour de nombreux consommateurs primaires, cette accumulation pourrait favoriser un transfert des NTC et probablement d'autres nanoparticules le long des chaînes trophiques des écosystèmes aquatiques (Figure 1). En revanche, ces travaux indiquent clairement que les NTC ne devraient avoir qu'un impact mineur sur les communautés de diatomées benthiques.

Cette thèse, apportant quelques explications concernant les effets des NTC sur les diatomées et, dans une certaine mesure, sur les algues unicellulaires, amènent aussi un certain nombre d'interrogations.

La première est liée aux effets des NTC sur le cycle de vie complet des diatomées. En effet, nous n'avons étudié ici que les effets des NTC lors de la phase de reproduction végétative (mitoses successives). Nous l'avons vu, le frustule et la production de SPE protègent fortement les algues durant cette phase. Lors de la reproduction sexuée, en revanche, le frustule est absent pendant une courte période (au plus quelques heures), laissant place à la membrane puis à une paroi non silicifiée ayant des propriétés physicochimiques différentes de celle du frustule. Durant cette période et vu la facilité d'entrée de ces matériaux dans divers types cellulaires ne présentant pas de paroi (cellules animales) ou une paroi cellulosique (*e.g.* plantes, algues vertes), il est possible qu'il puisse se produire la même chose chez les gamètes, zygotes ou auxospores s'ils venaient à rencontrer des NTC. Les conséquences, à la fois pour les cellules et les populations, pourraient être bien plus graves, du fait de l'importance de cette phase dans la survie de l'espèce (brassage génétique, retour à la taille initiale).
Certaines techniques favorisant l'induction d'une phase de reproduction sexuée (*e.g.* carence en lumière et/ou certains nutriments suivie d'une remise en culture) semblent prometteuses (Armbrust *et al.*, 1990 ; Armbrust, 1999 ; Kinrade *et al.*, 2002). Ces dernières pourraient être mises à profit pour conduire ce type d'expérience. Malheureusement, la reproduction sexuée de *N. palea* et *N. linearis* n'a jamais été observée durant cette thèse (même après des périodes d'obscurité prolongées, des variations importantes de température et des carences en nutriments), ceci probablement du fait d'une taille trop importante des cellules, encore trop proche de celle des cellules initiales, pour qu'une reproduction sexuée puisse être induite. Une méthode fiable et reproductible pour arriver à cette fin devra d'abord être développée avant de pouvoir tester l'effet des NTC durant la reproduction sexuée ainsi que d'en évaluer les conséquences pour ces deux espèces.

Une surproduction de SPE en présence de DWNTC dispersés avec de la MON est mise en avant. Il serait maintenant intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans cette réponse. Plus particulièrement, quels sont les gènes impliqués et comment la cellule régule la production de ces SPE. Enfin, il serait bien sûr important d'identifier la nature des protéines surexprimées et des carbohydrates produits dans ces conditions. Evaluer l'origine de cette surproduction (ombrage et/ou contact) pourrait également être un point intéressant à développer.

Une internalisation des MWNTC est observée chez *N. linearis*. La présence de NTC, principalement autour du noyau, zone privilégiée pour la traduction des ARN messagers en

protéines, de la maturation des protéines ainsi que des lipides (réticulum endoplasmique granuleux, ribosomes, appareil de Golgi), mais également zone ou sont présentes différentes organites particulièrement impliquées dans la mitose (centrosomes, microtubules…), semblait être la cause des effets génotoxiques et tératogènes observés chez *N. linearis.* L'investigation des interactions plus ou moins spécifiques avec ces différents composants pourrait également permettre de mieux comprendre quels sont les mécanismes impliqués.

Il semble aussi très important d'étudier les effets de NTC tels qu'ils vont se trouver dans l'environnement en fin de cycle de vie, plus précisément, tels qu'ils seront après usage : fortement dégradés par une abrasion prolongée et/ou partiellement inclus dans des matrices (*e.g.* résines, ciments, divers autres composites)

Vue la forte agglomération et concentration des NTC sur le biofilm, le transfert de ces derniers le long des chaînes trophiques est un point préoccupant. Pour étudier cela, il est important de privilégier des études à long terme (*i.e.* mois, années) en milieu complexe et environnemental (*e.g.* mésocosmes, caging). Enfin, un élément important qui n'a pas été abordé dans ces travaux est la capacité des NTC à concentrer certains métaux, pesticides ou médicaments. Ainsi, ils pourraient avoir des effets indirects en concentrant divers toxiques pour ensuite s'accumuler sur les biofilms et les sédiments. Ceci pourrait avoir des conséquences importantes sur les biofilms eux-mêmes et les organismes qui les consomment en potentialisant les effets de ces toxiques par concentration de ces derniers et pouvant potentiellement conduire à des synergies entre NTC et autres toxiques, comme cela est d'ailleurs exploité dans le domaine des nano-pesticides ou médical.

Enfin, nous n'avons étudié ici que des effets à l'échelle de l'espèce. Des travaux basés cette fois sur des approches communautaires (communautés naturelles ou simplifiées reconstituées en laboratoire) pourraient être un point important et pertinent pour l'évaluation et éventuellement la compréhension du risque à l'échelle des écosystèmes. Différentes souches d'algues ont d'ailleurs été isolées durant cette thèse en prévision de futures expériences allant dans ce sens.

Références bibliographiques

Armbrust, E.V., Chisholm, S.W., Olson, R.J., 1990. Role of light and the cell cycle on the induction of spermatogenesis in a centric diatom1. J. Phycol. 26, 470–478. doi:10.1111/j.0022-3646.1990.00470.x

Armbrust, V., E., 1999. Identification of a New Gene Family Expressed during the Onset of Sexual Reproduction in the Centric Diatom *Thalassiosira weissflogii*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3121–3128.

Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. Canadian environmental quality guidelines. CCME, Hull, QC.

Chen, R., Ratnikova, T.A., Stone, M.B., Lin, S., Lard, M., Huang, G., Hudson, J.S., Ke, P.C., 2010. Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. Small 6, 612–617. doi:10.1002/smll.200901911

Chen, Y.-P., Zhang, P., Guo, J.-S., Fang, F., Gao, X., Li, C., 2013. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. Chemosphere 92, 633–638. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.059

Cleveland, D., Long, S.E., Pennington, P.L., Cooper, E., Fulton, M.H., Scott, G.I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E.J., Wood, L., 2012. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products. Sci. Total Environ. 421-422, 267–272. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.01.025

El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Osman, M.E.H., El-Mazaly, E., 2003. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzchia perminuta*. Braz. J. Plant Physiol. 15. doi:10.1590/S1677-04202003000300005

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

Ge, C., Li, Y., Yin, J.-J., Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., Chen, C., 2012. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. NPG Asia Mater. 4, e32. doi:10.1038/am.2012.60

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. Environ. Pollut. 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Hessler, C.M., Wu, M.-Y., Xue, Z., Choi, H., Seo, Y., 2012. The influence of capsular extracellular polymeric substances on the interaction between TiO2 nanoparticles and planktonic bacteria. Water Res. 46, 4687–4696. doi:10.1016/j.watres.2012.06.009

Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K.A., Vogel, U., Wallin, H., 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chem. Cent. J. 7, 154. doi:10.1186/1752-153X-7-154

Joshi, N., Ngwenya, B.T., French, C.E., 2012. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. J. Hazard. Mater. 241-242, 363–370. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057

Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Konduru, N.V., Potapovich, A.I., Osipov, A.N., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., Shvedova, A.A., 2006. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. Toxicol. Lett. 165, 88–100. doi:10.1016/j.toxlet.2006.02.001

Kah, M., Hofmann, T., 2014. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. Environ. Int. 63, 224–235. doi:10.1016/j.envint.2013.11.015

Kinrade, S.D., Gillson, A.-M.E., Knight, C.T.G., 2002. Silicon-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom *Navicula pelliculosa*. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 307–309. doi:10.1039/b105379p

Kulacki, K.J., Cardinale, B.J., Keller, A.A., Bier, R., Dickson, H., 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. Environ. Toxicol. Chem. 31, 2414–2422. doi:10.1002/etc.1962

Kwok, K.W., Leung, K.M., Flahaut, E., Cheng, J., Cheng, S.H., 2010. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. Nanomed. 5, 951–961. doi:10.2217/nnm.10.59

Li, Y.-H., Ding, J., Luan, Z., Di, Z., Zhu, Y., Xu, C., Wu, D., Wei, B., 2003a. Competitive adsorption of Pb2+, Cu2+ and Cd2+ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. Carbon 41, 2787–2792. doi:10.1016/S0008-6223(03)00392-0

Li, Y.-H., Wang, S., Luan, Z., Ding, J., Xu, C., Wu, D., 2003b. Adsorption of cadmium(II) from aqueous solution by surface oxidized carbon nanotubes. Carbon 41, 1057–1062. doi:10.1016/S0008-6223(02)00440-2

Li, Y.-H., Wang, S., Wei, J., Zhang, X., Xu, C., Luan, Z., Wu, D., Wei, B., 2002. Lead adsorption on carbon nanotubes. Chem. Phys. Lett. 357, 263–266. doi:10.1016/S0009-2614(02)00502-X

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. Environ. Sci. Technol. 46, 8458–8466. doi:10.1021/es301802g

Matorin, D.N., Karateyeva, A.V., Osipov, V.A., Lukashev, E.P., Seifullina, N.K., Rubin, A.B., 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Nanotechnologies Russ. 5, 320–327. doi:10.1134/S199507801005006X

Miranda, A.A., Shaikh, S.M., Sarode, P.R., Desai, P.V., 2012. Carbon Nanoparticle Toxicity to marine algae *Navicula longa* and *isochrysis galbana*. Indian J. Geo-Mar. Sci. 41, 331–337.

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., 2007. Assessment of the potential *in vivo* ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. Nanotoxicology 1, 149–156. doi:10.1080/17435390701556080

Nachin, L., Nannmark, U., Nystrom, T., 2005. Differential Roles of the Universal Stress Proteins of *Escherichia coli* in Oxidative Stress Resistance, Adhesion, and Motility. J. Bacteriol. 187, 6265–6272. doi:10.1128/JB.187.18.6265-6272.2005

Nagpal, N.K., Golder Associates, British Columbia, Ministry of Water, L. and A.P., 2004. Technical report, water quality guidelines for cobalt. Ministry of Water, Land and Air Protection, [Victoria, B.C.].

Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1757, 742–749. doi:10.1016/j.bbabio.2006.05.013

Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. MRS Bull. 36, 347–355. doi:10.1557/mrs.2011.65

Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., Popovic, R., 2010. Effect of core–shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat. Toxicol. 96, 109–114. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.002

Sargent, L.M., Hubbs, A.F., Young, S.-H., Kashon, M.L., Dinu, C.Z., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Siegrist, K.J., Battelli, L., Mastovich, J., Sturgeon, J.L., Bunker, K.L., Shvedova, A.A., Reynolds, S.H., 2012. Single-walled carbon nanotube-

induced mitotic disruption. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 745, 28–37. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.017

Sargent, L.M., Shvedova, A.A., Hubbs, A.F., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Kashon, M.L., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Friend, S., McKinstry, K.T., Battelli, L., Reynolds, S.H., 2009. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. Environ. Mol. Mutagen. 50, 708–717. doi:10.1002/em.20529

Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T., Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. Env. Sci Nano. doi:10.1039/C4EN00063C

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? Environ. Sci. Technol. 45, 6136–6144. doi:10.1021/es200506b

Segui, J., 2004. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. J. Leukoc. Biol. 76, 537–544. doi:10.1189/jlb.0304196

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E., 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharmacol. 261, 121–133. doi:10.1016/j.taap.2012.03.023

Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., 1996. Algal ecology freshwater benthic ecosystems. Academic Press, San Diego. 753

Von Moos, N., Slaveykova, V.I., 2013. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 1–26. doi:10.3109/17435390.2013.809810

Wang, S., Zhao, P., Min, G., Fang, G., 2007. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1165, 166–171. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.061

Xue, Z., Sendamangalam, V.R., Gruden, C.L., Seo, Y., 2012. Multiple Roles of Extracellular Polymeric Substances on Resistance of Biofilm and Detached Clusters. Environ. Sci. Technol. 46, 13212–13219. doi:10.1021/es3031165

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE **7**

Liste des abréviations 9

Introduction Générale 11

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **13**

1 Les nanoparticules et l'environnement 14

2 …ou l'essor de la nano-écotoxicologie et de la nano-toxicologie environnementale 16

3 Les nanotubes de Carbone: de leur découverte à leurs applications 18

3.1 Les nanotubes de carbone 18

3.2 Structures, propriétés et synthèses des nanotubes de carbones 21

3.2.1 Structures et propriétés 21

3.3 Synthèse 22

3.3.1 Arc électrique 22

3.3.2 Ablation laser 23

3.3.3 Dépôt de Vapeurs Chimiques Catalysé 23

3.4 Purification 24

3.5 Fonctionnalisation et dispersion 26

3.5.1 Fonctionnalisation 26

3.5.2 Dispersion et mise en suspension 28

4 Les écosystèmes aquatiques d'eau douce face aux nanotubes de carbone: 29

4.1 Les NTC dans les environnements aquatiques : voies de contamination, quantités impliquées et répartition. 30

4.2 Dégradabilité et Biodégradabilité 33

4.3 Détecter les NTC dans les organismes et l'environnement : un enjeu majeur pour l'évaluation du risque. 34

5 Effets sur les organismes: des risques encore mal connus 36

5.1 Interaction à l'échelle cellulaire 38

5.1.1 Avec les biomolécules extracellulaires 38

5.1.2 Avec la membrane plasmique 39

5.1.3 Avec la paroi cellulaire 41

5.1.4 Avec le cytosquelette 42

5.1.5 Avec l'ADN : interaction directe et épigénétique 43

5.2 Effets des NTC chez les algues unicellulaires 44

5.2.1 Toxicité directe des NTC et des résidus métalliques de synthèse : Mortalité et intégrité de la chaine photosynthétique, ... 46

5.2.2 Interaction avec la paroi et Internalisation : conséquences pour l'algue 47

5.2.3 Ombrage et agglomération 48

6 Les biofilms aquatiques photo-autotrophes 48

6.1 Composition et diversité 48
6.2 Les substances polymériques extracellulaires 50
7 Les diatomées 52
7.1 Systématique 52
7.2 Biologie des diatomées : Caractéristiques, structure cellulaire et cycle de vie 54
7.3 Ecologie et rôle écologique 56
7.4 Un allier de longue date en Eco-toxicologie et toxicologie environnementale 58
8 Objectif de la thèse 58
Références Bibliographiques 60
CHAPITRE 2 : PRESENTATION DES MODELES D'ETUDE 75
1 Espèces Modèles 76
1.2 *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith 1856 76
1.2.1 *Nitzschia palea* var. *palea* 48
1.3 *Nitzschia linearis* (C. Agardh) W. smith 1853 78
2 Nanotubes de carbone 81
2.1 Les nanotubes de carbone à double paroi (DWNTC) 82
2.2 Les nanotubes de carbone multi-parois (MWNTC) 83
3 Matière Organique, un dispersant naturel pour une approche environnementale 84
References bibliographiques 87
CHAPITRE 3 : EFFETS DE NANOTUBES DE CARBONE MULTI-PAROIS CHEZ LA DIATOMEE BENTHIQUE *NITZSCHIA PALEA* : ROLE DU FRUSTULE ET DES SUBSTANCES EXTRACELLULAIRES POLYMERIQUES 89
Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: "a sticky story" 93
Abstract: 93
Introduction: 93
Methods: 93
Carbon nanotubes and natural organic matter 94
Diatom strain and cultures 94
MWCNT suspensions 94
Characterization of MWCNT suspensions 94
Effect of MWCNT on the CHU10 composition 95

Investigation of MWCNT toxicity and shading effect on N. palea 95
Influence of MWCNT and NOM on photosynthetic activity and chloroplasts 96
Nature of MWCNT affinity for a biofilm of N. palea 96
Results: 96
Characterization of MWCNT suspensions 96
The effect of MWCNT suspensions on photosynthetic yield, chloroplasts and viability 96
MWCNT and NOM effects on N. palea growth 96
MWCNT adherence to the algal biofilm 97
Discussion: 97
MWCNTsuspenssion, dispersion, and catalyst metal release 97
Investigation of MWCNTtoxic effects 99
MWCNT effect on growth: total exposure effect versus shading effect 99
Biofilm-MWCNT interaction: role of EPS and frustules 101
Conclusion 101
Acknowledgements 101
Declaration of interest 101
References 102
CHAPITRE 4 - QUANTIFICATION DE L'ADHERENCE DE NANOTUBES DE CARBONE DOUBLE PAROI ET MULTI-PAROIS SUR UN BIOFILM DE DIATOMEES BENTHIQUES AU COURS DU TEMPS 107
Résumé: 107
Mots clés: 107
Introduction 107
Plan expérimental 108
Espèces modèle et conditions de culture 108
Nanotubes de carbone et matière organique naturelle 108
Préparation des suspensions de nanotubes de carbone 109
Quantification de la répartition des NTC au cours du temps 109
Croissance algale 110
Visualisation de l'interaction NTC / biofilm 110
Analyses Statistiques 110
Résultats et discussion 110
Effets des DWNTC et MWNTC sur croissance de *N. palea* 110

Effet du biofilm sur le comportement des NTC et cinétique d'adhérence 111
Interaction des DWNTC et MNTC avec les SPE 114
Implications environnementales et perspectives éco-toxicologiques 115
Conclusion 115
Références 115
Matériels supplémentaires 118
CHAPITRE 5 : LES SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRES : UNE PROTECTION EFFICACE CONTRE LES NANOTUBES DE CARBONE ? 121
Double-walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular-protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptative issue. 123
Abstract 123
1 Introduction 123
2 Experimental Methods 125
2.1 Diatoms strain and cultures 125
2.2 Natural organic matter and DWCNT suspensions 125
2.3 Growth and toxicity tests 126
2.3.1 Exposure strategy 126
2.3.2 Growth tests 126
2.3.3 Viability tests 127
2.3.4 Effects on photosynthesis 127
2.4 Extracellular polymeric substance assays 127
2.4.1 Culture and extraction protocols 127
2.4.2 Quantification of proteins and carbohydrates 128
2.4.3 Size distribution of extracellular polymeric substances 128
2.5 Scanning electron microscopy 128
3 Results 129
3.1 Toxicity tests 129
3.2 Quantification of carbohydrate and protein contents of extracted EPS 129
3.3 Characterization of extracted EPS by size exclusion HPLC 129
3.4 Chemical interactions between EPS and DWCNTs 130
3.5 Physical interactions between DWCNTs and the biofilm 130
4 Discussion 131
4.1 Toxicity of DWCNTs 131
4.2 DWCNTs effect on EPS production and possible involvement in growth delay 131
4.3 Effects of DWCNT on EPS distribution 134
4.4 Interactions between DWCNTs and EPS 135

4.5 Does NOM play a role in interaction? ... 136

5 Conclusions ... 136

6 Acknowledgments ... 136

7 References ... 136

CHAPITRE 6 : AUTRE ESPECE, AUTRES EFFETS / EFFETS TOXIQUES, GENOTOXIQUES ET TERATOGENES DE NANOTUBES DE CARBONE SUR LA DIATOMEE *NITZSCHIA LINEARIS* ... 143

Toxicity, genotoxicity and teratogenicity of multi-walled carbon nanotubes on the freshwater benthic diatom *Nitzschia linearis* ... 145

Abstract ... 145

Introduction ... 145

Methods ... 147
- Algal strain and cultures ... 147
- Natural organic matter and MWCNTs ... 147
- Toxicity assays and sampling. ... 147
- Growth tests ... 148
- Viability tests ... 148
- Effect on photosystem II quantum yield ... 148
- Assessment of Genotoxic and Teratogenic effects ... 148
- Investigation of MWCNTs inside cells ... 149
- Extracellular carbohydrates labeling and frustule observations ... 149
- Statistical analyses ... 149

Results ... 150
- Growth, viability and PSII quantum yield ... 150
- MWCNT uptake and cellular location. ... 150
- Genotoxicity and teratogenicity ... 151
- Interactions between MWCNTs and frustule ... 151
- Adherence to the biofilm ... 151

Discussion ... 151
- Effect of MWCNTs on growth, cellular integrity and PSII quantum yield ... 151
- Tracking MWCNTs inside the cells ... 153
- Genotoxicity ... 154
- Teratogenicity ... 155
- Frustule patency to MWCNTs ... 156
- The role of EPS ... 156

Conclusion ... 157

Acknowledgments ... 157

Declaration of interest ... 157

References ... 157

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE ... 165

1 Comparaison des effets des DWNTC et des MWNTC chez N. palea ... 166

2 Comparaison des effets observés chez *N. linearis* et *N. palea* en présence de MWCNTs dispersés ... 170

3 Importance des substances polymériques extracellulaires sur les effets observés 172

4 Rôle des biofilms photo-autotrophes sur le devenir des NTC dans l'environnement 173

Conclusion et perspectives 176

Références bibliographiques 179

TABLE DES MATIÈRES 183

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 191

ANNEXES 199

1 Milieu de culture CHU n°10 200

2 Milieu de culture SPE-1 201

3 Arbre phylogénétique simplifié 202

3bis Arbre phylogénétique du vivant 203

4 Modèle de base de l'hérithage des plastes du phytoplancton Eucaryote 204

5 Observations au Microscope bi-photonique de *N. palea* et *N. linearis* 205

6 Compléments de résultats des test de génotoxicité et teratogénicité du Chapitre 6 206

ARTICLE EN CO-AUTEUR 207

CONFERENCES ET POSTERS 215

Communication orale durant la conférence NanoBioEurope du 10 au 12 Juin 2013 (Toulouse, France) 217

Communication orale aux "Journées Nationales Nanosciences et Nanotechnologies" du 4 au 6 Novembre 2013 (Marseille, France) 218

Communication orale durant l'International Symposium on Inorganic and Environmental Materials. du 27 au 31 Octobre 2014 (Rennes, France) 219

Communication orale durant la conférence ChemOnTubes, du 30 Mars au 3 Avril 2014 (Riva del Garda, Italie) 220

Communication orale durant la 29ème conférence internationale de la SEGH (Society for Environmental Geochemistery and Health) du 8 au 12 Juillet 2013 à Toulouse (France) 221

Poster présenté durant la 23ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of environmental Toxicology and Chemistry) du 12 au 16 may 2013 à Gasgow (Ecosse) 222

Poster présenté durant la Rencontre annuelle de la Société d'Ecologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) le 3 et 4 juillet 2013 à Thionville (France) 224

Poster présenté durant la 24ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of environmental Toxicology and Chemistry) du 11 au 15 mai 2013 à Basel (Suisse) 226

Poster présenté durant la 29ème conférence internationale de la SEGH (Society for Environmental Geochemistery and Health) du 8 au 12 Juillet 2013 à Toulouse (France) 228

RESUME DE THESE / ABSTRACT 231

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Chapitre 1

Figure 1 : Relation entre surface spécifique (m2 kg-1) d'une particule sphérique et sa taille (diamètre en nm) avec une densité de 1000 kg m-3 comme exemple (d'après Navarro et al. 2008). Plus la taille de la particule diminue et plus la surface spécifique augmente alors que le volume est conservé (Les cubes ont été rajoutés à la figure originale pour illustrer ce phénomène). 14

Figure 2 : Huit formes allotropiques du carbone présentes sur terre : (a) Diamant (hybridation sp3), (b) Graphite (hybridation (sp2), (c) Lonsdaleite, Fullerènes (d) C60 (e) C540 (f) C70 (g) Carbone amorphe (h) Nanotube de carbone mono paroi. http://fr.wikipedia.org/wiki/Formes_allotropiques_du_carbone. Michael Ströck (mstroeck) 7 février 2006 (CC) BY-SA 3.0. 18

Figure 3 : Représentations schématiques de différents assemblages des cycles carbonés constituant la paroi des nanotubes de carbone. (a) Métallique (zigzag, θ = 0°), (b) semi-conducteur (armchair, θ = 30°) ou (c) intermédiaire (chiral, 0° < θ < 30°). http://education.mrsec. wisc. edu/143.htm.....21

Figure 4 : images en microscopie électronique à transmission (MET) de différents nanotubes de carbone (NTC) et illustrations de leur section transversale respective. (a) NTC multi-parois (MWNTC) présentant cinq parois pour un diamètre externe de 6,7 nm. (b) NTC à double-paroi (DWNTC) de diamètre externe 5,5 nm. (c) MWNTC composés de 7 parois pour un diamètre externe de 6.6nm et interne de 2,2 nm. D'après Iijima (1991).....22

Figure 5 : Synthèse de SWNTC par DVC d'après Dai, (2002). (a) Principe de la synthèse sur une nanoparticule isolée. (b) Images en Microscopie Electronique à Transmission (MET) illustrant différentes étapes de croissance d'un SWNTC par ce procédé avec, de bas en haut : nanoparticule métallique (~2nm) enveloppée par une coque de graphene (la future extrémité du SWNTC), début de l'élongation par la base, et stade plus avancé de la synthèse (barre d'échelle = 10nm). (c) Image en microscopie à force atomique d'un SWNTC. Notez la longueur d'une cinquantaine de µm. 24

Figure 6 : (a) Image en MET d'un MWNTC fonctionnalisé avec de l'acide alginique (d'après Liu et al., 2006). (b) Illustration de différentes fonctionnalisations non covalentes avec des molécules biologiques (protéines) montrant la modélisation de l'interaction entre, de haut en bas, du fibrinogène bovin, immunoglobuline, transferrine et BSA (Bovine Serum Albumin). Et de gauche à droite après 10mn d'incubation, après 5 h d'incubation, localisation des sites d'interaction préférentiels entre SWNTC (en gris) et protéines les acides aminés impliqués représentés correspondent à la tyrosine (rouge) et la phénylalanine (vert), deux acides aminés aromatiques. Le reste de la protéine est matérialisé en rose. D'après Ge et al. 2011. (c) 10 mg L-1 de MWNTC juste après dispersion par ultrasons et après 24h de repos. (d) mêmes conditions que précédemment mais avec ajout de 10 mg L-1 de Matière Organique Naturelle (MON) avant dispersion par ultrasons. (Photos c et d : L. Verneuil, EcoLab). 28

Figure 7 : Concentration en NTC résultats des modèles de : (1) Mueller et Nowack., 2008 (à l'échelle de la Suisse; (2) Gottschalk et al., 2009 (à l'échelle de l'Europe) ; (3) Koelmans et al., 2009 (pour Des lacs à faible et fort taux de sédimentation). Synthèse d'après la revue de Gottschalk et al., 2013.....32

Tableau 1 : Techniques d'indentification et quantification des NTC dans l'environnement (d'après Petersen et al., 2011). Les techniques marquées d'une étoile sont celles qui ont été utilisés durant ces travaux de thèse. 35

Figure 8 : Facteurs influençant les interactions nanoparticules-biomolécules d'après Mu et al. (2014). 36

Figure 9 : Schéma de l'organisation de la membrane plasmique d'une cellule animale. On peut observer différentes structures extracellulaires avec lesquelles les NTC peuvent potentiellement interagir. Les membranes végétales possèdent une structure similaire mais sont recouvertes d'une paroi (Mariana Ruiz (LadyofHats, modifier par Dhatfield, source Wikipédia : http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane; CC BY-SA 3.0). 40

Figure 10 : Voies d'endocytose pouvant permettre aux nanoparticules d'entrer dans la cellule. L'endocytose peut se faire via des mécanismes régulés (clathrine-dépendante) (cavéoline-dépendante) ou d'endocytose en phase fluide. L'endosome formé va ensuite être transféré dans le cytoplasme, puis va pouvoir maturer et fusionner avec un lysosome. L'endosome issu d'endocytose cavéolaire va circuler via une translocation avec le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi avant d'être redirigé ou non vers des endosomes tardifs ou directement vers les peroxysomes. Il peut aussi être évacué par exocytose. D'après Moore (2006). 41

Figure 11 : Exemple de compostions et structures chimiques des SPE. (a) Différents monomères pouvant constituer les polysaccharides présents dans les SPE des diatomées. (b) Exemple d'acides aminés cyclique (Tryptophane; Trp) ou non (Asparagine, Asn) pouvant rentrer dans la constitution de peptides ou protéines composant les SPE. Sur les formules moléculaires développées, la partie en rouge est celle qui va interagir avec d'autres molécules ou supports, alors que la partie noire est celle qui va permettre la formation de chaînes d'acides aminés (un groupement amine et un groupement acide carboxylique (voir (1), (2), (3) sur les figures (b) et (c)). d'après Jaspard E. (2005) E. Jaspard - http://biochimej.univ-angers.fr/. (c) Structure chimique possible d'une partie d'une glycoprotéine constituant les SPE. En gris apparaît la liaison entre la chaîne polysaccharidique et un acide aminé constituant la protéine. (d) Structure hypothétique d'un assemblage des SPE. Les polysaccharides apparaissent en filaments bleus alors que les protéines sont matérialisées par des ronds (protéines globulaires) et filaments (protéines fibreuses) rouges. (a) et (c) tirées de : http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke .ca/3c.html 51

Figure 12 : Vue en microscopie a épi-fluorescence de (a) Nitzchia palea, (b) Cocconeis placentula, (c) Nitzschia linearis (Photos a, b, c : L.Verneuil, EcoLab). Et en microscopie confocale de (d) Coscinodiscus wailesii (J. Michels, GEOMAR ; http://www.geomar.de/). Les chloroplastes apparaissent en rouge. Les figures (a-c) permettent de visualiser les noyaux des cellules en position centrale (bleu). Notez la présence d'un Pyrenoïde au centre de chaque plaste de C. placentula.(c). Sur la figure (d), le frustule apparaît en vert et les chloroplastes en rouge. 54

Figure 13 : Cycles de vie des diatomées. (a) Cycle de reproduction végétative (asexuée) par mitose successive. On peut remarquer la réduction de taille des cellules filles ayant hérité de la valve inferieure (chaque taille porte une lettre : « A » pour la plus grande et « D » pour la plus petite. (b) Exemple d'un cycle de vie avec reproduction sexuée d'une diatomée centrique. (c) Exemple d'un cycle de vie avec reproduction sexuée d'une diatomée pennée. Source : Florida International University (http://www.jochemnet.de/fiu/bot4404/BOT4404_19.html).(d) Photo en microscopie photonique d'une culture de Cocconeis placentula durant une phase de reproduction sexuée ; on peut voir une oxospore sur la gauche (cellule ronde) et les cellules, une fois le frustule reformé, après 1,5 cycle de division cellulaire. On peut également remarquer la disparité de taille entre les différentes cellules présentes, illustrant bien la Figure (a). (Isolement de la souche, mise en culture et photo, L. Verneuil, EcoLab). 57

Chapitre 2

Figure 1 : Images de frustules de *Nitzschia palea* (souche CPCC 160 provenant du Canadian Phycological Culture Center) en microscopie électronique à balayage (MEB) après traitement à l'H_2O_2 et

HCl (protocole AFNOR : NF EN 13946) . (a) Frustule en vue de face externe ; on distingue la carène renforcée sur la partie droite du frustule ainsi que la zone d'implantation des fibules ne présentant pas de ponctuation. (b) frustule en vue interne mettant en avant les fibules réparties de façon homogène sur toute la longueur. (c-d-e-f-i) anomalies de frustules apparaissant spontanément dans la culture. Avec (c) un renflement du frustule, (d) une dépression en partie centrale, (e) des anomalies au niveau de la répartition et de la structure des fibules, (f) une inversion partielle de l'emplacement du raphé et une torsion à 180° effectuée au centre du raphé. (g) Détail du frustule en vue interne montrant le raphé (en haut à gauche), soutenu par les fibules. (h) vue externe des pores montrant un réseau nanométrique (Photos : L. Verneuil, EcoLab).....77

Figure 2 : (a) **Culture de *Nitzschia palea*** observée en microscopie à fond clair. La même culture observée sous microscope à épi-fluorescence (BX-41 lampe à mercure U-LH100HG Olympus, Center Valley, PA) montrant l'auto-fluorescence des chloroplastes (Ex : 448–550 nm, Em 590 nm, filtre dichromatique : 570 nm; U-MMSWG, Olympus). Détail d'une cellule à plus fort grossissement et après marquage au hoechst 33342. On observe à la fois l'auto-fluorescence des deux chloroplastes (rouge) et celle du marqueur (bleu) au niveau du noyau (Ex : 330–385 nm, Em : 420 nm, filtre dichromatique : 400 nm U-MWU2, Olympus. (Photos : L. Verneuil, EcoLab) 78

Figure 3 : (a)(b)(c) **Culture de *N. linearis*** observée sous microscope inversé à fond clair (CKX-41 Olympus, Center Valley, PA) et (d)(e)(f)(g) à fluorescence (microscope BX-41 Olympus). (a) Vue générale de la culture. On remarque que les cellules se regroupent pour former des amas pouvant faires plusieurs millimètres de diamètre. (b) la même culture à plus fort grossissement. On peut voir l'emplacement des noyaux (incolores) en position centrale dans les cellules. (c) vue d'une cellule en microscopie à contraste de phase. On visualise bien les deux gros chloroplastes (en brun) et l'emplacement du noyau au centre (zone incolore). (d)(e)(f)(g) Images en microscopie à fluorescence de deux cellules filles peu après une division. (d) auto-fluorescence des chloroplastes observés sans marquages (Ex : 448–550 nm, Em 590 nm, filtre dichromatique : 570 nm; U-MMSWG, Olympus). (e) après marquage au hoechst 33342. On observe à la fois l'auto-fluorescence des chloroplastes (rouge) et celle du marqueur (bleu) au niveau des noyaux. On remarque également un marquage au niveau des membranes et dans les zones apicales probablement lié à des interactions hydrophobes (lipophiles) entre le hoescht 33342 et des protéines ou lipides des membranes cellulaires et chloroplastiques (Ex : 330–385 nm, Em : 420 nm, filtre dichromatique : 400 nm U-MWU2, Olympus). (f) marquage à l'acridine orange des noyaux (vert). Les chloroplastes apparaissent en rouge. Une anomalie nucléaire (micronoyau) est visible dans la cellule de gauche et présente un ADN condensé (pycnose), signe d'un début d'apoptose ou de nécrose cellulaire. On peut également observer le nucléole (zone plus sombre) dans le noyau de la cellule de droite. (g) Marquage des lipides au rouge de Nile dans une culture après plusieurs jours en phase plateau. On remarque les nombreuses gouttelettes lipidiques (jaune) à l'intérieur des cellules. Dans le cas d'une culture en croissance, elles sont beaucoup moins abondantes, voire complètement absentes (Ex : 470 nm – 490 nm, Em : 520 nm; filtre dichromatique : 500 nm; U-MNB2, Olympus ; Photos : L. Verneuil, EcoLab).....79

Figure 4 : Détails en microscopie électronique à balayage (MEB) du frustule de *Nitzschia linearis*. (a) vue générale du frustule montrant l'aspect interne et externe après traitement à l'H2O2 et HCl (protocole AFNOR : NF EN 13946). (b) détail de la partie centrale de la zone du raphé en vue interne. Remarquez l'espace entre les deux fibules centrales, caractéristique de l'espèce. (c-d) détail de l'apex du frustule à deux grossissements différents. (e) aspect externe des stries. (f) vue de profil du frustule. Détail des ceintures connectives (ici 6) imbriquées entre elles-mêmes (formant le cingulum) et avec les deux valves du frustule. La limite ente le cingulum est la valve supérieure (épi-valve) est matérialisée en rouge et avec la valve inferieure (hypo-valve) en bleu. Remarquez l'aspect labyrinthique de la surface des ceintures. Le schéma en haut à droite illustre le chevauchement entre les plaques et avec le frustule (1 valve inférieure ; 2 valve supérieure). L'image en bas à gauche montre l'aspect lisse de la face interne d'une ceinture connective présentant des perforations communiquant avec la face externe. (g) Cingulum à plus fort grossissement et en vue rasante mettant en avant le relief des ceintures connectives. (Photos : L. Verneuil, EcoLab).....80

Figure 5 : Nanotubes de carbone double paroi (DWNTC) utilisées pendant cette étude (lot : CNT260310, Institut Carnot Cirimat). On peut remarquer l'enrobage de ces derniers par de la MON

de la rivière Suwannee (1R101N, International Humic Substances Society, IHSS USA ; Photo : L. Verneuil, EcoLab) Pour plus de détail de l'enrobage de MON voir Chapitre 5 Figure 1.. 82

Figure 6 : Nanotubes de carbone multi-paroi (MWNTC) utilisés durant cette thèse. On peut remarquer sur la photo des nanoparticules métalliques issues de la synthèse (zones sombres) encapsulées dans des coques de carbone ou directement incluses dans les MWNTC. (Photo : L. Verneuil, EcoLab) 83

Figure 7 : Vue en microscopie électronique à transmission (MET) de nanotubes de carbone (NTC) à paroi double (DWNTC, à gauche) et multi-parois (MWNTC, à droite) utilisés pendant la thèse, après dispersion aux ultrasons pendant 20 min dans du milieu de culture CHU-10, éventuellement ajout de NOM et ultrasons à nouveau pendant 20 min (sonotrode) et repos une heure avant préparation des grilles de MET. (a) (c) : sans ajout de MON, (b) (d) : avec ajout de 10 mg L-1 de MON pour 50 mg L-1 de NTC (ratio 5:1). Et enfin (c) (e) avec ajout de 10 mg L-1 de MON pour 10 mg L-1 (ratio 1:1 ; TEM, JEOL JEM-1400, 120kV, JEOL, Tokyo, Japon ; Photos : L. Verneuil, EcoLab) 85

Figure 8 : nanotubes de carbone multi-paroi (MWNTC) observés en microscopie électronique à transmission (MET ; JEOL JEM-1400, 120kV, JEOL, Tokyo, Japon) après 20 mn de dispersion par ultrasons en présence de matière organique naturelle (MON ; ratio 10 mg L-1 de MWNTC pour 10 mg L-1 de MON) on peut remarquer les MWNTC entièrement recouverts par la MON contrairement à la Figure 6. (Photo : L. Verneuil EcoLab).. 86

Chapitre 3

Figure 1: Experimental devices composed of open-top opaque boxes covering two stacked 12 wells plates with opacified inter-wells (a). Schematic representation of the device used for toxicity test (b). Bottom wells contain benthic diatoms exposed to (left) or shaded by (right) multi-walled carbon nanotube suspensions without (MWCNTsonicated) or with the presence of natural organic matter (MWCNT+NOM). Top boxes contain only culture medium (CHU10) in the case of exposure tests and MWCNTsonicated or MWCNT+NOM in the case of shading tests. 95

Figure 2: Transmission electron microscopy (TEM) images of multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) dried suspensions with various concentrations of natural organic matter (NOM). (a) Without natural organic matter (MWCNTsonicated). (b) With NOM (MWCNT+NOM; ratio 1/1). (c) MWCNT+NOM (ratio 5/1). (d) Magnified view of (a). Arrows indicate metallic residues encapsulated in carbon shells or directly embedded in MWCNT. . .. .97

Figure 3: (a) **Growth kinetics in control culture of *N. palea* growth in CHU no. 10 medium** (CHU10; solid line) and in CHU10 plus 10 mg L^{-1} of natural organic matter (CHU10+NOM; dashed line). Arrow indicates the time of NOM addition. (*) indicates a significant difference ($p<0.01$). (b) *Nitzschia palea* growth rates (r) after 48 h of exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) sonicated ($MWCNT_{sonicated}$) and (c) to $MWCNT_{sonicated}$ with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNT_{+NOM}$). (d) and (e) are the same conditions but after 144 h of exposure. Error bars are standard error. (*) indicates significant difference versus controls. (*) indicates a significant difference between total exposure effect and shading effect ($p<0.01$). r = (nx_n0)/n0 (nx=number of cells mL^{-1} after 48 or 144 h of exposure; n0 = 1.22_105 cell mL^{-1} = number of cells mL^{-1} at the beginning of exposures). Photo synthetically active radiations (PAR) values (mmole s^{-1} m^{-2} mA) after 48 h are 22.9±0.8, 24±3.2, 24.4±1.7, 23.3±4.8, 11.7±2.1*, 23.8±1.48 for MWCNTsonicated and 24.2±2, 23.8±3.4, 15.1±1.4*, 9.6±1.6* for MWCNT+NOM values correspond, respectively, to control: 0.1 mg L^{-1}, 1 mg L-1, 10mg L^{-1}, and 50 mg L^{-1}. (*) indicates significant difference versus controls..... 98

Figure 4: Examples of collected stereo-microscopy images of well bottoms after 48 h of diatoms exposed to 50 mg L^{-1} of MWCNT without natural organic matter ($MWCNT_{50mg_sonicated}$). (a) Overview of $MWCNT_{50mg_sonicated}$ without diatoms. (b) Same suspension in the presence of diatoms. (c) and (d) higher magnification of (a) and (b), respectively. 99

Figure 5: Biofilm of *N. palea* in devices after staining extracellular polymeric substances (EPS) using Alcian blue. (a) Control culture. (b) Culture exposed to suspension of multi-walled carbon nanotubes at 10 mg L^{-1} ($MWCNT_{10mg_sonicated}$). (c) Culture exposed to suspension of 10 mg L^{-1} MWCNT with a natural organic matter (MWCNT10mg +NOM). EPS are stained in blue. MWCNT are in black. Scanning electron microscopy (SEM) images of N. palea (d) in control cultures and (e) in $MWCNT_{10mg+NOM}$. (f) and (g) Higher magnification of previous images focused on an EPS structure without or with MWCNT10mg+NOM, respectively. (h) SEM images of MWCNT. (i) Detail of the nanostructure observed in pores of frustule..... 100

Chapitre 4

Figure 1 : principe des dosages de NTC dans les différents compartiments. (a) zones et quantité échantillonnées dans le dispositif, sans biofilm (à gauche) et avec biofilm (à droite). (b) Calcul des concentrations de NTC dans les différents compartiments à partir des régressions linéaires obtenues à partir de suspensions entièrement dispersées (pour les DWNTC : y = 0.397x – 0.0024 ; R2 = 0.997) et pour les MWNTC : y = 0.0383x - 0.0035 ; R2 = 0.999 avec y = OD et x = Concentration en NTC)..... 109

Figure 2 : Cinétique de croissance de *N. palea.* (a) dans le cas des expositions aux MWNTC et (b) des expositions aux DWNTC. Les barres d'erreurs représentent les écarts types. Les différences significatives entre les conditions et avec le témoin sont données en matériel complémentaire 1..... 110

Figure 3 : Résultats de la quantification des NTC en suspension dans la colonne d'eau, sédimentés au fond et adhérés au biofilm. Dans le cas des DWNTC (a),(c),(e) et des MWNTC (b),(d),(f), respectivement pour une concentration totale de 1 mg L^{-1}, 5 mg L^{-1} et 10 mg L^{-1}. Pour chaque temps, les barres de gauche présentent les résultats sans biofilm et les barres de droite, les résultats avec biofilm. Les quantités moyennes (n = 3) de NTC sont exprimées en µg cm^2 (surface totale d'un puits = 3.84 cm^2). Les concentrations inoculées par puits étaient : pour 1 mg L^{-1} = 2.5 µg (= 0.65 µg cm^2), pour : 5 mg L^{-1} = 12.5 µg (= 3.26 µg cm^2) et pour 10 mg L^{-1} = 25 µg (= 6.51 µg cm^2). Les écarts types et les différences significatives sont donnés dans la section matériel Supplémentaire 2 (S2). 112

Figure 4 : Régressions linéaires basées sur les valeurs de logarithmes des quantités de NTC adhérées aux biofilm au cours du temps pour chaque type de NTC et chaque concentration testée. (a) 1 mg L^{-1}. (b) 5 mg L^{-1} et (c) 10 mg L^{-1}. 113

Figure 5 : Observation en Microscopie Electronique à Balayage (MEB), après fixation des SPE au bleu alcian, des cultures exposées ou non 48h aux NTC. (a) Biofilm control de *N. palea* cultivé seul : (a) vue générale et (b) détail des SPE. Biofilm exposé à $MWNTC_{10\ mg}$: (c) vue générale (d) détail de l'interaction EPS / MWNTC. Biofilm exposé à $DWCNT_{10\ mg}$: (c) vue générale (d) détail de l'interaction EPS / DWNTC. Les encadrés dans (d) et (f) présentent les NTC respectifs seuls. 114

Chapitre 5

Figure 1 : (a) Raman spectra of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). In the upper right, the D-band is normalized with respect to the intensity of the G-band intensity of the same spectra. (b) General transmission electronic microscopy (TEM) view of DWCNTs after drying the DWCNTs suspension (10mg L^{-1}) dispersed with natural organic matter (NOM; 10mg L^{-1}). (c) A magnified view of (b) highlighting the affinity of NOM for DWCNTs. Arrows indicate the presence of NOM. Images of DWNTC without NOM are given in Supplementary material 1. 125

Table 1 : Summarized results of the toxicity tests. The first four lines represent the inhibition of growth (%) under direct exposure or shading. 48h-EC_{50} is the exposure concentration of DWCNTs that caused 50% inhibition of growth after 48h of direct exposure (during the exponential phase).. 48h-PSII are the values of the photochemical quantum yield of photosystem II after 48h of direct exposure to DWCNTs. Finally, the PAR values represent the photosynthetic active radiation received by diatoms after passing through DWCNTs suspensions. Gray values indicate the standard deviation. For any considered line, two groups without any letters in common are significantly different ($p < 0.05$). 129

Figure 2 : Results of the assays measuring total amounts of carbohydrates (anthrone test) and protein-like polymers (BCA test) depending on the DWCNTs concentration. Dark bars are proteins (in an equivalent amount of bovine serum albumin) and bright are carbohydrates (in an equivalent amount of glucose). Two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). The details of each fraction are given in figure 4. 131

Figure 3 : Size exclusion high precision liquid chromatography (HPLC) profiles of EPS extracted with (a), (d) phosphate buffer saline (PBSextract); (b), (e) TWEEN 20 (TWEENextract); and (c), (f) Tris-EDTA (EDTAextract). (a), (b) and (c) are nonspecific absorbance profiles at 210 nm showing both carbohydrates and protein-like polymers, while (d), (e), (f) are absorbance profiles at 280 nm showing only protein-like polymers. Samples from the Tweenextracts and EDTAextracts were 5 times more concentrated than those of the PBSextracts (Cf. materials section). Note that in (c) and (f), the peak starting at 19.6 corresponds to EDTA and not an extracted molecule. The first peak (~8 mL) from each condition corresponds to large molecules or the assembly of molecules (or, potentially, remaining DWCNTs) that were excluded from the column.. 132

Figure 2 : Results from the colorimetric assays of each extracted fraction ranked by bonding properties. (a) Weak or mechanical bonds between DWCNTs and organisms ($H2O_{extract}$ + $PBS_{extract}$). (b) Linked by hydrophobic bound ($TWEEN_{extract}$). (c) Linked by ionic bridges ($EDTA_{extract}$). Error bars indicate the standard deviation. For each graph, two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). Global concentrations of extracted EPS (obtained from the addition of these different fractions) are given in Figure 2. 133

Figure 5 : Scanning electron microscopy observations of (a) the control biofilm and (b) the biofilm exposed to 10 mg L-1 of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). (c) A magnified view of (b) highlighting the thin interactions between EPS and DWCNTs and the disrupted aspects of EPS in the presence of DWCNTs. The black arrow indicates a DWCNTs bundle. The white arrow shows EPS wrapping around a bundle of DWCNTs. 134

Chapitre 6

Table 1: Summary results of toxicity tests. Lines one to four are growth rates after a given exposure time (24, 48, 72 h and 144 h). To obtain the corresponding algal concentration, the initial number of cells ($5\ 10^3$) was multiplied by the growth rate and then the initial number of cells (*e.g.*, a growth rate of 6.33 corresponding to a cell number of $5\ 10^3 * 6.33 + 5\ 10^3 = 36650$ cell mL^{-1}) was added. Lines five and six are the results of the quantum yield of photosystem II ($PSII_{QY}$) after 48 h and 144 h of exposure, respectively. Lines seven and eight shows the viability test results as a percentage of dead or injured cells after 48 h and 144 h of exposure, respectively. Values in gray represent the standard deviation. The groups on the same line that do not have identical letters are significantly different ($p = 0.05$). 150

Figure 1: Results of genotoxicity and teratogenicity assays after 48 h of exposure. (a) Examples of a normal cell and a micro-nucleated cell observed by fluorescence microscopy after labeling DNA with Hoechst 33342. A pycnosis (condensation of the DNA inside the nucleus) is observed in the case of the micro-nucleated cell. (b) The number of micronucleated cells formed by the cell cycle after 48 h of exposure to MWCNTs and Maleic-hydrazine (MH). (c) Examples of a normal frustule and a frustule presenting abnormalities. (d) The results of counting frustules with abnormalities after 48 h of exposure (error bars are the standard deviation, and * represents a significant difference compared to the negative control (Ctrl- = negative control). CTRL+ = exposed to maleic hydrazine; MH = positive control. 151

Figure 2: Microscopy observation of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) cells after 48 h of exposure to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotube dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter (MWCNTs1mg+NOM). (a) Bright field microscopy highlighting globular dark structures located around the nucleus (largest red circle), which probably contain MWCNTs+NOM. (b) Observation of the same cell in fluorescence microscopy after DNA staining with Hoechst 33342. DNA appears blue. It can be noted that the dark structures previously observed are also visible hiding a part of the nucleus (small embedded red ellipse).. 152

Figure 3: Two photon excitation microscopy (TPEM) observation of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) after 48 h of growth in control culture (a-b) and in culture exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$). (a) Image of the central plane of the cell. (b) Tomographic reconstruction of the cells from different planes observed during exposure. Chloroplasts appear in purple while MWCNTs are in blue (false colors). (c) Image of the central plane of the cell showing MWCNTs both on the outside of the cell (white arrows) and centrally located inside the cell (red arrow). MWCNTs inside the cell seem to fit the shape of the nucleus. (d) Tomographic reconstruction of the cells from different planes observed. White arrows indicate $MWCNTs_{+NOM}$ outside the cell while red arrows indicate internalized $MWCNTs_{+NOM}$. 154

Figure 4: SEM observations. (a) *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes ($MWCNTs_{1mg}$) dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$) for 48 h. A frustule abnormality can be noted. (b) Higher magnification of (a) revealed the predominant presence of individual MWCNTs on the surface of the frustule. Higher magnification of (b) highlighting an individual MWCNT penetrating into a pore (black arrow). (d) A sample of $MWCNTs_{+NOM}$ used for this study. (e) Internal view of the frustule of *N. linearis* showing the internal pore structure. This view clearly highlights the pore size (up to ~ 100 nm), which is far greater than the diameter of MWCNTs, suggesting contact between the MWCNTs and the cell membrane. 155

Figure 5: In situ observation using an inverted microscope of biofilms of *Nitzschia linearis* (*N. linearis*) after labeling EPS with alcian blue. (a) Control culture. (b) Culture exposed to 1 mg L^{-1} of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs1mg) dispersed with 10 mg L^{-1} of natural organic matter ($MWCNTs_{1mg+NOM}$) for 48 h. (c) Culture exposed to 10 mg L^{-1} of MWCNTs dispersed with 10 mg L^{-1} of organic matter ($MWCNTs_{10mg+NOM}$) for 48 h. The left picture shows an *N. linearis* cell entirely wrapped in MWCNTs+NOM. One extremity of the frustule can be observed on the upper right side. It is noted in (c) that the EPS network appears to be totally covered by MWCNTs whereas it is only partially covered in (b).. 157

Chapitre 7

Figure 1 : Modèle simplifié de transfert des NTC vers les biofilms photo-autotrophes ainsi que les différents mécanismes avérés et attendus en cas de rejet de NTC dans l'environnement. La partie de droite (matérialisée par la ligne en pointillés) est spéculative et va dépendre des mécanismes de bioaccumulation (probablement dépendant des organismes considérés). Des études en systèmes complexes et variés de type mésocosmes pourraient apporter des éléments de réponse à cela.).. 175

ANNEXES

1 MILIEU DE CULTURE CHU N°10.

Composition	CAS N°	Concentration (mg/L)
$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$ (236,15)	13477-34-4	60
$MgSO_4$ $7H_2O$ (246,48)	10034-99-8	25
K_2HPO_4 (174,18)	7758-11-04	10
Na_2CO_3 (105,99)	497-19-8	20
Na_2SiO_3 $5H_2O$ (212,14)	10213-79-3	60
H_3BO_3 (61,83)	10043-35-3	2,86
Fe-EDTA (mg/L)	préparé au laboratoire	5
$MnSO_4$, H_2O (169,01)	1004-96-5	1,5
$CuSO_4$, $5H_2O$ (249,612)	7758-99-8	0,8
$ZnSO_4$, $7H_2O$ (287,54)	7446-20-0	0,25
$Co(NO_3)_2$, $6H_2O$ (291,03)	10026-22-9	0,05
Na_2MoO_4 $2H_2O$ (241,92)	10102-40-6	0,025
Biotine (B7) : C10H16N2O3S	67-03-8	0,1
Vitamine B12 : C63H88CoN14O14P	68-19-9	0,005
Thiamine HCl : C12H17CIN4OS, HCL	58-85-5	0,00055

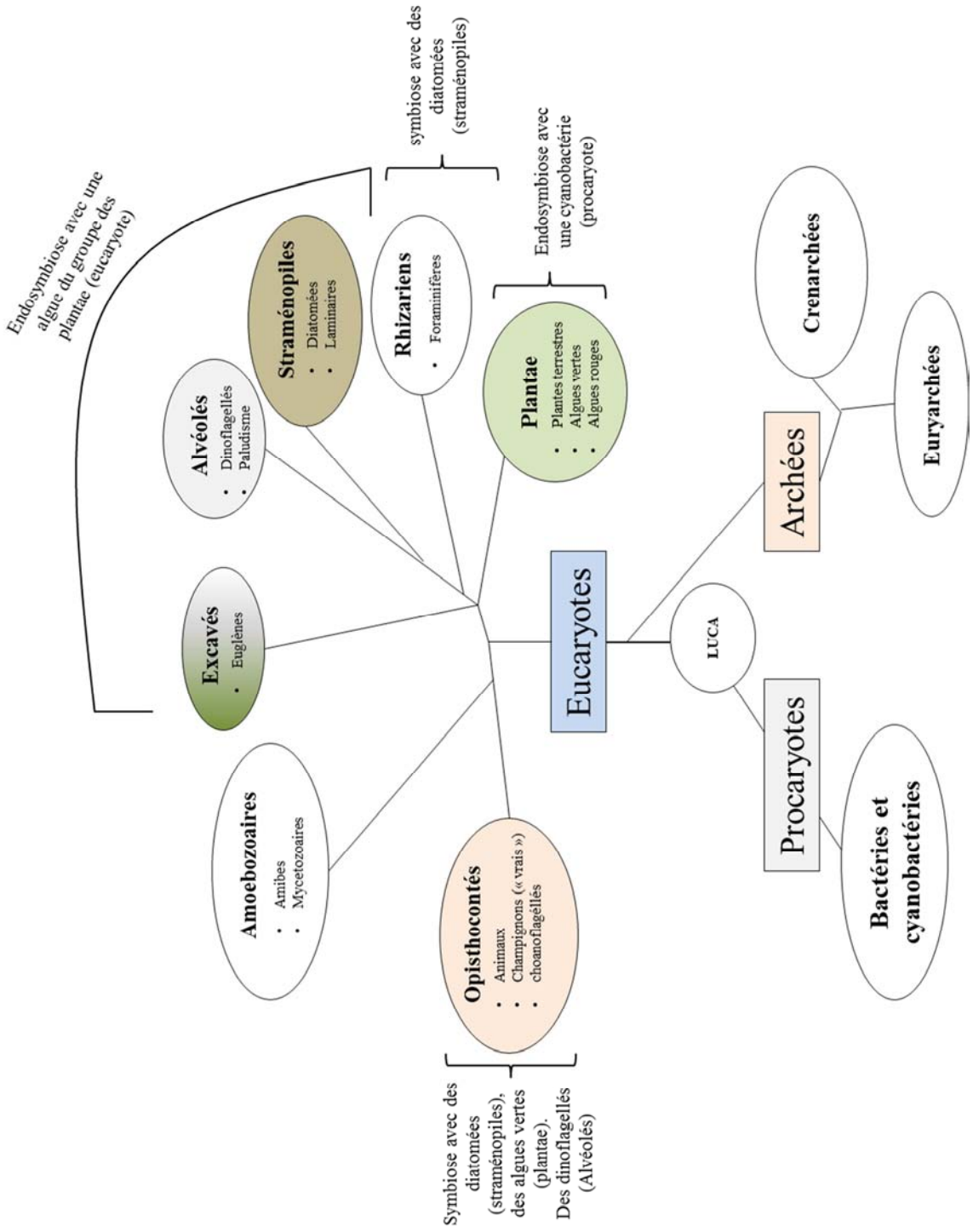
Les différentes solutions mères (x1000) étaient préparées séparément et autoclavées (121°C, 1 bar, 20 mn). 1 ml de chaque solution était ensuite rajouté à 900 mL d'eau milli-Q. Le volume était ensuite complété à 1 L et le pH ajusté entre 6,4 et 6,6 avec une solution d'HCl. Le milieu était ensuite autoclavé comme ci-dessus et stocké dans le noir à température ambiante jusqu'à utilisation.

2 MILIEU DE CULTURE SPE-1

	Composition	CAS N°	Concentration (mg/L)
Eléments majeurs	$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$ (236,15)	13477-34-4	60
	$MgSO_4$ $7H_2O$ (246,48)	10034-99-8	25
	K_2HPO_4 (174,18)	7758-11-04	10
	Na_2CO_3 (105,99)	497-19-8	20
	Na_2SiO_3 $5H_2O$ (212,14)	10213-79-3	60
	H_3BO_3 (61,83)	10043-35-3	2.8
	Na_2EDTA $2H_2O$ (372,2)	6381-92-6	4.36
	$FeSO_4$ $7H_2O$ (270,3)	7782-63-0	1.5
Oligo éléments	$MnCl_2$ $4H_2O$ (197,844)	13446-34-9	0.18
	$CuSO_4$ $5H_2O$ (249,612)	7758-99-8	0.0001
	$ZnSO_4$ 7H2O (287,54)	7446-20-0	0.02
	$CoCl_2$ $6H_2O$ (237,839)	7791-13-1	0.01
	Na_2MoO_4 $2H_2O$ (241,92)	10102-40-6	0.02
	H_2SeO_3	7783-00-8	0.0016
	$NaVO_3$ (121,93)	13718-26-8	0.0012
Vitamines	Thiamine HCl : $C_{12}H_{17}CI\ N_4OS$, HCL	67-03-8	0.01
	Vitamine B12 : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	68-19-9	0.00055
	Biotine (B7) : $C_{10}H_{16}N_2SO_3$	58-85-5	0.0005

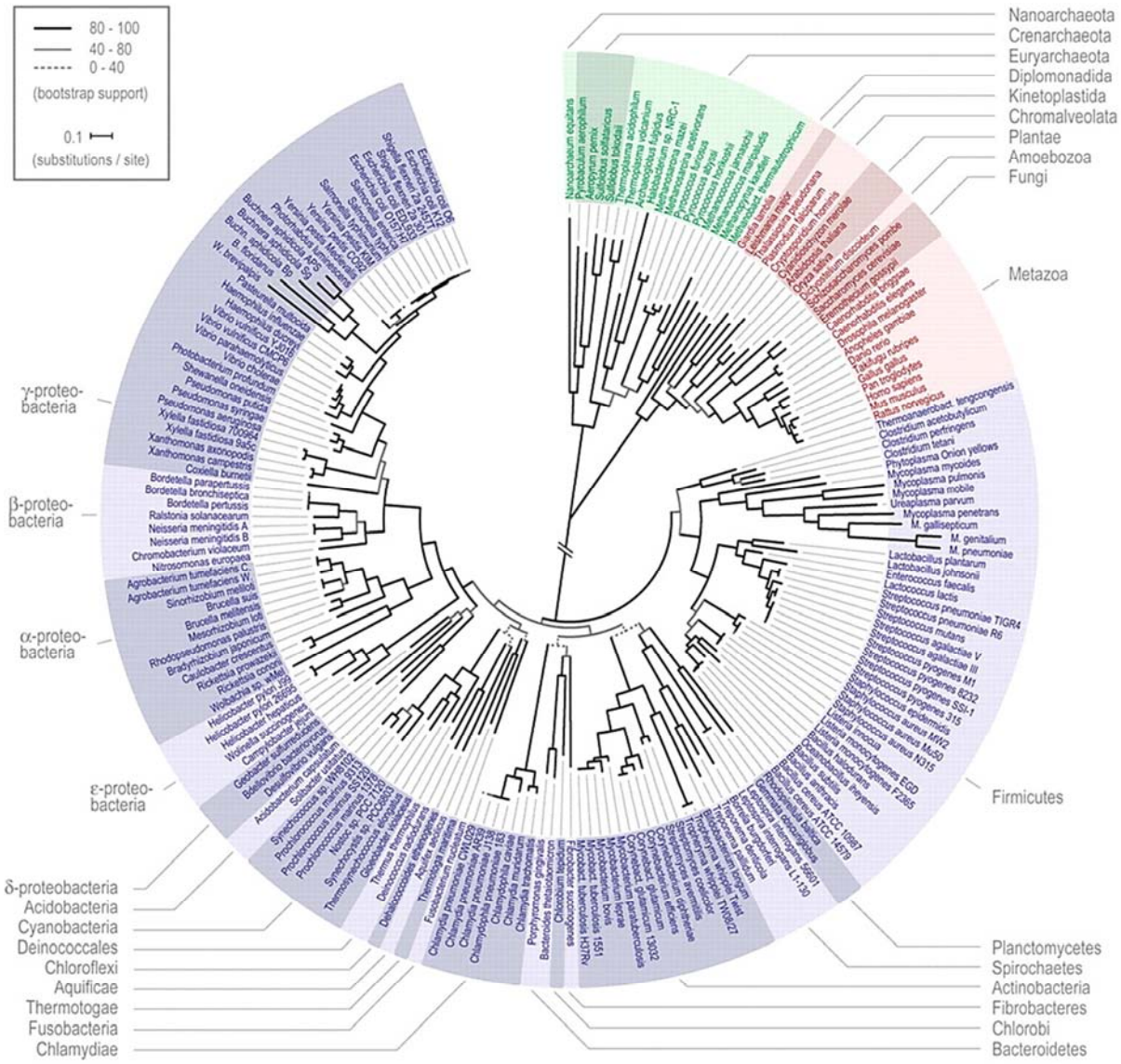
Les différentes solutions mères (x1000) des éléments majeurs étaient préparées séparément alors que les Oligo-éléments étaient préparés dans une même solution. Toutes étaient ensuite autoclavées (121°C, 1 bar, 20 mn). 1 ml de chaque solution était ensuite rajouté à 900 mL d'eau milli-Q. Le volume était ensuite complété à 1 L et le pH ajusté entre 6,4 et 6,6 avec une solution d'HCl. Le milieu était ensuite autoclavé comme ci-dessus et stocké dans le noir à température ambiante jusqu'à utilisation.

3 ARBRE PHYLOGENETIQUE SIMPLIFIE



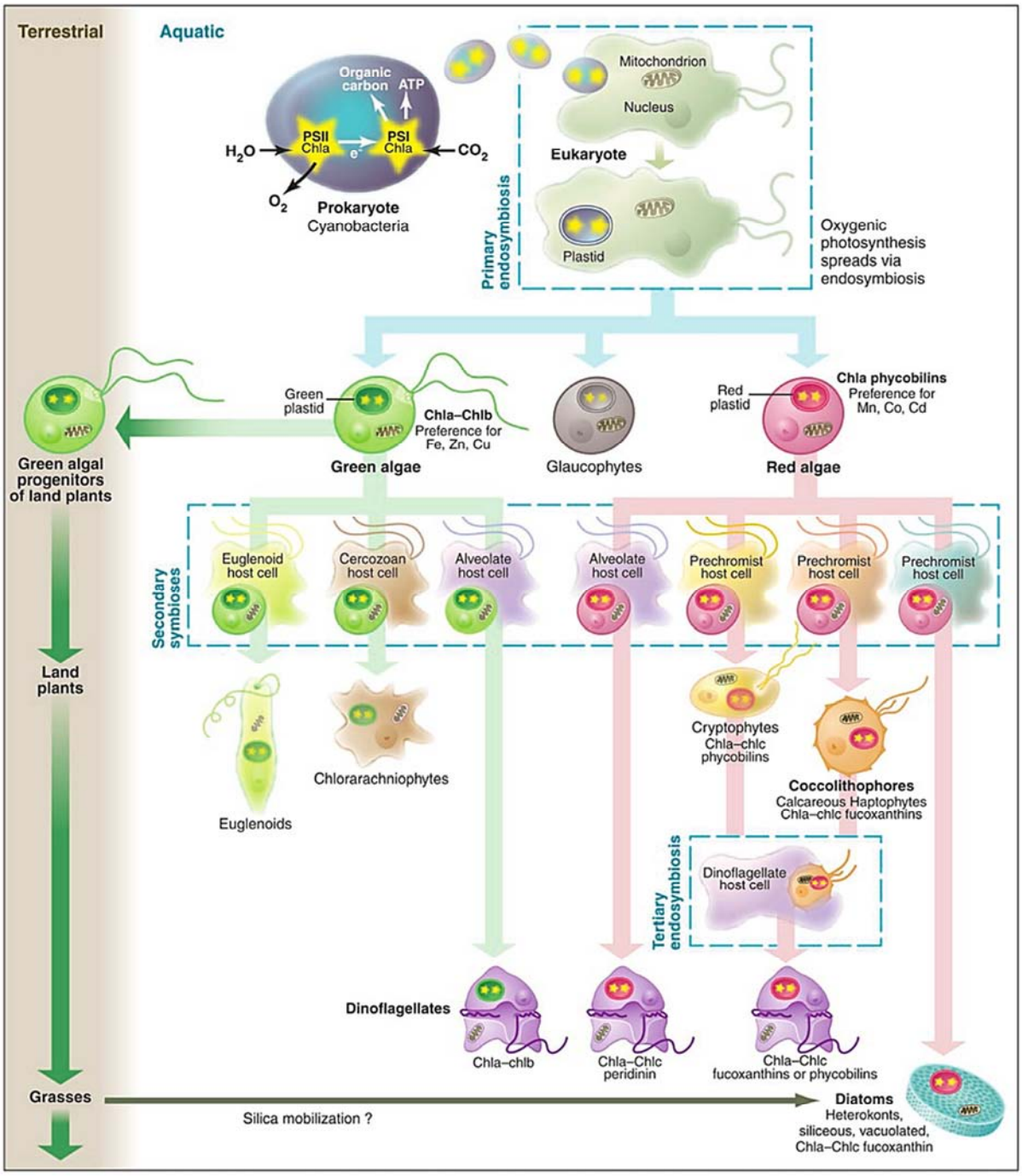
Classification extrêmement simplifiée du vivant : les dichotomies représentent les moments approximatifs de séparation entre deux groupes (spéciation), la taille des branches ne représente pas ici la distance phylogénétique (pour la connaitre, Cf. Annexe 3 bis). Les différentes tailles de cercles ne représentent pas non plus la diversité dans chaque clade. La grande majorité des métazoaires entretient des relations commensales ou symbiotiques avec des bactéries ou des algues (*e.g.* notre « flore » intestinale). C'est également des endosymbioses avec des bactéries qui ont abouti à la formation de mitochondries (siège de la respiration) chez l'ensemble des organismes eucaryotes (Figure L. Verneuil, Ecolab, inspirée de Lecointre and Le Guyader, 2006 ; Falkowski et al., 2004 ; Cicciarelli et al., 2006, et des cours de biologie animale et végétale dispensés à l'université Paul Sabatier). LUCA = Last Universal Common Ancestor

3BIS ARBRE PHYLOGENETIQUE DU VIVANT



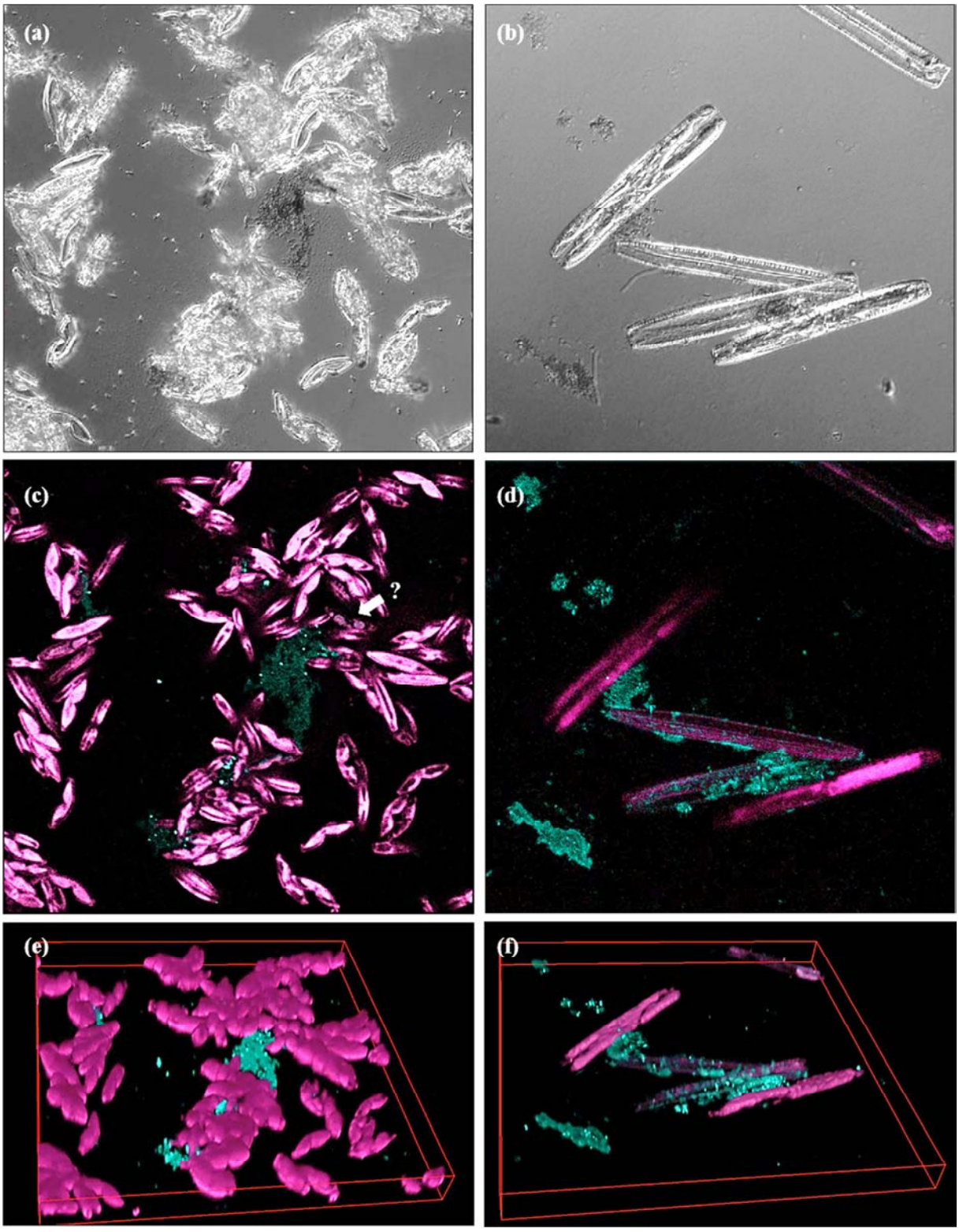
Arbre phylogénétique du vivant basé sur des données génétiques En rouge les eucaryotes, en vert les archées et en bleu les bactéries. On peut remarquer la grande diversité des bactéries en comparaison des eucaryotes. On remarque également une bien plus grande proximité entre les Chromalveolata (contenant les diatomées) et les métazoaires (les animaux dont l'Homme) qu'avec n'importe quelle bactérie ou archée. D'Après Cicciarelli et al., 2006. En bleu les procaryotes (bactéries et cyanobactéries), en rouge les eucaryotes et en vert les archées.

4 MODELE DE BASE DE L'HERITHAGE DES PLASTES DU PHYTOPLANCTON EUCARYOTE



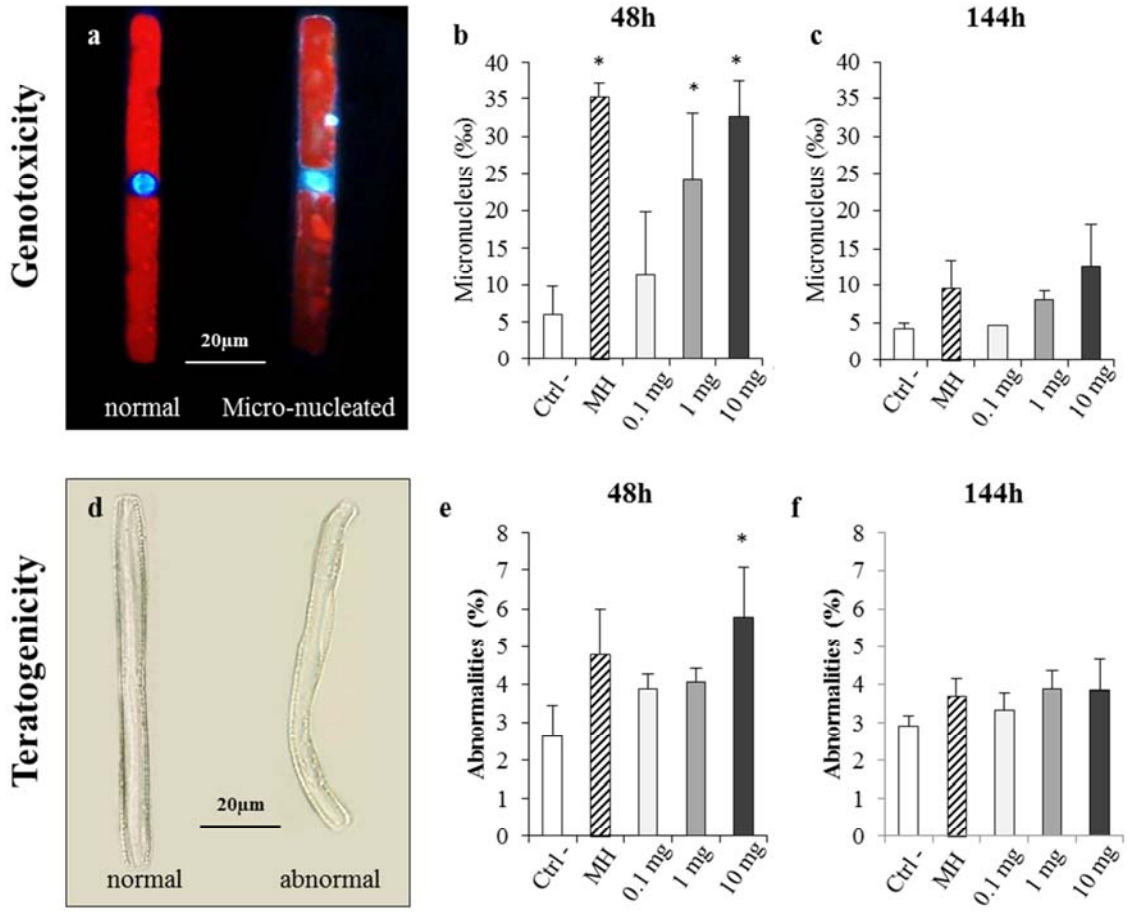
Le plaste initial, issu d'une cyanobactérie ancestrale, a été incorporé dans une cellule hôte eucaryote par l'intermédiaire d'une endosymbiose primaire aboutissant à un organisme eucaryote photosynthétique. Trois grands clades descendaient du symbiote primaire: un clade "vert", un clade "rouge", et les glaucocystophytes. Une branche du clade vert (les charophytes) a abouti aux plantes terrestres (embryophytes), qui possèdent toutes des symbiotes primaires. Trois symbioses secondaires se sont produites avec trois hôtes distincts. Ces symbiotes secondaires ont donné lieu aux Euglenophytes, Chlorarachnophytes, et dinoflagellés «verts». La dernière contient très peu d'espèces et n'est pas héréditaire. De même, le symbiote primaire rouge a été incorporé dans une variété de cellules hôtes eucaryotes pour donner lieu aux cryptophytes, haptophytes (y compris coccolithophoridés), hétérokontes (y compris les diatomées), et des dinoflagellés à péridinine. Ces derniers sont, de loin, les dinoflagellés les plus abondants. Trois autres groupes de dinoflagellés obtenus plastes des processus symbiotiques tertiaire, où les symbiotes photosynthétiques secondaires ont été englouties par une cellule dinoflagellés hétérotrophes. Les symbiotes secondaires comprennent cryptophytes, haptophytes, et les diatomées. Dans l'océan, la plupart du phytoplancton provient d'une endosymbiose secondaire avec un eucaryote rouge. D'après Falkowski et al., 2004

5 OBSERVATIONS AU MICROSCOPE BI-PHOTONIQUE DE *N. PALEA* ET *N. LINEARIS*



Images de *N. palea* prises sous microscope bi-photonique. (a) en lumière blanche, (c) en tomographie à mi-profondeur de l'échantillon et (e) en reconstruction 3D. *N. linearis* (b) en lumière blanche, (d) en tomographie à mi-profondeur de l'échantillon et (f) en reconstruction 3D. Les plastes matérialisant les diatomées sont colorés en rose et les MWNTC en bleu (pour plus de détails sur la réalisation des clichés, voir Matériel et méthodes du Chapitre 6). Ces observations montrent une forte adhérence des MWNTC aux cellules mourantes de *N. linearis*. Ceci était probablement lié à une production massive d'EPS lié au stress ou à un rejet massif de substances intracellulaires. Ainsi, les cellules mourantes ou mortes continuaient à jouer (malgré elles) un rôle positif sur l'agglomération et donc la détoxication des NTC, participant ainsi à la survie des cellules restantes. En (e) on peut observer une coloration verte des deux vacuoles (Flèche blanche). Cette cellule a pu internaliser des MWNTC. Cependant, aucune autre cellule ne présentait cette coloration, et l'entrée de NTC dans le cytoplasme de *N. palea* semble rester exceptionnelle (Microscope multi-photons 7MP, Zeiss Oberkochen, Allemagne. Photos L. Verneuil, Ecolab).

6 COMPLEMENTS DE RESULTATS DES TEST DE GENOTOXICITE ET TERATOGENICITE DU CHAPITRE 6



Compléments de résultats des tests de génotoxicité et de tératogénicité. (a) exemple de cellule normale et micro nucléée marqué au Hoechst 33342 et observé en microscopie à fluorescence. On remarque un phénomène de pycnose dans le cas de la cellule micro-nucléée. (b) nombre de MN induit par cycle de division cellulaire après 48h d'exposition et (c) après 144h. (d) exemple d'un frustule normal et présentant une anormalité. (e) résultats des comptages d'anomalies de frustules après 48h et 144h d'exposition. (les barres d'erreurs sont les écart-types. Une étoile représente une différence significative en comparaison du témoin négatif. (Ctrl- = témoin négatif; HM = témoin positif = hydrazine maléique). (Photos L. Verneuil, Ecolab)

ARTICLE EN CO-AUTEUR

Chemosphere 120 (2015) 230–236

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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

Toxicity of CeO_2 nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians

Agathe Bour, Florence Mouchet *, Laurent Verneuil, Lauris Evariste, Jérôme Silvestre, Eric Pinelli, Laury Gauthier

Université de Toulouse, UPS, INP, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement), ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France
CNRS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement), F-31326 Castanet-Tolosan, France

HIGHLIGHTS

- The ecotoxicity of two types of CeO_2 nanoparticles was studied.
- No toxicity was observed on diatoms or chironomid larvae.
- Amphibian larvae exhibited mortality, growth inhibition and genotoxicity.
- Toxicities were different depending on the species and the type of NP.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 February 2014
Received in revised form 26 June 2014
Accepted 3 July 2014

Handling Editor: A. Gies

Keywords:
Ecotoxicity
Cerium nanoparticles
Aquatic invertebrates
Amphibians
Algae

ABSTRACT

The aim of the present work is to provide wider information on the toxicity of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) in aquatic environments, by studying the toxicity of two types of CeO_2 NPs for four species (diatoms *Nitzschia palea*, the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius,* and the amphibian larvae *Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl.*). The two types of CeO_2 NPs have different intrinsic properties: some of them are small citrate-coated spheres (2–5 nm), and the others are larger uncoated plates (20–60 nm). Acute toxicity (mortality at 48 or 96 h, depending on the test-organism) was assessed for the four species, from 0.1 to 100 mg L^{-1} of NPs. Sub-lethal effects were assessed on chironomids exposed between 0.01 and 1 mg L^{-1} of NPs. Mortality, growth inhibition and genotoxic effects were evaluated on amphibian larvae from 0.1 to 10 mg L^{-1}. Results reveal that no acute toxicity occurs on any species after short exposures, even at the highest concentrations. Mortality (35%) is observed on *Xenopus* larvae after 12 d of exposure at the highest concentration of one type of NPs. No significant effects were observed on chironomids during chronic exposure. *Xenopus* larvae growth was inhibited from 1 mg L^{-1} of both NPs while growth inhibition is observed on *Pleurodeles* only at the highest concentration of one type of NPs. No genotoxicity was observed on *Xenopus* but *Pleurodeles* exhibited dose-dependent genotoxic effects when exposed to one type of NPs. Observed differences in toxicity are discussed focusing on the studied compartment, routes of exposure, species and NPs.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

In recent years, an explosion in nanoparticles (NPs) production and use has taken place. These particles of less than 100 nm have unique physical and chemical properties, making them extremely attractive for applications in many consumer products (The Royal Society, 2004) or for military or medical purposes (Huang et al., 2011; Shao et al., 2011). It is thus very likely that a non-negligible part, directly released during their life cycle, enters the environment (Keller et al., 2013). However, environmental impacts of such releases are still relatively unknown. If no strict regulations are currently effective concerning NPs, several recommendations are already available for industry and toxicological testing (FDA, 2012a,b; OECD, 2010a). The OECD also published a priority list for the testing of representative manufactured nanomaterials (OECD, 2010b), on which cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) appear.

Indeed, despite their important volume of production and use (fuel additives, coating, catalysis, cosmetics, etc.), there is a lack of information concerning their toxicity. Studies on CeO_2 NP ecotoxicity have been emerging these last few years, with different biological models: bacteria (Thill et al., 2006), terrestrial

* Corresponding author at: EcoLab, Campus ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France. Tel.: +33 (0)5 34 32 37 56.
E-mail address: florence.mouchet@ensat.fr (F. Mouchet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.012
0045-6535/© 2014 Published by Elsevier Ltd.

invertebrates (Roh et al., 2010), plants (Zhao et al., 2012), algae (Manier et al., 2013) and other aquatic organisms (Jemec et al., 2012). Authors also studied CeO_2 NP behavior in different aquatic environments and found that they tend to aggregate and sediment quickly (Keller et al., 2010; Quik et al., 2010), ending up in the sediment or at the sediment/water interface. This suggests that in the case of water contamination, exposure would affect not only organisms from the water column but also benthic organisms. These organisms are of prime importance from an ecological point of view, as they represent the base of the trophic chain.

Among them, diatoms are a valuable source of food for many aquatic organisms and are representative of numerous freshwater ecosystems. These benthic microalgae are well known bio-indicators for river pollution and are used for the evaluation of water quality (Debenest et al., 2008). Most of ecotoxicological studies on diatoms focus on heavy metals (Pandey et al., 2014) or pesticides (Debenest et al., 2010). Impacts of NPs on *Nitzschia palea* have so far been studied only once, with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (Verneuil et al., 2014). *Chironomidae* is an important group of benthic macroinvertebrates. Due to their short life cycle, small size and high density, different species of chironomids have been used in ecotoxicology. Among them, *Chironomus riparius* is commonly used to assess water and sediment quality. This species plays an important role in sediment reworking and is likely to bioaccumulate contaminants by sediment ingestion (Oberholster et al., 2011). To our knowledge, a few authors (Nair et al., 2013; Oberholster et al., 2011) have investigated NP toxicity on chironomids. Amphibian species are often used in ecotoxicity studies as representative species of the aquatic compartment. Among them, the anuran *Xenopus laevis* is widely used due to its high sensitivity to water contaminants, and a few authors have already tested different types of NPs (multi and double-walled CNTs, ZnO and TiO_2 NPs) effects on this organism (Mouchet et al., 2010; Nations et al., 2011; Zhang et al., 2012). *Xenopus* larvae are filter-feeders; contamination can therefore occur *via* skin contact and water filtration, but larvae can also graze biofilms at the surface of the sediment. As far as we know, this is the first time the newt *Pleurodeles waltl.* is being used for the evaluation of NP toxicity.

The aim of the present work is to provide wider information on CeO_2 NP toxicity in aquatic environments. CeO_2 NP toxicity was studied on the four species cited above: *N. palea* (acute toxicity), *C. riparius* (teratogenicity, chronic and acute toxicities), *X. laevis* and *P. waltl.* (acute, chronic and genetic toxicities). Primary characterization of NPs was also undertaken in order to investigate basic characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Nanoparticle preparation and characterization

A suspension of CeO_2 NPs was purchased (Nanobyk® 3810). These particles of 2–5 nm in size are coated with a tri-ammonium citrate layer. Non-coated CeO_2 NPs from Umicore Company (Nanograin®, Umicore) were provided as a powder preparation. NPs were suspended in ultrapure water at 10 g L^{-1} (pH 3.1, homogenization in ultrasonic bath (Bioblock, typ 570 HF Freq 35 kHz) for 1 h). Their primary sizes are comprised between 20 and 60 nm. These two types of CeO_2 NPs are further referred to as NP1 and NP2 respectively.

A Malvern zetasizer (Malvern Instruments Ltd) was used to control hydrodynamic diameter distribution (Dynamic Light Scattering method) and zeta potential. Transmission Electron Microscopy (TEM, Jeol Jem 2100, 200Kv, HR) was also performed for primary size and shape determination.

2.2. Organisms, breeding and toxicity assessment

2.2.1. Diatoms

N. palea algal cells (Canadian Phycological Culture Center, ref. CPCC-160) were axenically cultured in CHU 10 medium with Fe EDTA as iron source ($6.4 < pH < 6.6$). Medium was renewed 72 h before the experiments and prior to inoculum preparation. Experiments were performed at 20 ± 1 °C on a rotary shaker at 90 rpm under 16:8 light-dark cycles, with an illumination of 5500 lux. Exposure was realized according to Verneuil et al. (2014) in 12-well plastic plates. Each well was inoculated with 2.5×10^5 cells mL^{-1} of *N. palea*, and diatoms were then grown for 24 h in experimental conditions, without agitation, to allow cell adherence and resumption of an exponential growth recovery. Afterward, CeO_2 NP suspensions were added to get the desired concentrations up to 100 mg L^{-1}. Plates were then placed in test conditions. Living cells were counted daily, and growth rate was assessed after 48 h of exposure.

2.2.2. Chironomids

C. riparius larvae were obtained and grown at ECOLAB laboratory following standardized procedure (AFNOR, 2004).

Acute toxicity assessment consisted in 48 h of exposure to CeO_2 NPs. Ten larvae per condition were exposed in 300 mL glass beakers (Pyrex®) containing reconstituted water (RW, AFNOR, 2004). Contamination was made *via* the water column, up to 100 mg L^{-1}. Negative control consisted in reconstituted water (RW) only. Mortality was recorded after 48 h.

Growth inhibition and developmental delay are evaluated as chronic toxicity endpoints, following standardized procedures (AFNOR, 2004; OECD, 2004). Briefly, 48 h old larvae are exposed to CeO_2 NPs up to 1 mg L^{-1} for 7 d, in static conditions. Glass beakers containing sediment and RW are contaminated *via* the water column and placed at 21 ± 1 °C, with gentle aeration, under 16:8 light-dark cycles (10 larvae per beaker, 7 beaker per condition). A citrate control was also carried out to exclude the role of citrate coating in toxicity. Citrate concentration was chosen to correspond to the concentration present in 1 mg L^{-1} of CeO_2 NPs (*i.e.* the highest concentration tested). The larvae were fed every day with fish food solution (Tetramin®, France). At the end of the exposure, mortality was recorded and growth inhibition was determined by measuring surviving larvae (ImageJ® software). Cephalic capsule of each larvae were also measured in order to determine larval instars (Environment Canada, 1997) and assess potential delays in development.

Teratogenicity was evaluated on cephalic capsules as described by Dias et al. (2008). Mouth part deformities were assessed and rated according to Warwick and Tisdale (1988) and Vermeulen et al. (1998). Treatment groups were compared based on their rating (seriousness of deformities) and on probability of occurrence of deformities (individual or total deformities).

Life-cycle toxicity was assessed by studying the emergence of chironomids. Exposure was realized in the same conditions as previously, according to the OECD standardized procedure (OECD, 2004). The number of adults was recorded every day until no emergence occurred for 4 consecutive days in control condition.

Mortality, organism sizes and emergence rates were compared with a Kruskall–Wallis test, followed by Dunn's test to analyze differences between groups. Probability of occurrence of mouth part deformities in chironomids was determined with the chi square test. All analyses were performed using SigmaPlot 12.0 software.

2.2.3. Amphibians

X. laevis and *P. waltl.* amphibian larvae were obtained and grown at ECOLAB laboratory as described in Mouchet et al. (2007, 2011).

Acute toxicity test was performed on *Xenopus* at larval stage 50 (Nieuwkoop and Faber, 1956) after 96 h of exposure adapted from the 96 h LC50 acute fish toxicity test (OECD, 1992). Groups of 10 larvae (three replicates per condition) were exposed for 96 h under static conditions to CeO_2 NPs up to 100 mg L^{-1}, in 1L of RW. The number of dead larvae was recorded every day. Mortality, growth inhibition and genotoxicity were assessed on both amphibian species after twelve days of exposure, according to standardized procedures (ISO 21427-1, 2006). Groups of 20 *Xenopus* (Stage 50, Nieuwkoop and Faber, 1956) and 15 *Pleurodeles* (Stage 53, Gallien and Durocher, 1957) were exposed to CeO_2 NPs up to 10 mg L^{-1} in semi-static conditions. Positive control (cyclophosphamide (CP) (ISO 21427-1, 2006), a standard mutagen) and citrate control were also realized. The larvae were fed every day (Tetraphyll®). At the end of exposure, mortality was examined by counting dead animals and expressed as percentage. Chronic toxicity (growth inhibition) was evaluated by measuring the total body length of each larva at the beginning of the exposure and at the end of the exposure (analysis software (Madre, 2006)). Statistical analyses were performed on organisms' size using a Kruskall-Wallis test, followed by Dunn's test to analyze differences between groups. For the sake of clarity, graphic representation is based on growth rates (GR), calculated for each group as follows:

$$GR = (((AG)\text{-}(\text{negative control AG}))/\text{negative control AG}) * 100$$

with AG: average growth within a treatment group, determined as the difference between the average size at the end and the average size at the beginning of the experiment.

Genotoxicity was performed on blood samples obtained from anesthetized larvae (tricaine methane sulfonate, Sigma, France). The number of erythrocytes containing one micronucleus or more (micronucleated erythrocytes, MNE) was determined in a sample of 1000 erythrocytes per larva. Results were expressed as number of MNE per thousand (MNE‰). The statistical method used is based on comparisons of medians, by determining the theoretical median for each group (McGill et al., 1978). The difference between the theoretical medians of the test groups and the theoretical median of the negative control group is significant if there is no overlap (95% certainty). In this case, the induction of micronucleus in exposed larvae is considered as a significant genotoxic response.

3. Results

3.1. Nanoparticle characterization

NP1 have a zeta potential in stock suspension of −28 ± 8 mV and a hydrodynamic diameter of 8.5 ± 0.2 nm. TEM characterization shows spherical NPs with diameter around 2–5 nm. NP2 are non-coated plates. Their zeta potential in stock suspension is +42 ± 2 mV and they have a hydrodynamic diameter of 90 ± 2 nm. TEM characterization shows heterogeneous sizes, ranging from 20 to 60 nm. TEM images of both types of CeO_2 NPs are shown in supporting information (SI, Fig. S1).

3.2. Toxicity on diatoms

Cell counting revealed similar growth rates among groups after 48 h of exposure and up to 100 mg L^{-1}, showing no acute toxicity of CeO_2 nanoparticles on *N. palea* (Fig. S2).

3.3. Toxicity on chironomids

During the 48 h exposure to NP2, visual observation of the larvae revealed white aggregates in digestive tracts (Fig. 1A), corresponding to ingested NPs. Despite this considerable ingestion, no mortality was observed up to 100 mg L^{-1}. Chironomids exposed to NP1 were not visually different from control. However, it cannot be concluded that NP1 were not ingested by the larvae.

The study of mouthpart deformities revealed no teratogenicity on *C. riparius*. Group comparison based on ratings revealed no teratogenicity, whatever the concentration or the types of CeO_2 NPs. Groups were also compared based on probability of deformity occurrence, and no difference between groups was highlighted either with this method.

No growth inhibition was observed on larvae after 7 d of exposure (Fig. S3), whatever the type of CeO_2 NP or the concentration. Similarly, cephalic capsule measurement revealed no significant differences between treatments groups, meaning no delay in larval development compared to control.

Total emergence was not significantly different between groups, ranging from 55% to 72% for negative control. Emergence kinetic was also similar among treatments, with the first emergences starting at day 16 post hatching, and last emergences occurring 6 d later, which corresponds to the standard kinetic of development of *C. riparius* (Fig. 2).

3.4. Toxicity on amphibians

When NP2 is added to the exposure medium, it becomes slightly milky and small white aggregates are quickly visible. White "masses" were observed in *Xenopus*' digestive tract (Fig. 1B) and were not observed in control or NP1 exposure conditions. It was thus concluded that these "masses" were NP2 aggregates ingested by the larvae. The observation of the gills showed no differences between exposure (NP1 and NP2) and control groups.

Significant mortality (35%) was observed on *Xenopus* larvae exposed to the highest concentration of NP2 (10 mg L^{-1}). No mortality was observed at lower concentrations or with NP1. Consequently, a 96 h acute toxicity assay was realized on *Xenopus* with NP2, with up to 100 mg L^{-1} of NPs. No toxicity was observed during this 96 h exposure. No mortality was observed on *Pleurodeles* during the 12 d exposure (Table 1). Significant growth inhibition was observed on *Xenopus* larvae exposed to NP1 and NP2 at 1 and 10 mg L^{-1}, and on *Pleurodeles* exposed to 10 mg L^{-1} of NP2 (Table S1, Fig. 3).

Concerning genotoxicity assessment, median values of MNE‰ for negative controls were 1 ± 0.7 and 3 ± 1.0, for *Xenopus* and *Pleurodeles* respectively. Results were significantly higher for positive controls, with median values of 6 ± 3.3 and 9 ± 3.8 for *Xenopus* and *Pleurodeles* respectively. *Xenopus* larvae exposed to CeO_2 NPs or citrate control showed no significant genotoxicity, whatever the concentration or the type of CeO_2 NP. On the contrary, a dose-dependent and significant genotoxicity was observed on *Pleurodeles* larvae exposed to NP2 only. Median values of MNE‰ were 7 ± 1.4 and 9 ± 1.4 for larvae exposed to 1 and 10 mg L^{-1} of NPs, showing a significant MNE induction. No genotoxicity was observed on *Pleurodeles* exposed to NP1 or citrate control solution (Fig. 4).

4. Discussion

4.1. Diatoms and chironomid larvae: two benthic species

No toxicity was observed on diatoms after NP exposure in the present study. It has been shown that diatoms produce extracellular polymeric substances (EPS) when exposed to nanoparticles, presumably as a protection against NPs (Miao et al., 2009; Verneuil et al., 2014). Indeed, MWCNTs were shown to aggregate significantly on the EPS net but not directly at the surface of the diatoms, highlighting that EPS can prevent direct contact between

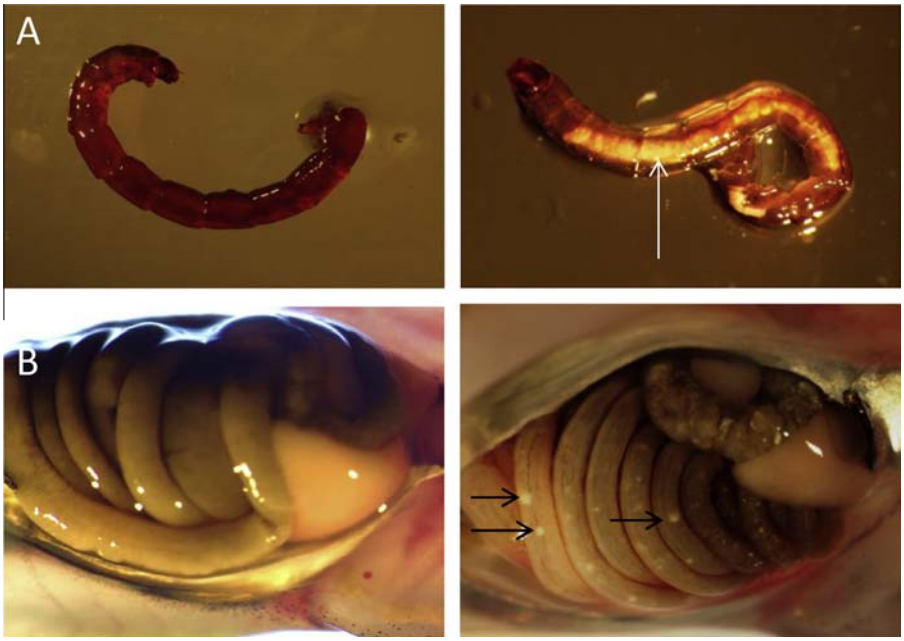


Fig. 1. (A) Macro observation (x8, white light) of *C. riparius* after 48 h of exposure to NP2 (right) compared to negative control larvae (left). White arrow shows the content of the digestive tract in the exposed larvae. (B) Macro observation (x8, white light) of *X. laevis* after 12 d of exposure to NP2 (right) compared to negative control larvae (left). Black arrows show NP aggregates in the digestive tract.

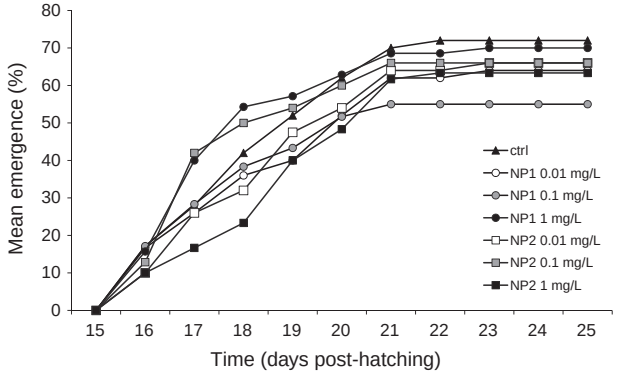


Fig. 2. Emergence of *C. riparius* exposed to NPs. Mean emergence is calculated on 70 individuals. Error bars are not represented for clarity purposes. ctrl: control.

particles and the diatoms. Another major protection for diatoms is the silica frustule, that acts as a shield against some predators or substances (Hamm et al., 2003). Verneuil et al. (2014) showed that *N. palea* frustules have nanometric pores, less than 100 nm in diameter. Then NPs or NP aggregates would not be able to go through the frustule. Branco et al. (2010) also showed that *N. palea* produces phytochelatins when exposed to cadmium, thus playing an important role in metal and metalloids detoxication in cells. Frustule, EPS and phytochelatin production represent three important barriers that could explain the absence of toxicity in diatoms in our exposure conditions.

Contrarily, other studies have shown that NPs induced growth inhibition on diatoms. It has been reported that marine diatoms were sensitive to TiO_2 and ZnO NPs (Clément et al., 2013; Peng et al., 2011). Miao et al. (2009) found that Ag NP aggregates were not toxic for diatoms, but Ag NP dissolution led to toxic free ions.

Toxicity of CeO_2 NPs on *C. riparius* larvae was assessed with a panel of endpoints covering the whole developmental phase of the larvae, including time and rate of emergence. The larvae had an important reworking activity on the CeO_2 NPs, and ingested large amounts of materials. Chironomid larvae feeding and burrowing activity involve particle ingestion and mucus secretion, leading to the production of mucus bounded pellets (Lagauzère et al., 2009; Leuchs and Neumann, 1990). This explains the very large aggregates observed during the 48 h exposure to NP2. However, these large aggregates were not observed with NP1. One possible explanation is that the coating of NP1 prevents their aggregation, making them more stable in suspension and less available for the larvae. Despite chironomids exposure *via* water and the important ingestion of NPs, no mortality was observed during experiments in short or long term exposures, whether at low or high concentrations. On the contrary, Lee et al. (2009) and Oberholster et al. (2011) reported mortality on chironomids exposed to 1 mg L^{-1} of CeO_2 NPs and silica NPs respectively. Furthermore, no growth inhibition or development impairment was observed, similarly to Lee et al. study (2009). Oberholster et al. (2011) reported growth inhibition in *Chironomus tentans* exposed to silica and alumina NPs. Emergence impairment has been shown with heavy metals (Pascoe et al., 1989), but this is the first time emergence time and rate are studied on *C. riparius* after exposure to NPs.

Table 1
Acute toxicity (% of mortality) in amphibian larvae exposed to NPs.

	NP1			NP2		
	0.1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}
X. laevis	0	0	0	0 (12 d exposure) 0 (96 h exposure)	0 (12 d exposure) 0 (96 h exposure)	35 (12 d exposure) 0 (96 h exposure)
P. waltl.	0	0	0	0	0	0

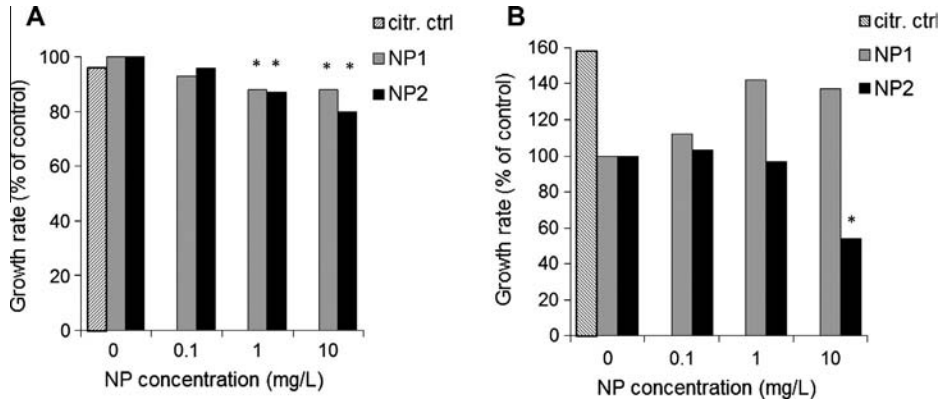


Fig. 3. Growth rate of amphibian larvae (A: *X. laevis;* B: *P. waltl.*) exposed to NPs. citr. ctrl: citrate control. *significantly different from control.

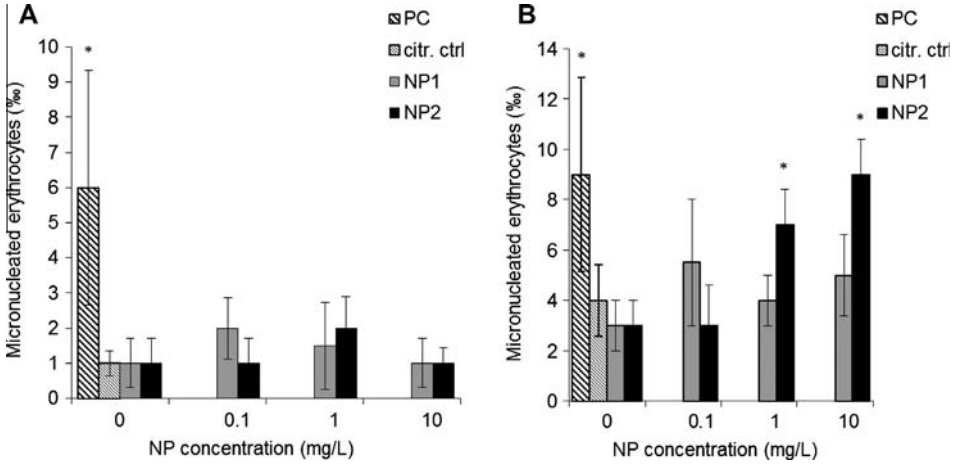


Fig. 4. Genotoxicity of amphibian larvae (A: *X. laevis;* B: *P. waltl.*) exposed to NPs. Error bars show the 95% confidence interval of median values. PC: positive control. citr. ctrl: citrate control. *significantly different from control.

4.2. Amphibian larvae: two species exposed via the water column

A few authors have investigated the toxicity of nanoparticles on amphibian species, but no study on CeO_2 NPs has been conducted. In our study, we exposed *P. waltl.* and *X. laevis* larvae in standardized conditions.

Mortality among *X. laevis* larvae varied depending on the mode of exposure. These results are not surprising though, and highlight the importance of the mode of exposure in ecotoxicology, especially where nanoparticles are concerned. Indeed, this new kind of contaminant does not behave like chemical contaminants, such as metals or pesticides. NPs may tend to aggregate and sediment. Thus, time of exposure, medium renewal and other exposure parameters are crucial in terms of toxicity. The observed mortality is in accordance with studies on *Xenopus* exposed to nanoparticles (Nations et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Toxicity on amphibian larvae also differed depending on the species. Studies showed similar results when comparing different species (Baker et al., 2013). If *Xenopus* seem more sensitive than *Pleurodeles* when assessing mortality or growth inhibition, the opposite response was observed for genotoxicity. No genotoxicity was observed on *Xenopus* exposed to CeO_2 NPs, while a clear dose-dependent genotoxic effect was induced in *Pleurodeles* in presence of NP2. Two hypotheses could be put forward to explain the differences in genotoxicity between these two species: (i) a difference in CeO_2 pharmacokinetic into the organism, associated to the physiology of these organisms (different feeding behavior, external or internal gills) and (ii) different hematopoiesis localization in *Xenopus* and *Pleurodeles*. Micronuclei result from chromosome breaks (or mitotic anomalies) that require a passage through mitosis (hematopoiesis) to be recognizable (Pourrut et al., 2011). So, the induction of MN depends on the sensitivity of the organs where hematopoiesis takes place.

Finally, toxicity appeared slightly higher in presence of NP2 than NP1 for amphibians. Several parameters could explain this difference. Size, surface area and shape are commonly mentioned to explain differences in toxicity. George et al. (2012) found that silver nanoplates are more toxic than nanospheres because of defects presents on the NPs, more likely to occur on plates rather than on nanospheres. Dissolution and free ions are also mentioned to explain toxicity.

4.3. Different exposure routes, different toxicities

This study highlighted different forms of toxicities in presence of CeO_2 NPs, depending on the studied species. Despite the broad range of concentrations tested, from 0.01 mg L^{-1} to the extremely high concentration of 100 mg L^{-1}, no toxicity was observed on diatoms or chironomid larvae. Different responses in term of acute, chronic or genotoxic effects were observed on amphibian larvae, depending on the species. As discussed above, the toxicity observed seems to be highly species-dependent. Several parameters can influence toxicity. The route of exposure is a major parameter impacting toxicity, and all the four species studied present different routes of exposure. *N. palea* are benthic diatoms, only exposed to particles that sediment at the bottom of the aquatic

compartment, at the interface between sediment and the water column. *C. riparius* have considerable sediment reworking activity, making contact with contaminated sediment an important route of exposure. Moreover, they present two feeding behaviors: they are filter-feeders and deposit-feeders, meaning that they both pump water with food particles and graze the particles at the surface of the sediment (Leuchs and Neumann, 1990). Waterborne exposure and ingestion of contaminated sediment or direct ingestion of NPs are thus very likely to occur. Finally, amphibian larvae live in the water column, so water is their main route of exposure in the present experiment.

Species present different natural defense systems. Diatoms were shown to produce EPS and phytochelatins as a protection when exposed to contaminants. Chironomid larvae secrete mucus for their reworking activity, but this mucus is also a protective substance for the larvae, as shown in *Tubifex tubifex* larvae exposed to uranium (Lagauzère et al., 2009). No such natural defense system is known in amphibian species at the stage of development studied. Bacchetta et al. (2012) showed that 96 h-old *X. laevis* larvae secreted mucus when exposed to high concentrations of carbon nanopowder, as a response of a pre-inflammation status, but not as a preventive defense secretion. The presence of internal or external protective substances, as phytochelatins and EPS for diatoms and mucus for chironomids, is a possible explanation to the absence of toxicity for these species. On the contrary, the absence of preventive systems of protection in amphibian species could explain the observed toxicity. While the present study focuses on single species exposures, it offers the first elements for consideration and studies on a larger scale, including possible trophic relation between species. As discussed above, chironomid and amphibian larvae ingested nanoparticles, and several authors observed similar ingestion during experiments (Auffan et al., 2013; Mouchet et al., 2011). It was also shown that NPs could aggregate on the surface of diatoms or on their EPS (Morelli et al., 2013; Verneuil et al., 2014). These observations are of prime importance in our study. The possible aggregation on diatoms, which are the base of the trophic chain, and the important ingestion by primary consumers (*i.e.* chironomid and *Xenopus* larvae) would suggest that effects of NPs *via* the trophic route could be considerable. The combination of the extreme resistance of chironomid larvae, their significant ingestion of CeO_2 NPs and their widespread distribution in many aquatic systems make chironomid larvae a potentially important vector for biomagnification. Furthermore, the sensitivity observed on *Pleurodeles*, which are secondary consumers, suggests possible drastic consequences in case of biomagnification. Thus, this work highlights the importance of a better understanding of nanoparticle impacts on aquatic organisms, through future studies using experimental or natural trophic chains.

5. Conclusion

Both types of CeO_2 NPs were shown to be not toxic for *N. palea* or *C. riparius*. On the contrary, both amphibian larvae exhibited toxicity, with different sensitivities depending on species or the type of NPs. Mortality and growth inhibition were observed on *X. laevis* at the highest concentration of NP2, but no genotoxicity was evidenced. No mortality was recorded among *P. waltl.* and growth inhibition was observed at the highest concentration of NP2 only. A dose-dependent genotoxic response was observed in presence of NP2, while NP1 had no effects. Several factors could explain the differences observed between the species, such as different routes of exposure, different defense systems of the organisms, or different sensitivities inherent to each species, including their feeding behavior. Moreover, the different responses induced by the two types of CeO_2 NPs could be explained by their distinct characteristics, such as size, shape or coating.

This study provides wider information on CeO_2 NP toxicity on species representative of the different aquatic compartments, and also representative of different trophic levels, from primary producer to secondary consumer. This work on single species is the first step in the study of CeO_2 NP toxicity through the trophic chain, which is an essential exposure route to take into account in ecotoxicology.

Acknowledgments

The authors are grateful to the French National Research Agency (ANR) for its financial support, which allowed the establishment of the MESONNET project, in which this study was conducted. The authors also thank Annie Perrault (ECOLAB, Toulouse, France) for her helpful technical assistance and Mélanie Auffan (CEREGE, Aix en Provence, France), Sophie Caissaignon and Corinne Chaneac (Collège de France, Paris, France) for CeO_2 NPs preparation. The English language of the manuscript has been corrected by the native English Rashard Khadaroo (Université Paul Sabatier, Toulouse, France).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.012.

References

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de *Chironomus riparius*.

Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.-Y., Thiery, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO_2 nanoparticles within *Daphnia pulex*. Water Res. 47, 3921–3930. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.063.

Bacchetta, R., Tremolada, P., Di Benedetto, C., Santo, N., Fascio, U., Chirico, G., Colombo, A., Camatini, M., Mantecca, P., 2012. Does carbon nanopowder threaten amphibian development? Carbon 50, 4607–4618. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.05.047.

Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. Sci. Total Environ. 449, 150–156. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.056.

Branco, D., Lima, A., Almeida, S.F.P., Figueira, E., 2010. Sensitivity of biochemical markers to evaluate cadmium stress in the freshwater diatom *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith. Aquat. Toxicol. Amsterdam, Neth. 99, 109–117. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.010.

Clément, L., Hurel, C., Marmier, N., 2013. Toxicity of TiO(2) nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – effects of size and crystalline structure. Chemosphere 90, 1083–1090. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.013.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. Aquat. Toxicol. Amsterdam, Neth. 88, 88–94. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.03.011.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 203, 87–103. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4_2.

Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.-M., 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. Chemosphere 71, 574–581. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.029.

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique: essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

FDA, 2012a. Guidance for Industry. Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

FDA, 2012b. Guidance for Industry. Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Gallien, Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. Bull. Biol. Fr. Belg. 91, 97–114.

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos. ACS Nano 6, 3745–3759. http://dx.doi.org/10.1021/nn204671v.

Hamm, C.E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., Smetacek, V., 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature 421, 841–843. http://dx.doi.org/10.1038/nature01416.

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 155, 344–357. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.004.

ISO 21427-1:2006, 2006. Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei. Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae.

Jemec, A., Djinović, P., Tišler, T., Pintar, A., 2012. Effects of four CeO_2 nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish *Danio rerio* and crustacean *Daphnia magna*. J. Hazard. Mater. 219–220, 213–220. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.080.

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. Environ. Sci. Technol. 44, 1962–1967. http://dx.doi.org/10.1021/es902987d.

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15, 1–17. http://dx.doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4.

Lagauzère, S., Pischedda, L., Cuny, P., Gilbert, F., Stora, G., Bonzom, J.-M., 2009. Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 157, 1234–1242. http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.004.

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

Leuchs, H., Neumann, D., 1990. Tube texture, spinning and feeding behaviour of Chironomus larvae. Zool. Jahrb. Abt. Syst. Ökol. Geogr. Tiere 117, 31–40.

Madre, J.F., 2006. Logiciel Mesurim. Académie d'Amiens. <http://svt.ac-amiens.fr/archives_svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm>.

Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., Pandard, P., 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO_2 nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ. Pollut. 180, 63–70. http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.04.040.

McGill, R., Tukey, J.W., Larsen, W.A., 1978. Variations of box plots. Am. Stat. 32, 12. http://dx.doi.org/10.2307/2683468.

Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 (157), 3034–3041. http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047.

Morelli, E., Salvadori, E., Bizzarri, R., Cioni, P., Gabellieri, E., 2013. Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the green alga *Dunaliella tertiolecta*: a biophysical approach. Biophys. Chem. http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.007.

Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. Environ. Toxicol. 22, 422–435. http://dx.doi.org/10.1002/tox.20267.

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2010. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomedicine 5, 963–974. http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.60.

Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2011. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. Environ. Toxicol. 26, 136–145. http://dx.doi.org/10.1002/tox.20537.

Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. Chemosphere 92, 592–599. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.060.

Nations, S., Long, M., Wages, M., Canas, J., Maul, J.D., Theodorakis, C., Cobb, G.P., 2011. Effects of ZnO nanomaterials on *Xenopus laevis* growth and development. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 203–210. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.018.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland Pub. Co.

Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A.-M., Chelule, P.K., Focke, W.W., Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 416–423. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.012.

OECD, 1992. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

OECD, 2004. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2010a. Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme; first revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 25, Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2010b. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27, Organisation for Economic Co-operation and Development.

Pandey, L.K., Kumar, D., Yadav, A., Rai, J., Gaur, J.P., 2014. Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. Ecol. Indic. 36, 272–279. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.08.002.

Pascoe, D., Williams, K.A., Green, D.W.J., 1989. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen – effects upon larval development and adult emergence. Hydrobiologia 175, 109–115. http://dx.doi.org/10.1007/BF00765121.

Peng, X., Palma, S., Fisher, N.S., Wong, S.S., 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. Aquat. Toxicol. Amsterdam, Neth. 102, 186–196. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.014.

Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., Pinelli, E., 2011. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 726, 123–128. http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.001.

Quik, J.T.K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C.J.H., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., Dawson, K.A., Stuart, M.A.C., Van De Meent, D., 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. Chemosphere 81, 711–715. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.062.

Roh, J.-Y., Park, Y.-K., Park, K., Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO_2 and TiO_2 nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. Environ. Toxicol. Pharmacol. 29, 167–172. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003.

Shao, Gao, Yan, 2011. Semiconductor quantum dots for biomedicial applications. Sensors.

The Royal Society, 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO_2 nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. Environ. Sci. Technol. 40, 6151–6156. http://dx.doi.org/10.1021/es060999b.

Vermeulen, A.C., Dall, P.C., Lindegaard, C., Ollevier, F., Goddeeris, B., 1998. Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams [WWW Document]. <https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/60272> (accessed 09.04.12).

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.C., Bourdiol, F., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter and the benthic diatom *Nitzschia palea*: "a sticky story". Nanotoxicology 1–11. http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2014.918202.

Warwick, Tisdale, 1988. Morphological deformities in *Chironomus, Cryptochironomus*, and *Procladius Larvae* (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin Lake, Saskatchewan. Can. J. Fish Aquat. Sci. 45.

Zhang, J., Wages, M., Cox, S.B., Maul, J.D., Li, Y., Barnes, M., Hope-Weeks, L., Cobb, G.P., 2012. Effect of titanium dioxide nanomaterials and ultraviolet light coexposure on African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Environ. Toxicol. Chem. SETAC 31, 176–183. http://dx.doi.org/10.1002/etc.718.

Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C., Zhang, J., Aguilera, R.J., Keller, A.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2012. Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO_2 NPs by corn plants grown in soil: insight into the uptake mechanism. J. Hazard. Mater. 225–226, 131–138. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.008.

CONFERENCES ET POSTERS

COMMUNICATION ORALE DURANT LA CONFERENCE NANOBIOEUROPE DU 10 AU 12 JUIN 2013 (TOULOUSE, FRANCE)

Investigation of the potential toxicity / ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes

E. Flahaut*, F. Bourdiol, L. Verneuil, F. Mouchet, P. Puech, J. C. Boutonnet, Ch. Gancet, L. Gauthier, E. Pinelli

** CIRIMAT, UMR 5085, Université Paul Sabatier, Toulouse*

flahaut@chimie.ups-tlse.fr

Résumé :

The answer to the question of the potential toxicity of carbon nanotubes is not very clear yet. Indeed, many parameters make it difficult to compare the results published in the literature: the synthesis route (arc-discharge, CCVD, etc.), the kind of catalyst (and mainly the metal residues in the final sample), the length, surface chemistry, specific surface area, etc.; The nature of the toxicity / ecotoxicity model used is also very important (in vitro using normal or cancer cells, in vivo, etc.).

However, some promising biomedical applications are already in development. These applications mainly include 2 categories, related to different fields of applications. In the first case, the nanotubes are intended to be localized in a specific area of the body, such as inside an implant where they would be used as a substrate for cell growth (tissue engineering) [1]. In the second one, they are intended to be used for systemic distribution, and used as cargoes for drug-delivery, or contrast agent for imaging [2]. These 2 situations represent very different scenarios in terms of potential toxicity.

In this work, double-walled carbon nanotubes (DWNTs) are synthesized by a Catalytic Chemical Vapour Deposition process developed at the CIRIMAT [3]. After summarizing our main results in terms of toxicological investigations of DWNTs, we will briefly present different potential applications currently in development in the two categories defined above, as substrate for the guided growth of neurons, MRI contrast agents or cargoes for drug-delivery. Our latest results in terms of interaction between neuron cells and DWNTs will be presented, showing that they enhance significantly the development of neurites and limit the differentiation into scar tissue, which is very attractive for in vivo applications (implants, or monitoring electrodes).

References:

[1] A. Beduer, L. Vaysse, E. Flahaut, F. Seichepine, I. Loubinoux, Ch. Vieu, Microelec. Eng., 88, (2011), 1668-1671; [2] V. Sanz, C. Tilmacîu, B. Soula, E. Flahaut, H.M. Coley, S.R.P. Silva, J. McFadden, Carbon, 49, (15), (2011), 5348-5358; [3] E. Flahaut, R. Bacsa, A. Peigney, Ch. Laurent, Chem. Commun., (2003), 1442-1443;

COMMUNICATION ORALE AUX "*JOURNEES NATIONALES NANOSCIENCES ET NANOTECHNOLOGIES*" DU 4 AU 6 NOVEMBRE 2013 (MARSEILLE, FRANCE)

Toxicité et impact environnemental des nanotubes de carbone et du graphène

E. Flahaut[*], A. Beduer, C. Vieu, J.J. McFadden, A. M. Galibert, B. Soula, F. Bourdiol, L. Verneuil, F. Mouchet, E. Pinelli, L. Gauthier

[*]***CIRIMAT, UMR CNRS5085, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse Cedex 9***

Les nanotubes de carbone (NTC) sont un peu la figure emblématique des nanoparticules en général : leurs applications (dont certaines sont déjà commerciales) sont nombreuses, et leur morphologie peut rappeler celle de l'amiante : le lien avec un impact potentiel sur la santé humaine, et plus largement sur l'environnement, semble à première vue facile à établir. Dans les faits, la réalité est bien plus complexe : derrière le terme "nanotubes de carbone" se cache en réalité toute une famille de nanoparticules aux caractéristiques finalement assez différentes (morphologie, chimie de surface, pureté, *etc*.) et donc l'impact potentiel sur la santé et l'environnement est lui aussi a priori très variable. Après une introduction générale, nous détaillerons le cas particulier des NTC biparois - dont la synthèse est la spécialité du CIRIMAT [1] - et pour lesquels de nombreuses études de toxicité et d'écotoxicité ont déjà été réalisées à la fois aux niveaux national et international [2]. Nous tâcherons de montrer pourquoi il est si difficile de répondre à la question générale de la toxicité et de l'écotoxicité des NTC tout en présentant quelques applications potentielles des NTC dans le domaine biomédical (imagerie, délivrance de médicaments, ingénierie tissulaire) [3].

Finalement, un rapide survol d'un autre type de nanomatériau carboné, le graphène, sera présenté. En effet, ce dernier suscite aussi depuis plusieurs années déjà un engouement particulier en raison une fois encore de nombreuses possibilités d'applications, et les questions relatives à son impact potentiel sur la santé humaine et sur l'environnement se posent donc de la même manière que pour les NTC.

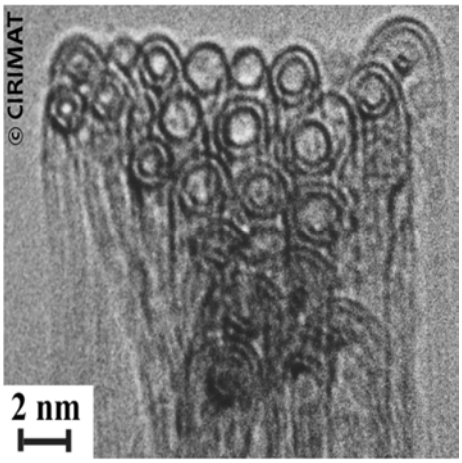


Image MET de NTC biparois [1]



Exposition de Xénope aux NTC biparois

Référence :[1] E. Flahaut, R. Bacsa et al., Chem. Commun., (2003), 1442-1443.[2] (a) C. Salvador-Morales, E. Flahaut et al., Molecular Immunology, 43, (3), (2006), 193-201 ; (b) J. Cheng, E. Flahaut et al., Environmental Toxicology and Chemistry, 26, (4), (2007), 708-716 ; (c) F. Mouchet, P. Landois et al., Nanotoxicology, 1, (2), (2007), 149-156 ; (d) V. Neves, E. Heister et al., Adv. Funct. Mater., 20, (19), (2010), 3272–3279 ; (e) E. Meunier, A. Coste et al., Nanomedicine, 8, (6), (2012), 987–995.[3] (a) V. Sanz, C. Tilmacîu et al., Carbon, 49, (15), (2011), 5348-5358 ; (b) P. Lukanov, V. K. Anuganti et al., Adv. Funct. Mater., 21, (2011), 3583–3588 ; (c) A. Béduer, F. Seichepine et al., Langmuir, 28, (50), (2012), 17363–17371.

COMMUNICATION ORALE DURANT L'*INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INORGANIC AND ENVIRONMENTAL MATERIALS.* DU 27 AU 31 OCTOBRE 2014 (RENNES, FRANCE)

Nanotechnology – Invited Speakers

Potential toxicity / ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes: fears and hopes

Emmanuel Flahaut [1], Amélie Beduer [2], Christophe Vieu [2], Johnjoe Mcfadden, Anne-Marie Galibert [1], Brigitte Soula [1], Floriane Bourdiol [1], Laurent Verneuil, Florence Mouchet, Eric Pinelli, Laury Gauthier

[1] Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-Universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), CNRS UMR5085, and [2] Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes (LAAS), CNRS UPR8001, Université Paul Sabatier - Toulouse III, Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse - France

Although the answer to the question of the potential toxicity of carbon nanotubes is not very clear yet, some promising biomedical applications are already in development. These applications mainly include 2 categories, related to different fields of applications. In the first case, the nanotubes are intended to be localized in a specific area of the body, such as inside an implant where they would be used as a substrate for cell growth (tissue engineering) [1]. In the second one, they are intended to be used for systemic distribution, and used as cargoes for drug-delivery, or contrast agent for imaging [2]. These 2 situations represent very different scenarios in terms of potential toxicity.

In this work, double-walled carbon nanotubes (DWNTs) are synthesized by a Catalytic Chemical Vapour Deposition process developed at the CIRIMAT [3]. After summarizing our main results in terms of toxicological investigations of DWNTs, we are presenting different potential applications currently in development in the two categories defined above, as substrate for the guided growth of neurons, MRI contrast agents or cargoes for drug-delivery. Our latest results in terms of interaction between neuron cells and DWNTs will be presented, showing that they enhance significantly the development of neurites and limit the differentiation into scar tissue, which is very attractive for in vivo applications (implants, or monitoring electrodes).

References:

[1] A. Béduer, F. Seichepine, E. Flahaut, I. Loubinoux, L. Vaysse, Ch. Vieu, Langmuir, 28, (50), (2012), 17363–17371

[2] V. Sanz, C. Tilmacîu, B. Soula, E. Flahaut, H.M. Coley, S.R.P. Silva, J. McFadden, Carbon, 49, (15), (2011), 5348-5358

[3] E. Flahaut, R. Bacsa, A. Peigney, Ch. Laurent, Chem. Commun., (2003), 1442-1443

Keywords : double ; walled carbon nanotube ; toxicity ; environmental impact ; biomedical applications

COMMUNICATION ORALE DURANT LA CONFERENCE *CHEMONTUBES*, DU 30 MARS AU 3 AVRIL 2014 (RIVA DEL GARDA, ITALIE)

Double-walled carbon nanotubes: potential impact on health and/or the environment

Emmanuel FLAHAUT[a], L. VERNEUIL[b], F. MOUCHET[b], E. PINELLI[b], L. GAUTHIER[b]

[a] CIRIMAT, Toulouse, France

[b] ECOLAB, Auzeville, France

e-mail: flahaut@chimie.ups-tlse.fr

The increase in carbon nanotubes (CNTs) production (estimated to reach 14000 tons in 2016) is driven by many applications – some of which being already on the market (paints and composites for example). In parallel, questions are also raising about their safe handling and use (mainly for workers, including researchers!), but also about their end of life in the environment. The CIRIMAT is focusing for 10 years on the CCVD synthesis of double-walled CNTs (DWNTs) [1] because they represent unique objects at the interface between single-wall CNTs (SWNTs) and larger multi-walled CNTs (MWNTs). The protection offered by the outer tube allows to modify the interface with the environment (solvent, matrix, *etc*.) while minimizing interferences with the inner one, and keeping a morphology close to that of SWNTs.

After summarizing briefly the results obtained on DWNTs about their interaction with human cells [2-4] and bacteria [5], we will focus more on the potential environmental impact on different systems (amphibians [6], algae, *etc*.) and discuss some issues of metrics for the comparison of the results, as well as the influence of sample processing and exposure protocols [7].

References

[1] E. Flahaut et al., *Chem Commun.* **2003**, *1442*; [2] L. de Gabory et al., *Rhinology*, 49, (4), (2011), 445; [3] E. Meunier et al., *Nanomedicine*, 8, (6), (2012), 987; [4] A. Béduer et al., *Langmuir*, 28, (50), (2012), 17363; [5] M. Olivi et al., *Nanoscale*, 5, (2013), 9023 [6] F. Mouchet et al., *Nanomedicine*, 5, (6), (2010), 963; [7] F. Bourdiol et al., *Carbon*, 54, (2013), 175.

COMMUNICATION ORALE DURANT LA 29EME CONFERENCE INTERNATIONALE DE LA SEGH (SOCIETY FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTERY AND HEALTH) DU 8 AU 12 JUILLET 2013 A TOULOUSE (FRANCE)

Carbon nanotubes and diatoms: a sticky story

Laurent Verneuil[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Emmanuel Flahaut[3,4], Florence Mouchet[1,2], Laury Gauthier[1,2], Eric Pinelli[1,2]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

[3] Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, 31062 Toulouse cedex 9, France

[4] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France

E-mail contact: silvestre@ensat.fr

Manufactured carbon nanotubes (CNTs) are already widely produced and increasingly used. Because of their nanoscale and structure, CNTs have a high specific surface area approaching 1000m^2/g in the case of double-walled carbon nanotubes. Several studies report on their effect on aquatic photosynthetic organisms. Among them, diatoms are ubiquitous and considered as a main primary producer in aquatic environments. They are characterized by the presence of an external siliceous structure called "frustule". Most diatoms are benthic and represent an important part of some photoautotrophic biofilms. They adhere and move on various substrates by producing extracellular polymeric substances (EPS). The great surface of CNTs and the adherence properties of benthic diatoms as well as the structure of their frustule allow strong interactions between them.

In this work, different techniques of microscopy were implemented to describe and characterize the interactions between a biofilm of freshwater diatoms and double-walled carbon nanotubes. Light microscopy was used to visualize the structure of a biofilm exposed to CNTs. These observations were performed using various staining techniques and fluorescence observations. Results show the high affinity of CNTs for biofilm areas with high density of diatoms and EPS. They also show that diatoms strongly impact the dynamics of CNTs agglomeration. Scanning electron microscopy (SEM), used to visualize interactions of CNTs with the biofilm at cellular level, confirms that CNTs strongly adhere to EPS. However, it does not provide any evidence of their direct interaction with diatoms. Moreover, SEM highlights the efficient natural protection conferred by the diatom's frustule against penetration of CNTs into diatom cells.

This work contributes to improving the understanding of CNTs interactions with biofilms of freshwater diatoms. It also presents various microscopy approaches, suitable to assess and characterize interactions between nanoparticles and benthic microorganisms in freshwater environments.

Keywords: carbon nanotubes, freshwater benthic diatoms, adherence, extracellular polymeric substances, microscopy.

POSTER PRESENTE DURANT LA 23EME RENCONTRE ANNUELLE DE LA SETAC EUROPE (*SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*) DU 12 AU 16 MAY 2013 A GASGOW (ECOSSE)

Growth comparison of freshwater diatom *Nitzschia palea* in presence of double and multi-walled carbon nanotubes with or without natural organic matter

Laurent VERNEUIL[1,2], Jérôme SILVESTRE[1,2*], Florence MOUCHET[1,2,3], Emmanuel FLAHAUT[3,4,5], Christian GANCET[3,6], Jean-Charles BOUTONNET[3,6], Laury GAUTHIER[1,2,3] and Eric PINELLI[1,2,3]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France
[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France
[3] Laboratoire Commun NAUTILE, Laboratoires EcoLab/CIRIMAT/GRL
[4] Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, 31062 Toulouse cedex 9, France
[5] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France
[6] Laboratoire d'Ecotoxicologie, Département Analyse, Groupement de Recherches de Lacq, ARKEMA France, BP 34, 64170 Lacq/France
E-mail contact: silvestre@ensat.fr

Despite increasing production and use of carbon nanotubes (CNTs), only few studies have reported their effects on primary producers at the base of the trophic chain. Diatoms are ubiquitous unicellular algae, considered as main primary producers in many aquatic food chains. They play a key role in the life cycle of many organisms. Studies dealing with the impact of emerging pollutants such as CNTs on diatoms are therefore of great importance for future evaluation of the consequences of their presence in ecosystems. In the present work, the effects of two types of CNTs, double-walled carbon nanotubes (DWNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWNTs), are investigated on a monoculture of benthic diatoms *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith. For this purpose, an experimental device was established to discriminate the CNTs toxicity and the shading effect that they cause. Moreover, this device allows direct observations of CNTs agglomeration to the diatoms biofilm. For a better assessment of ecotoxicological hazards due to CNTs, this study was also conducted in the presence or absence of natural organic matter (at a realistic concentration), used as CNTs dispersing agent. Indeed, in absence of natural organic matter, the EC_{50} values are respectively 119 mg L^{-1} for MWNTs and 44 mg L^{-1} for DWNTs. In these conditions, cell growth is not significantly affected by shading. In the presence of natural organic matter, the EC_{50} values were about 5 times lower for the DWNT and 50 times lower for MWNT. Thus, and despite the positive effect of natural organic matter on cell growth, dispersion highly increased CNTs toxicity. Dispersion also strongly increased the shading effect caused by CNTs on algal growth. Moreover, our results show an important interaction between diatom biofilm and CNTs. Furthermore, electron microscopy observations revealed high affinity of CNTs for extracellular-polymeric substances produced by diatoms. This work would highlight an increased risk of CNTs toxicity on aquatic primary producers such as diatoms in the presence of natural organic matter, as well as possible consequences on freshwater food chains.

Session: Aquatic and terrestrial plant ecology, ecotoxicology and risk assessment
Keywords: Carbon nanotubes, natural organic matter, toxicity, benthic diatoms

Growth comparison of freshwater diatom *Nitzschia palea* in presence of double and multi-walled carbon nanotubes with or without natural organic matter

Laurent VERNEUIL[1,2], J. SILVESTRE[1,2,3*], F. MOUCHET[1,2,3], E. FLAHAUT[3,4], C. GANCET[3,5], J-C. BOUTONNET[3,5], L. GAUTHIER[1,2,3] and E. PINELLI[1,2,3]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France - [2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France - [3] Laboratoire Commun NAUTILE, Laboratoires EcoLab/CIRIMAT/GRL- [4] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France
[5] Laboratoire d'Ecotoxicologie, Département Analyse, Groupement de Recherches de Lacq, ARKEMA France, BP 34, 64170 Lacq/France - *silvestre@ensat.fr

Introduction

Diatoms are ubiquitous algae inhabiting aquatic ecosystems. They are considered as main primary producers in many aquatic food chains and play a key role in the life cycle of many organisms. For several years the production and use of carbon nanotubes (CNTs) keep increasing. However their fate and toxicity in aquatic environment are currently still unclear. For that purpose we have investigated the effects of double walled CNTs (DW) and multi walled CNTs (MW) on the growth of *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith (*N. palea*) a common freshwater benthic diatom. The comparison of the effects of these two carbonaceous nanomaterials was done with or without the presence of a realistic concentration of Natural Organic Matter (NOM). Direct and shading effects were compared. The interaction between CNTs and the biofilm were investigated using stereo-microscopy as well as Scanning Electron Microscopy (SEM).

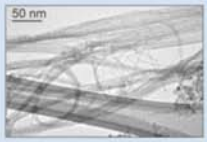


Figure 1: TEM image of double walled carbon nanotubes (DW)

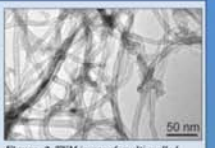
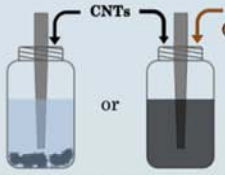


Figure 2: TEM image of multi walled carbon nanotubes (MW)

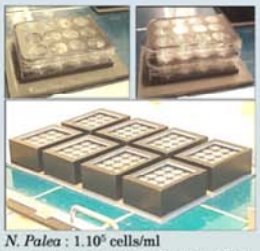
Materials & methods

CNTs suspensions

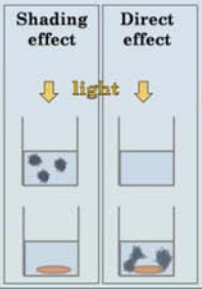


Concentrations of DW or MW: 0.1 - 1 - 10 - 50 mg.L^{-1}
With or without addition of NOM (10 mg.L^{-1}).
Dispersion with ultra-sonication tip (80 mn; 2 sec pulse, 3 sec pause; 35%)

Experimental device



N. Palea : 1.10^5 cells/ml
Growth recovery and adherence : 24h
Exposure to CNTs : 144h



Performed tests

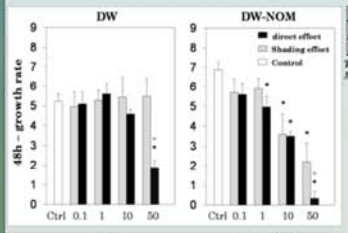
Growth:
Daily counting, viability and photosynthetic yield

Adherence:
Evaluation of CNTs covered surfaces on biofilm depending of used CNTs and the presence or not of NOM (stereo microscopy, ImageJ software)

Visualization of the interaction between CNTs and the biofilm of *N. palea* (Formaldehyde + glutaraldehyde + Alcian blue; SEM)

Results

Effect of CNTs on growth in presence or not of NOM



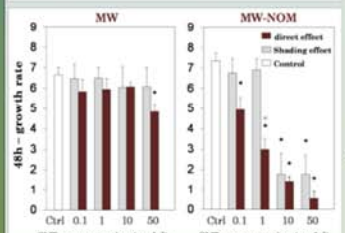


*Figure 3: growth rates after 48h of exposure to CNTs. Error bar: standard error. *: significant difference vs control. °: significant difference between direct effect and shading for the same concentration ($p < 0.01$)*

	DW	MW	DW-NOM	MW-NOM
$_{48h}EC_{50}$ (mg L^{-1})	44.25	118.82	7.49	2.83
confidence interval	[36.26/54.78]	[76.75/201.22]	[3.92/13.31]	[0.84/8.83]

Table 1 : EC_{50} after 48h of exposure to DWCNTs , MWCNTs, DW-NOM and MW-NOM

Without NOM:

- No inhibition of growth caused by shading effect
- DW cause stronger inhibition than MW for direct exposure

With NOM:

- Shading only explain a part of the inhibition of growth caused by CNTs
- Strong inhibition of growth caused by CNTs in presence of NOM despite its positive effect on growth in control cultures

No increase in mortality or decrease in photosynthetic yield were observed at any CNTs concentration in presence or not of NOM

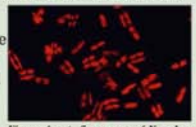
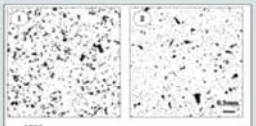


Figure 4: auto fluorescence of N. palea chloroplasts in presence of MW after 48h of exposure. Note cell divisions and chloroplasts integrity

Adherence of CNTs to the algal biofilm



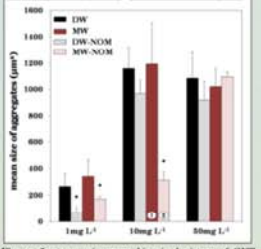


*Figure 5: stereo microscopy binarized picture of CNTs agglomerates on the biofilm of N. palea and agglomerates size depending of the CNTs concentrations in presence or absence of NOM . Error bar: standard deviation. *: significant difference vs CNTs without NOM. ($p < 0.05$)*

Stereo-microscopy:

- NOM reduces the CNTs agglomerates size on biofilm up to 1mg. L^{-1} of DW and up to 10mg. L^{-1} of MW corresponding to the highest concentration of CNTs that $NOM_{10mg \cdot L^{-1}}$ is able to suspend

Scanning Electron Microscopy:

- CNTs strongly adhere to Extracellular Polymeric Substances matrix (EPS) produced by *N. palea*
- No evidence of any direct interaction between CNTs and *N. palea* as well as of any input of CNTs into the cells

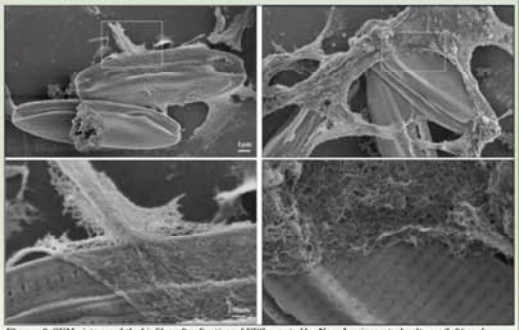


Figure 6: SEM pictures of the biofilm after fixation of EPS secreted by N. palea in control cultures (left) and after 48h of exposure with MW (10mg L^{-1}) dispersed by NOM (right)

Conclusions

- NOM highly increases shading effect and growth inhibition caused by CNTs
- Growth inhibition caused by CNTs as well as agglomeration are more linked to the presence of NOM than to the type of used CNTs
- CNTs do not induce any mortality or photosynthetic yield decrease
- CNTs strongly adhere to the EPS matrix but not directly to the cells

The effect of NOM as well as agglomeration to EPS will be considered for future evaluations of CNTs impact and fate in aquatic ecosystems

Grants: Financial support for this study was provided by the French Ministry of Higher Education and Research (PhD grant of L. Verneuil) and by the French National Research Agency (MESONNET)

POSTER PRESENTE DURANT LA RENCONTRE ANNUELLE DE LA SOCIETE D'ECOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE (SEFA) LE 3 ET 4 JUILLET 2013 A THIONVILLE (FRANCE)

Effets de nanotubes de carbones à double-parois et multi-parois sur la croissance d'un biofilm de diatomées en présence ou non de matière organique

Laurent VERNEUIL[1,2], Jérôme SILVESTRE[1,2], Florence MOUCHET[1,2,3], Emmanuel FLAHAUT[3,4,5], François LAURENT[1,2], Christian GANCET[3,6], Jean-Charles BOUTONNET[3,6], Laury GAUTHIER[1,2,3] and Eric PINELLI[1,2,3]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France
[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France
[3] Laboratoire Commun NAUTILE, Laboratoires EcoLab/CIRIMAT/GRL
[4] Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, 31062 Toulouse cedex 9, France
[5] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France
[6] Laboratoire d'Ecotoxicologie, Département Analyse, Groupement de Recherches de Lacq, ARKEMA France, BP 34, 64170 Lacq/France

Malgré une production et une utilisation grandissante des nanotubes de carbone (NTC), les études concernant leur devenir et leurs effets sur l'environnement sont encore peu nombreuses. Parmi les nombreux acteurs des écosystèmes aquatiques, les diatomées, sont responsables d'une grande part de la production primaire des milieux d'eau douce et sont essentiel à l'alimentation et au développement de nombreux organismes. Dans le présent travail les effets de deux types de nanotubes de carbone (NTC), les NTC à double paroi (DWNTC) et des NTC multi-parois (MWNTC) ont été étudiés sur une monoculture de diatomées benthiques Nitzschia palea (Kützing) W. Smith.

Pour cela, un dispositif expérimental a été développé afin d'évaluer les effets inhibiteurs des nanotubes de carbone permettant de dissocier les effets directs de ceux liés à l'ombrage. Ce dispositif a également permis des observations in-situ de l'agglomération des NTC au biofilm algal. Pour tenter d'évaluer les risques écotoxiques liés aux NTC cette étude a été menée en présence ou en absence d'une concentration réaliste de matière organique. En l'absence de matière organique, les valeurs d'EC_{50} sont respectivement de 119 mg L^{-1} pour MWNTC et 44 mg L^{-1} pour DWNTC. Dans ces conditions, la croissance de la population n'a pas été significativement affectée par l'ombrage. En revanche, en présence de matière organique, les valeurs d'EC_{50} étaient environ 5 fois plus faibles pour le DWNTC et 50 fois plus faibles pour les MWNTC. De plus, un fort effet de l'ombrage a été observé celui-ci lié au fort pouvoir dispersant de la MO sur les NTC. Ainsi, la dispersion a fortement augmenté l'inhibition de croissance induite par les NTC. Cette dispersion a également augmenté l'effet d'ombrage causé par NTC sur la croissance des diatomées. Nos résultats ont également monté une forte interaction entre le biofilm formé par les diatomées et les NTC. Plus précisément, la microscopie électronique à balayage a révélé une forte affinité des nanotubes de carbone pour les exo-polysaccharides produits par les diatomées. En revanche ces observations ne révèlent aucune interaction directe entre les NTCet les cellules.

Ce travail met en évidence un risque accru d'effet des nanotubes de carbone sur les producteurs primaires aquatiques tel que les diatomées en présence de matière organique naturelle. Il laisse également présager des conséquences possibles sur les chaînes alimentaires d'eau douce.

Effets de nanotubes de carbone à double-parois et multi-parois sur la croissance d'un biofilm de diatomées en présence ou non de matière organique

Laurent VERNEUIL[1,2], Jérôme SILVESTRE[1,2*], Florence MOUCHET[1,2,3], Emmanuel FLAHAUT[3,4,5], François LAURENT[1,2,7], Christian GANCET[3,6], Jean-Charles BOUTONNET[3,6], Laury GAUTHIER[1,2,3] & Eric PINELLI[1,2,3]

1 UPS Toulouse, INP ; EcoLab, UMR 5245 ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan ; 2 CNRS ; EcoLab, UMR 5245 ; 31326 Castanet-Tolosan ; 3 Laboratoire Commun NAUTILE, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan ; 4 UPS Toulouse, INP, Institut Carnot CIRIMAT, UMR CNRS 5085, 31062 Toulouse cedex 9 ; 5 CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, 31062 Toulouse ; 6 ARKEMA France, BP 34, 64170 Lacq ; 7 INRA, Ecolab, UMR 5245, 180, ch. De Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse *silvestre@ensat.fr

Introduction

- Production exponentielle de nanotubes de carbone (NTC).
- Toxicité et devenir environnemental ?

Objectifs:

➡ Evaluer les effets directs (contact) et indirects (ombrage) de NTC sur la croissance d'une espèce de diatomées dulçaquicole

➡ Evaluer l'effet de NTC dispersés en présence de matière organique (MO)

- Deux types de NTC : Double-paroi (DW) et multi-parois (MW)
- 1 espèce de diatomées : *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith (*N. palea*) (Figure 1),
- MO de la rivière Swannee (USA) à une concentration réaliste (10mg.L^{-1})

Evaluer les effets potentiels des NTC dans l'environnement

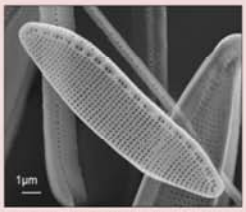


Figure 1 : Image en MEB de la paroi siliceuse (frustule) de N. palea

Matériel et méthodes

Suspension de NTC



Figure 2 : Image en MET de nanotubes de carbone. (gauche) double-paroi (DW) ; (droite) multi-paroi (MW)

DW : 80% (15% mono-paroi et 5% multi-parois) Ø 1 à 3 nm Surface spécifique : 985m^2/g

MW : 5 à 15 parois Ø quelques nm à 20nm Surface spécifique : 270m^2/g

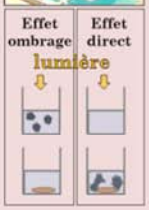
NTC : 0.1 - 1 - 10 - 50 mg.L^{-1}

Avec ou sans MO (10 mg.L^{-1})

Dispersion par ultra-sonication (80 mn; 5 sec pulsation, 3 sec pause; 35%)

Dispositif expérimental





N. Palea : 1.10^5 cells/ml

24h d'adhérence et de reprise de croissance

Exposition : 144h

➡ Viabilité (Sytox green®)

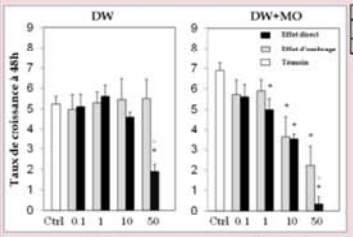
➡ Numérations journalières

➡ Mesures du potentiel photosynthétique (Phyto-PAM)

➡ Microscope à balayage (MEB) : Visualisation de l'interaction entre NTC et le biofilm de *N. palea*

Résultats et discussion

Effets des NTC sur la croissance en présence ou non de MO



	DW	MW	DW+MO	MW+MO
$_{48h}IC_{50}$ (mg L^{-1})	44,25	118,82	7,49	2,83
Interval de confiance	[36,26/54,78]	[78,75/201,23]	[3,92/13,31]	[0,84/8,82]

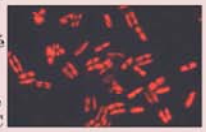
Table 1 : IC_{50} après 48h d'exposition aux DW, MW, DW+MO et MW+MO

NTC seuls:

- Pas d'inhibition de croissance due à l'ombrage
- Inhibition de croissance plus importante en présence de DW vs MW

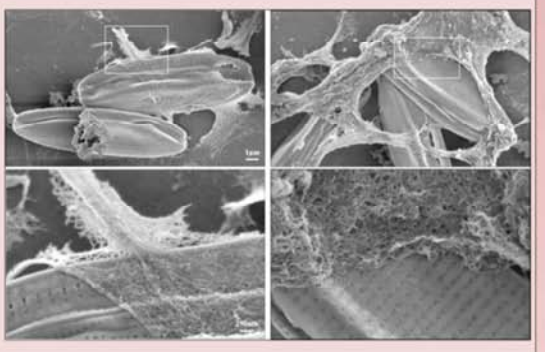
NTC avec MO:

- L'ombrage n'explique qu'une partie de l'inhibition de croissance observée
- Inhibition de croissance fortement majorée en présence de MO malgré son effet positif sur la croissance dans les cultures contrôles
- Pas de mortalité ou de diminution du potentiel photosynthétique causé par les NTC



Adhérence des NTC au biofilm de diatomées

- Forte adhérence des NTC à la matrice de substances extracellulaires polymériques (EPS) produite par les diatomées
- Pas d'interaction directe entre les NTC et les cellules ni de preuves d'entrée des NTC dans les cellules



➡ Inhibition de croissance en présence de NTC est plus en lien avec la présence de MO qu'avec le type de NTC utilisé

➡ Absence de mortalité et aucune diminution du potentiel photosynthétique, en présence de NTC

➡ Forte adhérence des NTC aux EPS sécrétés par les diatomées mais pas directement aux cellules

Le rôle de la MO sur les effets des NTC ainsi que leur forte affinité pour les EPS devront être pris en compte dans l'évaluation des effets et du devenir des NTC dans les écosystèmes aquatiques

Financements : Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Bourse de thèse de L. Verneuil)
Agence Nationale pour la Recherche (MESONNET)

POSTER PRESENTE DURANT LA 29EME CONFERENCE INTERNATIONALE DE LA SEGH (SOCIETY FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTERY AND HEALTH) DU 8 AU 12 JUILLET 2013 A TOULOUSE (FRANCE)

Assessment of cerium dioxide nanoparticles toxicity on four aquatic species at different trophic levels

Agathe Bour[1,2], Florence Mouchet[1,2], Laurent Verneuil [1,2], Lauris Evariste [1,2], Annie Perrault[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Eric Pinelli[1,2] and Laury Gauthier[1,2,*]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

*Email contact : laury.gauthier@univ-tlse3.fr

Cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) are being more and more used in the industry due to their unique properties, especially as diesel fuel additive or constituent of catalytic converters. This increasing use is expected to result in environmental release, and consequently there is an important need for their toxicity assessment. Our study aims at evaluating the potential harmful effects of raw CeO_2 NPs and citrate-coated CeO_2 NPs (Nanobyk®) on four aquatic species at different trophic levels. For this purpose we used diatoms (*Nitzschia palea*) as primary producers, chironomid (*Chironomus riparius*) and amphibian larvae as primary consumers (*Xenopus laevis*) and as secondary consumer (*Pleurodeles waltl.*). The evaluation of CeO_2 NPs acute toxicity (mortality at 48 or 96h, depending on the species) was realized on all species, from 0.1 up to 100 mg/L of NPs. Growth, development, time and rate of emergence, sex ratio and reproduction were also assessed as chronic endpoints for chironomids exposed between 0.01 and 1 mg/L of NPs. Genotoxic effects on amphibian larvae were evaluated at concentrations ranging from 0.1 to 10mg/L. The results reveal that no toxicity occurs on any of the four species during short time exposure, while adverse effects were observed on amphibian larvae from 1mg/L after 12 days of exposure. This approach constitutes a first step in the design of a new trophic chain for the investigation of nanoparticles impact in the environment.

Assessment of Cerium Dioxide Nanoparticles Toxicity on Four Aquatic Species at Different Trophic Levels

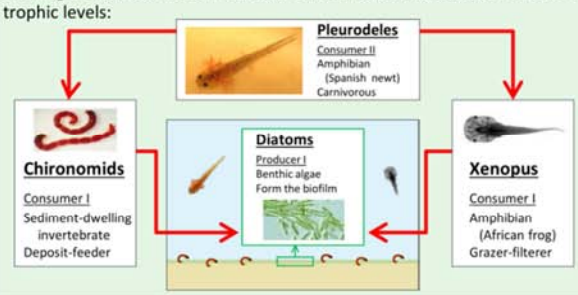
Agathe Bour[1,2], Florence Mouchet[1,2], Laurent Verneuil [1,2], Lauris Evariste [1,2], Jean-Marc Bonzom[3], Annie Perrault[1,2], Jérôme Silvestre[1,2], Eric Pinelli[1,2] and Laury Gauthier[1,2,*]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France; [3]Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), DEI/SECRE/LRE, Cadarache 186, BP 3, F-13115 Cedex, Saint Paul Lez Durance, France; *Corresponding author: laury.gauthier@univ-tlse3.fr

INTRODUCTION

The increasing production and use (wood coating, catalysis, fuel cells...) of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) are expected to result in environmental release, and consequently there is an important need for their toxicity assessment.

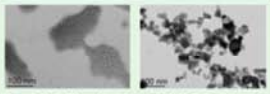
Our study aims at evaluating the potential harmful effects of two kinds of CeO_2 NPs (Umicore and Nanobyk) on four aquatic species, at different trophic levels:



MATERIAL & METHODS

CeO_2 nanoparticles:

- 2 – 5 nm citrate-coated spheres (Nanobyk®)
- 20 – 60 nm non coated plates (Umicore)



Nanobyk (left) and Umicore (right) CeO_2 NPs (TEM x50000)

Test organisms and toxicity assessment:

	Mode of exposure	Time of exposure	Concentrations tested	Endpoints
Nitzschia palea	Static (culture medium: CHU #10)	48h (acute toxicity)	0.1 – 100 mg/L	growth inhibition (GI)
Chironomus riparius	Static (from NF T90-339-1, no sediment)	48h (acute toxicity)	1 – 100 mg/L	mortality
	Static (NF T90-339-1, 2004)	7d (chronic toxicity)	0.01 – 1 mg/L	mortality, growth, development, teratogenicity
Xenopus laevis and *Pleurodeles waltl.*	Static (*X. laevis* only)	96h (acute toxicity)	0.1 – 100 mg/L	mortality
	Semi-static (NF T90-325, 2000 and ISO 21427-1, 2006)	12d (chronic toxicity and genotoxicity)	0.1 – 10 mg/L	mortality, growth inhibition (GI), genotoxicity (micronuclei induction in erythrocytes)

RESULTS

	N. palea	*C. riparius*	*X. laevis*	*P. waltl.*
Nanobyk CeO_2	No GI	No mortality	No mortality (96h and 12d)	No mortality
Umicore CeO_2	No GI	No mortality	No mortality (96h) 35% mortality (12d, 10 mg/L)	No mortality

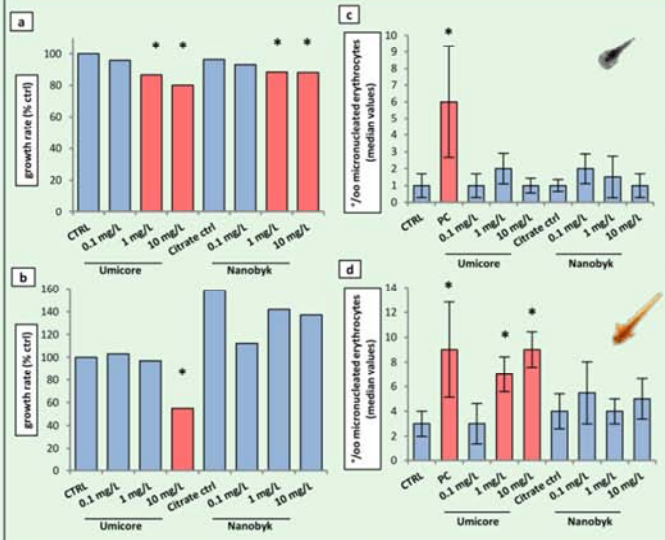


Fig. 1: growth rate (a,b) and genotoxicity (c,d) of amphibian larvae (a,c: xenopus, b,d: pleurodeles). CTRL: control, PC: positive control, */■ significantly different from control



Left: Xenopus larvae gut. The arrows show NPs aggregates after 96h exposure at 1 mg/L. Right: Chironomid larvae reworking NPs aggregates.

- Solid matrix of Umicore CeO_2 NPs that chironomid larvae reworked.
- Important NPs ingestion observed for both xenopus and chironomid larvae.
- Growth impairment in amphibians, with differences of sensitivity depending on the species and the NP.
- Dose-dependent genotoxic effects in newt larvae exposed to Umicore NPs, but no genotoxicity on xenopus tadpoles, with any NP.

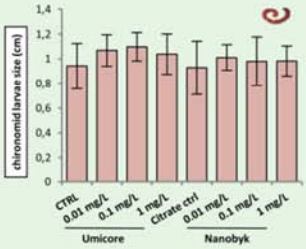


Fig. 3: chironomid larvae growth after 7 days exposure to NPs

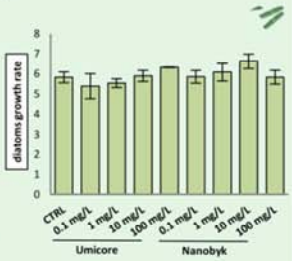


Fig. 2: diatoms growth rate at 48h

- No toxicity in diatoms
- No toxicity in chironomids despite important ingestion of NPs. No teratogenicity, growth or development impairment observed.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

- **No acute toxicity** of CeO_2 NPs except for xenopus tadpoles exposed to Umicore NPs at the highest concentration (10 mg/L).
- Only the amphibian larvae showed sub-lethal effects (growth inhibition, genotoxicity), with different sensitivity depending on the species and on the NP.
- Although CeO_2 NPs were non-toxic to the diatoms or the chironomids, **the important ingestion by the larvae or accumulation onto/into the biofilm could have consequences at higher trophic levels**. Indeed, despite no acute toxicity observed on pleurodeles, this secondary consumer showed growth impairment and genetoxicity at high concentrations of NPs. The ingestion of "contaminated" chironomids or xenopus larvae could lead to measurable toxicity to the pleurodeles by trophic transfer.
- **These results highlight the importance of studying the effects of CeO_2 NPs on trophic chain, which is the following part of our study.**

POSTER PRESENTE DURANT LA 24EME RENCONTRE ANNUELLE DE LA SETAC EUROPE (*SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*) DU 11 AU 15 MAI 2014 A BASEL (SUISSE)

Impact of cerium dioxide nanoparticles on a reconstructed aquatic ecosystem: a mesocosm study.

Agathe BOUR[1,2], Florence MOUCHET[1,2*], Laurent VERNEUIL[1,2], Annie PERRAULT[1,2], Jérôme SILVESTRE[1,2], Laury GAUTHIER[1,2] and Eric PINELLI[1,2]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[2]CNRS ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

*Email contact : florence.mouchet@orange.fr

The growing interest in cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) for industrial purposes (catalysis, coatings, solar cells, cosmetics…) has led to important volumes of production in the last few years. Environmental release is then expected, but NPs toxicity remains not well known. Ecotoxicological studies on CeO_2 NPs are emerging but are still too few to provide an overview on these particles environmental impact. Furthermore, the complexity of environmental conditions is not taken into account in standard studies, leading to a poor representativeness of NPs toxicity in natural conditions. The aim of the present study is to assess the toxicity of CeO_2 NPs on a simplified aquatic ecosystem using low NPs concentrations, as expected in natural aquatic environments, to provide a better understanding of their toxicity mechanisms. For this purpose, mesocosms comprising a complex primary compartment (bacteria, fungi and algae), and primary (dipteran larvae *Chironomus riparius*) and secondary (amphibian larvae *Pleurodeles waltl.*) consumers were used. This system allows the establishment of trophic relations and simultaneous exposure of the different species, coupled with continuous monitoring of physico-chemical parameters. Mesocosms' contamination consisted in a regular introduction of CeO_2 NPs for four weeks, to get to the final concentration of 1 mg/L of NPs. Toxicity on primary compartment was assessed as bacterial community diversity. Surviving chironomid larvae were counted at the end of the experiment, and growth inhibition was assessed as chronic toxicity endpoint. Mortality, growth inhibition and genotoxicity were assessed on amphibian larvae. No toxicity was observed either on primary compartment or on chironomids, but amphibian larvae were importantly impacted. Indeed, significant genotoxicity, growth inhibition and mortality were observed. Complementary experiments were also realized in order to determine possible mechanisms of toxicity on amphibian larvae. This work has been carried out within the ANR-P2N MESONNET project.

Keywords : nanoparticles mesocosms toxicity

Impact of Cerium Dioxide Nanoparticles on a Reconstructed Aquatic Ecosystem: a Mesocosm Study

Agathe Bour[1,2,3], Florence Mouchet[1,2,3,*], Laurent Verneuil[1,2,3], Annie Perrault[1,2,3], Jérôme Silvestre[1,2,3], Laury Gauthier[1,2,3] & Eric Pinelli[1,2,3]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France. [2]CNRS ; EcoLab UMR 5245; F-31326 Castanet-Tolosan. [3]International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology (iCEINT). *Corresponding author: florence.mouchet@orange.fr

INTRODUCTION

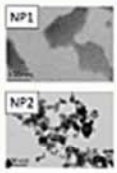
Environmental release of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) is expected due to their increasing production and use (wood coating, catalysis, fuel cells). There is thus an important need for CeO_2 NPs toxicity assessment in the environment.

This study aims at (i) evaluating the potential harmful effects of two types of CeO_2 NPs in mesocosm conditions, while integrating the ecosystem complex relations and (ii) bringing the first elements to understand the observed responses.

MATERIALS AND METHODS

1 - CeO_2 NPs:

- 2 – 5 nm citrate-coated spheres (NP1)
- 20 – 60 nm uncoated plates (NP2)



2 - Mesocosms set up:

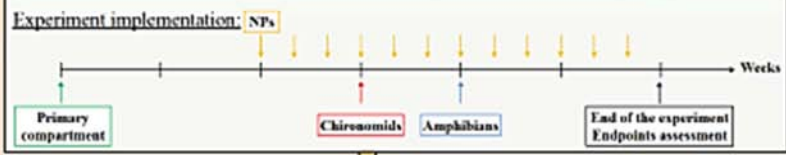


- 9 individual lab mesocosms (60 L; 75 x 20 x 60 cm)
- Reconstituted sediment and mineral water
- Control of physico-chemical parameters
- NP chronic intake (4 weeks), final concentration of 1 mg/L
- Sequential introduction of biological models

	Species	Studied endpoints
Primary compartment	Bacterial community Diatoms Fungi Alder leaves	
Primary consumers	700 chironomid larvae (*Chironomus riparius*)	Teratogenesis, growth and development
Secondary consumers	15 amphibian larvae (*Pleurodeles waltl.*)	Mortality, growth, genotoxicity (micronuclei induction)[2]



Experiment implementation:



3 - Complementary experiments: monospecific exposures of *P. waltl.* following standardized procedures[2]

➢ One procedure: 12-days semi-static exposure
Positive Control (PC): cyclophosphamide, 2 mg/L.

Assessment of **mortality**, **growth inhibition** (body size) and **genotoxicity** (number of micronucleated erythrocytes (MNE ‰) in circulating blood).

➢ Direct effects of NPs ?
Exposure to NP1 and NP2 (0.1 – 10 mg/L)

➢ Role of ionic cerium / oxidation state of cerium ?
Exposure to $CeCl_3$ (Ce^{III}) and $Ce(SO_4)_2$ (Ce^{IV}) (0.01 – 0.1 – 1 mg/L)



RESULTS

	C. riparius	*P. waltl.*
NP1	No toxicity	No mortality No growth inhibition Genotoxicity
NP2	No toxicity	Mortality (up to 65 %) Growth inhibition Genotoxicity

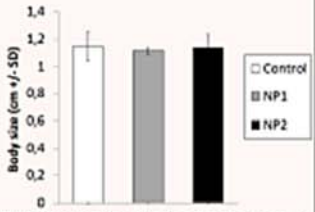
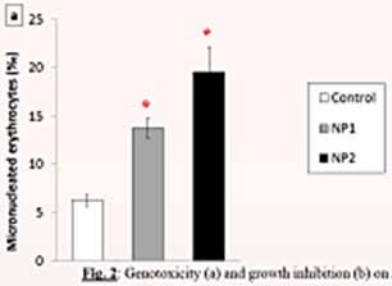


Fig. 1: Chironomid growth after mesocosm exposure.
* significantly different from control ($p < 0.05$).



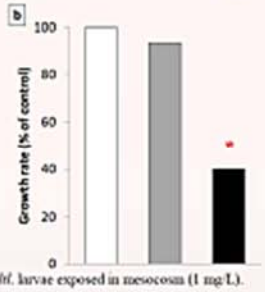


Fig. 2: Genotoxicity (a) and growth inhibition (b) on *P. waltl.* larvae exposed in mesocosm (1 mg/L).
* significantly different from control ($p < 0.05$).

NP1	NP2
No mortality	No mortality
No growth inhibition	Growth inhibition (10mg/L)
No gentoxicity	Genotoxicity

$CeCl_3$	$Ce(SO_4)_2$
No mortality	No mortality
No growth inhibition	No growth inhibition
No gentoxicity	No genotoxicity

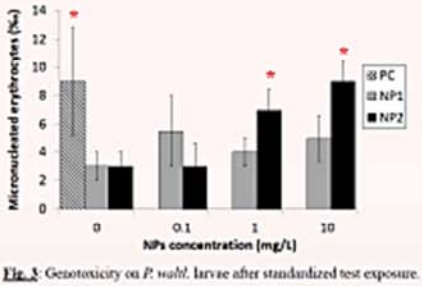


Fig. 3: Genotoxicity on *P. waltl.* larvae after standardized test exposure.
PC: positive control; * significantly different from control ($p < 0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

- **No toxicity** of CeO_2 NPs on **primary consumers.**
- Both NP1 and NP2 are **genotoxic** to *P. waltl.*. NP2 only induces **chronic** (growth inhibition) and **acute** (mortality) toxicities.
- **Toxicity of CeO_2 NPs** (NP2 only) **is increased in mesocosm conditions**, *versus* single-species exposure.
- **Ionic forms of cerium are not involved in toxicity on *P. waltl.*.**

[1]Gallien, L., Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii Michah*. Bull. Biol. Fr. Belg. 91: 97-114
[2]ISO 2006 International Standard. Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-2006

TOXICITE ENVIRONNEMENTALE ET ECOTOXICITE DE NANOTUBES DE CARBONE CHEZ DES DIATOMEES BENTHIQUES: DE LA CELLULE AU BIOFILM

RESUME :

Différents effets de nanotubes de carbone (NTC) sur des diatomées benthiques ont été évalués via des approches microscopiques et biochimiques. Il a été montré que la structure du frustule, paroi silicifiée propre aux diatomées, est déterminante sur l'entrée ou non des NTC dans les cellules. Une internalisation des NTC dans la cellule a conduit à des effets génotoxiques et tératogènes. L'interaction des NTC avec les substances polymériques extracellulaires (SPE) produites par les diatomées a aussi été évaluée. Les SPE ont favorisé l'agglomération des NTC entre eux, ainsi que leur isolement physico-chimique vis-à-vis des diatomées. Une réponse des diatomées à la présence des NTC par la surproduction de SPE explique partiellement le retard de croissance observé. De plus, Des interactions entre SPE et NTC, majoritairement hydrophobes, ont été révélées. Ces interactions ont permis de réduire considérablement les effets des NTC sur les diatomées au cours du temps.

Mots clés : Nanotubes de carbone double-paroi, Nanotubes de carbone multi-parois, Matière organique naturelle, Substances polymériques extracellulaires, Biofilms, Génotoxicité, Tératogénicité, Ecotoxicologie, Toxicologie environnementale, Microscopie.

ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND ECOTOXICOLOGY OF CARBON NANOTUBES ON BENTHIC DIATOMS: FROM CELL TO BIOFILM

ABSTRACT:

Various effects of carbon nanotubes (CNTs) on benthic diatoms were assessed via microscopic and biochemical approaches. It has been shown that the structure of the specific to diatoms silicified frustule has a key role in the entry or not of CNTs into the cells. Moreover, Internalization of CNTs in the cell led to genotoxic and teratogenic effects. The interaction of the CNTs with the extracellular polymeric substances (EPS) produced by diatoms was also evaluated. EPS favored agglomeration of CNTs between them as well as their physico-chemical isolation for diatoms. A response of diatoms in the presence of CNTs by the overproduction of EPS partially explains the observed growth retardation. In addition, interactions between the EPS and CNTs, predominantly hydrophobic, have been revealed. These interactions significantly reduced the effects of CNTs in diatoms over time.

Key words: Double wall carbon nanotubes, Multi-walled carbon nanotubes, Natural organic matter, Extracellular polymeric substances, Biofilms, Genotoxicity, Teratogenicity, Ecotoxicology, environmental toxicology, microscopy.