

Université Lille 2
Droit et Santé



UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Thèse pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
Spécialité : Sciences biologiques

Présentée et soutenue publiquement par
LUDIVINE CANIVET
le 13 décembre 2013

Caractérisation et toxicité de nanoparticules manufacturées de fer chez *Physcomitrella patens* (Hedw. Bruch & Schimp.) et sur cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC) : vers une utilisation en biosurveillance d'aérocontaminants nanoparticulaires

Membres du jury

Rapporteurs :

Mme le Professeur Catherine MOUNEYRAC Université Catholique de l'Ouest, Angers
Mme le Professeur Paule VASSEUR Université Paul Verlaine, Metz

Examineurs :

M. le Professeur Régis COURTECUISSÉ Université Lille 2 (Directeur de thèse)
M. le Docteur Franck- Olivier DENAYER Université Lille 2 (Co-directeur de thèse)
Mme le Docteur Laurence GALSOMIES ADEME
M. le Docteur Jean-Marc LO-GUIDICE Inserm

Invité :

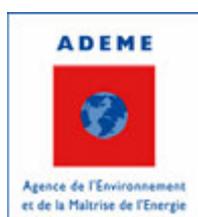
M. le Docteur Fabrice NESSLANY Institut Pasteur de Lille

A stéphane,
A mes parents

Remerciements

L'incroyable histoire de la thèse se termine... déjà. Ces trois années de recherche auront été pour moi une fabuleuse aventure tant sur le plan scientifique qu'humain. Elles m'ont permis de confirmer ma passion pour la Recherche et de collaborer avec beaucoup de personnes, chacun apportant sa pierre à l'édifice. Je vais ainsi tenter de remercier toute les personnes sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est.

Je remercie tout d'abord mes financeurs sans qui cette thèse n'aurait pas pu se faire.



EA 4483 : IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine

Je tiens à remercier le Pr. Alain Durocher de m'avoir fait confiance pour co-financer cette thèse sur les fonds propres de l'ILIS et de m'avoir accueillie au sein de son équipe d'enseignants.

Aux membres du jury et aux personnes qui m'ont encadrée

Je remercie les Professeurs Paule Vasseur et Catherine Mouneyrac d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à sa lecture et d'y avoir porté un regard d'expert.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont suivie et conseillée au cours de ces trois années en participant notamment à mon comité de suivi de thèse. Merci à Mélanie Auffan, Nadine Bernard, Laurence Galsomiès et Hervé Hubert. Mes sincères remerciements vont également à mes directeurs de thèse, Régis Courtecuisse et Franck-Olivier Denayer, mais aussi aux personnes qui m'ont encadrée et fait découvrir de nouveaux domaines, Jean-Marc Lo Guidice, Fabrice Nessler et Pierre Dubot.

M. Courtecuisse, merci d'avoir accepté d'être directeur de thèse et de m'avoir apporté votre soutien et un œil extérieur à mes travaux de recherche.

M. Denayer, que dire après toutes ces années !!! Merci de m'avoir suivie, fait confiance depuis toutes ces années et d'avoir cru en mes capacités. Dès le premier jour, vous m'avez fait partager et transmis votre passion pour la recherche. Malgré votre

charge de travail, vous avez toujours été là, à l'écoute. Merci pour votre rigueur scientifique, de m'avoir permis dans certains cas de prendre du recul mais aussi pour m'avoir remise de nombreuses fois dans le droit chemin, pour vos encouragements qui m'ont redonné force et confiance lorsque le moral n'y était plus. Un ENORME MERCI !!!

Jean-Marc, grâce à votre confiance et votre soutien, j'ai osé me lancer dans un nouveau domaine qu'est la toxicologie et les techniques de génomique. Merci d'avoir accueilli et intégré une adepte des « plantes » au sein de votre équipe et pour vos encouragements. Avec vos conseils la culture de cellules humaines et les techniques de RT-qPCR n'ont « presque » plus de secret pour moi. Je vous exprime toute ma reconnaissance.

M. Nesslany, je tenais particulièrement à vous exprimer toute ma gratitude pour votre soutien et vos conseils tout au long de cette thèse. Malgré votre charge de travail vous avez toujours répondu présent à mes demandes et m'avez ouvert les portes de l'Institut Pasteur de Lille me permettant de développer mes compétences en génotoxicité mais surtout de m'avoir fait découvrir le monde des nanoparticules et leur complexité.

Pierre, c'est grâce à toi que j'ai fait mes premiers pas sur la caractérisation des nanoparticules. Tu as aussi permis à une « biologiste » de rentrer dans le monde de la physico-chimie. Grâce à mes différents séjours sur Thiais, à tes précieux conseils et tes compétences pédagogiques, l'XPS n'a plus de secret pour moi (enfin presque).

A l'EA4483 Impact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine

Au Groupe Biosurveillance Environnementale (Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques)

Vous avez tous participé à la réalisation de cette thèse mais vous m'avez aussi permis de découvrir le domaine de l'écotoxicologie et de l'environnement et de faire naître en moi ma passion pour la recherche, me permettant de m'épanouir scientifiquement et personnellement. C'est à l'ensemble de cette équipe, chaleureuse et dynamique, que j'adresse mes remerciements pour m'avoir intégrée et donnée la motivation et l'énergie nécessaire pour mener à bien cette thèse.

Je tiens à remercier Damien Cuny de m'avoir accepté au sein de son équipe ainsi que pour ces conseils.

Merci à vous, Inès, pour votre réactivité à toutes mes demandes diverses et variées, vos conseils et votre patience.

Merci à vous, Sylvain, pour vos conseils avisés en toxicogénomique mais aussi pour la réalisation du dosage de la 8-OHdG. Grâce à vous, j'ai pu enrichir ma thèse d'une partie supplémentaire sur l'intégrité des ARN de *Physcomitrella patens*. Enfin, un grand merci pour vos conseils et vos corrections suite à la lecture de ce manuscrit.

Mes vifs remerciements vont également à Annabelle Deram, Audrey Hayet et Caroline Lanier pour leurs précieux conseils, leur bonne humeur et leur aide pour la récolte de mes échantillons et la préparation de toujours plus de gélose pour mes cultures de mousses. Je vous remercie aussi pour ces discussions plus diverses et variées et j'espère avoir l'occasion de déguster autre chose qu'un jus d'abricot dans un estaminet.

Merci aussi à Fabien, Florent dit « Junior » ou « petit oiseau » (pour les intimes) et Julie pour leur gentillesse et bonne humeur lors de ma venue au laboratoire.

Merci à mon stagiaire, Florent, pour son aide en fin de thèse. J'espère t'avoir donné envie de continuer dans cette voie.

Au Groupe Variabilité des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathogénicité des xénobiotiques (ancienne salle 31)

Je tiens à remercier l'équipe de Jean-Marc de m'avoir accueillie mais surtout intégrée au sein de leur équipe.

Un merci tout particulier à toi, Mélanie pour ta gentillesse, ton sourire et ta bonne humeur. Merci d'avoir toujours répondu présente pour passer mes commandes toujours pour hier mais avec le sourire. Merci pour tes illustrations qui ont donné une autre valeur à mon manuscrit et à ma présentation. Et merci beaucoup de ton aide pour les dernières et futures manips que ma situation m'empêche de faire.

M. Garçon, merci pour vos précieux conseils et de m'avoir montré les subtilités de l'HPLC pour le dosage du glutathion et du MDA. Merci aussi pour vos précieuses remarques sur l'article concernant les effets des nanoparticules sur les cellules pulmonaires.

Bérénice, merci pour ton aide, pour mes colorations d'immunofluorescence m'ayant permis de caractériser mon modèle cellulaire humain, mais merci surtout pour ta bonne humeur.

Quentin, merci à toi pour ton aide précieuse dans la réalisation de plusieurs manips mais aussi pour avoir réuni l'équipe autour de quizz musicaux qui ont été des moments de détente appréciables.

Merci à Christelle, Grégoire, Delphine, Alaa, Cynthia, Ingrid, Edmone, Sébastien, Benjamin, Anne, Nicolas, Marie-Flore, Stéphanie et sans oublier « M. Klein » pour leur accueil et leur gentillesse.

Un merci tout particulier à Marie-Claudine pour son aide, sa gentillesse et ses conseils lors de l'utilisation de l'HPLC.

Merci aussi à Thibaut pour son aide lors des changements des milieux de culture.

Une pensée pour Camille avec qui j'ai partagée l'HPLC pour les dosages de MDA et du glutathion.

A l'institut Pasteur de Lille

Je tiens à remercier toute l'équipe de Fabrice Nesslany de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Toxicologie génétique.

Un merci tout particulier à Smail Talahari pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa gentillesse sans qui le Test Comète chez *Physcomitrella patens* ne serait ce qu'il est. J'espère que notre collaboration pourra se poursuivre afin de finaliser ce test.

Anne, merci pour tes conseils et rendez-vous sur la ligne de départ du marathon Lille-Lens l'année prochaine.

Une pensée pour Hélène qui sera la prochaine à passer cette épreuve très motivante de la soutenance.

Au Laboratoire MCMC de Thiais

Je tiens à remercier Yannick Champion pour m'avoir ouvert les portes du MCMC et de m'avoir fait rencontrer Pierre Dubot. Je vous remercie également d'avoir mis à ma disposition vos précieuses nanoparticules de fer.

Merci à Pierre Cenedese pour sa bonne humeur et sa gentillesse lors de mes séjours sur Thiais.

Merci à l'ensemble des personnes du MCMC de Thiais pour leur accueil.

A l'École des Mines de Douai

Je tiens à remercier Laurent Alleman et Espérenza Perdrix pour m'avoir ouvert les portes de l'École des Mines de Douai ainsi que de m'avoir donné la possibilité de récolter des particules ultra-fines sur Dunkerque.

Merci à Saliou pour son aide pour la pesée des filtres des particules ultra-fines.

Merci aussi à Guilain Louis et Damien pour m'avoir permis d'observer et de caractériser mes nanoparticules de fer à la surface des feuilles de *Physcomitrella patens* grâce à leur MEB-EDX.

A mes différentes rencontres et collaborations au sein de l'Université de Lille 2

Merci à M. Didier Betbeder pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et donner accès à son zetasizer.

Merci à Rodolphe pour ses précieux conseils, notamment dans l'utilisation du zetasizer et l'interprétation des résultats.

Merci à Anne Loyens et plus particulièrement à Cécile Allet pour son aide et sa détermination dans le développement de la méthode de préparation des échantillons de bryophytes pour des observations en MET.

Merci à Meryem Tardivel pour son aide précieuse pour l'utilisation de la microscopie confocale et la vérification de la pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules de *Physcomitrella patens*.

Merci à M. Broly de m'avoir ouvert les portes du CBP et de m'avoir fait rencontrer Christophe Hallaert.

Merci à Christophe Hallaert pour sa disponibilité et ses conseils dans le développement de la méthode d'extraction d'ADN chez *Physcomitrella patens*.

A la Faculté d'Ingénierie et Management de la Santé (ILIS)

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel administratif, enseignant ainsi que technique de l'ILIS pour leur accueil, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Régina, merci pour votre gentillesse et promis je vais tenter de ne plus venir envahir votre bureau particulièrement le vendredi soir.

Suzanna, merci pour vos précieux conseils et la relecture de mes articles en anglais.

Merci à toi Ben pour ton aide précieuse lors de mes analyses statistiques.

Sylvaine, merci pour avoir toujours répondu à mes questions et pour votre gentillesse.

Ambrosine, merci pour votre sourire et votre joie de vivre.

Merci à Najim et Damien pour leur aide lors de mes pannes informatiques.

Merci à l'ensemble des personnes de la scolarité, Perrine, Julie, Aline, Sylvie, Mylène, Nora, Sophie, Laïla sans qui la programmation des cours ne pourrait se faire.

Merci à l'ensemble du personnel technique Jean, Hynd, Marion, Caroline, Kelly, Linda et Mme Schneider, Mme Robache, Mme Langlet, Mme Szmalec, Mme Leroux, Mme Chabert pour leur gentillesse.

A HIFI COM

Un merci tout particulier à Pierre Louis et Steve, à qui je dois ma magnifique présentation de soutenance. Merci à vous deux pour votre bonne humeur et nos discussions du midi.

Pierre Louis tu risques de m'avoir encore sur le dos car tu m'as donné le goût pour les examens numériques soit disant complexes. Je tenterais donc d'innover sans cesse. La « peau de vache » n'a pas fini de te surprendre.

A mes amis, à ma famille

Je ne peux pas écrire ces remerciements sans penser aux membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenue voire même supportée tout au long de ces trois années de thèse. Je profite donc de cette occasion et de son caractère solennel pour les remercier. Vous avez toujours été présents même dans les moments les plus difficiles et j'espère que mon emploi du temps continuera de vous faire rire car ce n'est pas près de se calmer.

A mes amis

Merci à Delphine, Julien, Andrew et leur petit ange Kim. Mon amie de toujours, mon ami d'enfance. Merci de ton aide et de ton soutien. Tu m'as montré que la vie l'emporte toujours malgré les difficultés rencontrées.

Merci à Ludovic, Ingrid, Léo et Leelo pour leur soutien. « Ca y Léo, Tata a fini l'école !!! »

Un grand merci à toi, Coach, tu m'as permis de tenir physiquement mais aussi moralement pendant 3 ans, tu m'as montré que l'on peut tout faire, seuls le mental et la volonté comptent. Prochain défi : la Route du Louvre. Je ne lâche pas !!!!! Je suis fier d'avoir progressé à tes côtés et j'espère bien continuer. Ma devise : « *Spiritus sano in corpore sano* ». Une pensée aussi pour Anthony, avec qui j'ai pris plaisir à courir et à travailler.

Merci à Kinkin, Anne-So et Cloé et Zoé pour votre soutien. Et merci à toi Kinkin d'avoir fait de ma voiture une voiture mythique reconnue par tous à l'ILIS.

Merci à Laurence pour son soutien au cours de ces différentes années.

A ma famille

Tout d'abord, je souhaite dédier cette thèse à mes parents qui m'ont tout appris et tant donné sans condition, qui m'ont enseigné la valeur du travail bien fait, qui m'ont toujours soutenue même dans les moments les plus difficiles et qui m'ont permis de poursuivre mes études dans les meilleures conditions. J'espère que vous êtes fiers de cette réussite qui est aussi la votre.

Merci à ma sœur, Gaëlle, qui malgré nos différences m'a toujours soutenue.

Un énorme merci à Stéphane, Laetitia, Sébastien et Manon de m'avoir accueillie lors de mes séjours parisiens. Merci à Laetitia et Dame Ginnette pour nos soirées parisiennes entre filles.

Un grand merci à mes grands parents, Mémé, Papy et Mamie « Jounnette » (C'est comme ça que l'on dit Manon ?) pour votre soutien.

Une pensée toute particulière aussi à tous ceux qui nous ont quitté trop tôt et qui auraient été fiers de cette réussite, à ma mamie "Denise", à mon pépé "Robert" et à mon papy adoptif "Pierre".

Je souhaite finalement dédier cette thèse à mon « Namour » Stéphane, il m'est difficile de dire ici ce que je peux ressentir pour toi. Je te remercie de m'avoir soutenue et supportée malgré les difficultés rencontrées durant toutes ces années et plus particulièrement pendant ces années de thèse. Une autre aventure nous attend aujourd'hui, la venue de notre petit bout...

Table des matières

Liste des tables	XVIII
Liste des figures	XX
Liste des abréviations	XXVI
Communication des travaux de recherche.....	XXVIII
Introduction	3
1. Références bibliographiques	7
Chapitre 1 – Etat de l’art.....	13
1. Les nanoparticules et nanomatériaux	13
1.1. Définition.....	13
1.2. Les sources.....	15
1.3. Nanoparticules et pollution atmosphérique.....	19
1.3.1. Généralités	19
1.3.1. Les particules fines et les nanoparticules dans le compartiment atmosphérique de sites industriels.....	24
1.4. Lien entre les propriétés des nanoparticules et leurs effets toxicologiques et écotoxicologiques.....	28
1.5. Les nanoparticules de fer.....	34
1.5.1. Les nanoparticules de fer et leurs utilisations.....	34
2. Les nanoparticules et les plantes.....	37
2.1. La biosurveillance végétale.....	37
2.1.1. Les bryophytes et la biosurveillance.....	40
2.2. Les végétaux et les nanoparticules	41
2.2.1. La pénétration cellulaire des nanoparticules chez les végétaux	41
2.2.1.1 L’exposition racinaire.....	42
2.2.1.2 L’exposition aérienne	42
2.2.1.1 Les voies de pénétration (intercellulaire et intracellulaire)	43
2.2.2. Les effets des nanoparticules chez les végétaux	46
2.2.2.1 Les modes d’action	46
2.2.2.2 Les effets sur le développement et le métabolisme	48
2.2.2.3 Les effets sur le stress oxydant	49
2.2.2.4 Les effets génotoxiques	50
2.2.2.5 La modulation de l’expression génique.....	51
2.2.2.6 La modulation de miARN	52
2.2.3. Les effets de nanoparticules de fer chez les végétaux.....	52
3. Les nanoparticules et l’Homme	55
3.1. L’arbre trachéo-bronchique, les poumons et les cellules pulmonaires.....	55
3.1.1. Les caractéristiques de l’arbre trachéo-bronchique et des poumons	55
3.1.2. Les modèles de cellules pulmonaires in vitro	60
3.2. Comportement et impacts des nanoparticules chez l’Homme après inhalation	62
3.2.1. Le dépôt des particules ultra-fines et des nanoparticules dans les voies respiratoires	62
3.2.2. Distribution, métabolisation et excrétion des nanoparticules dans le corps humain.....	64
3.2.2.1 Rétention des nanoparticules dans les poumons	64
3.2.2.2 Clairance des nanoparticules au niveau du tissu pulmonaire.....	64
3.2.2.3 Translocation et distribution des nanoparticules dans l’organisme.....	65
3.2.2.4 Métabolisation des nanoparticules	66
3.2.2.5 Excrétion des nanoparticules	67
3.2.3. Les effets potentiels des nanoparticules sur l’organisme humain.....	69

3.3. Les effets des nanoparticules sur les cellules pulmonaires.....	70
3.3.1. La pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires.....	70
3.3.2. La « nanotoxicité » sur les cellules pulmonaires.....	75
4. Bilan du chapitre 1.....	77
5. Références bibliographiques.....	79
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	103
1. La caractérisation physico-chimique et surfacique des nanoparticules.....	104
1.1. Provenance.....	104
1.2. Forme, taille des nanoparticules et de leurs agglomérats et potentiel zeta.....	104
1.3. Surface et composition.....	105
1.4. Surface spécifique et « <i>volume specific surface area</i> ».....	106
2. Notre modèle végétal : <i>Physcomitrella patens</i>.....	107
2.1. La culture de <i>Physcomitrella patens</i>	107
2.1.1. La culture des plants adultes de <i>Physcomitrella patens</i>	107
2.1.2. La culture de protonéma.....	108
2.2. Protocole de préparation des solutions de nanoparticules de fer.....	108
2.3. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules bryophytiques.....	109
2.3.1. La microscopie confocale.....	109
2.3.2. La microscopie électronique à transmission.....	110
2.4. Le stress oxydant et le dosage des biomarqueurs.....	111
2.4.1. La préparation des échantillons de <i>Physcomitrella patens</i>	111
2.4.2. La viabilité et le dosage de l'ATP.....	111
2.4.3. Les espèces réactives de l'oxygène et des espèces nitrées.....	112
2.4.4. Le glutathion.....	113
2.4.5. Le malondialdéhyde.....	114
2.4.6. La 8-OHdG.....	116
2.4.7. Le Test des Comètes.....	119
2.4.7.1 Principe du test.....	119
2.4.7.1 Extraction et récupération des noyaux.....	120
2.4.7.2 Préparation et montage des lames.....	122
2.4.7.3 Dénaturation de l'ADN et électrophorèse.....	122
2.4.7.4 Neutralisation et déshydratation des lames.....	123
2.4.7.5 Coloration, lecture et analyse des lésions éventuelles.....	123
2.4.8. La modulation de l'expression génique.....	125
2.4.8.1 Le choix des gènes.....	125
2.4.8.2 L'extraction d'ARN.....	125
2.4.8.3 L'intégrité des ARN extraits.....	126
2.4.8.4 La RT-PCR en temps réel.....	126
2.4.8.5 La synthèse des ADN complémentaires.....	126
2.4.8.6 La PCR quantitative en temps réel.....	127
2.4.8.7 La méthode de quantification.....	128
3. Notre modèle humain : les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines.....	130
3.1. La culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC).....	130
3.1.1. La culture classique.....	130
3.1.2. Le développement de méthode : la culture en Interface Air-Liquide (IAL).....	131
3.2. La caractérisation des cellules épithéliales bronchiques humaines.....	131
3.2.1. La fixation des cellules.....	131
3.2.2. La coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS).....	132
3.2.3. La coloration immunocytochimique.....	132
3.3. Protocole de préparation des solutions de nanoparticules de fer.....	133
3.4. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules pulmonaires humaines.....	135
3.5. Le stress oxydant et le dosage des biomarqueurs.....	135

3.5.1. La viabilité et le dosage de l'ATP.....	135
3.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	136
3.5.3. Le glutathion.....	136
3.5.4. Le malondialdéhyde et les protéines.....	137
3.5.4.1 Les protéines.....	137
3.5.4.2 Le malondialdéhyde.....	138
3.6. La modulation de l'expression génique.....	139
3.6.1. L'extraction d'ARN.....	139
3.6.2. La synthèse des ADN complémentaires.....	140
3.6.3. Le choix des gènes.....	140
3.6.1. La PCR en temps réel et la méthode de quantification.....	141
4. Analyses statistiques.....	141
5. Bilan du chapitre 2.....	143
6. Références bibliographiques.....	144
CHAPITRE 3 – LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET SURFACIQUE DES NANOPARTICULES DE FER.....	151
1. La caractérisation des nanoparticules de fer.....	152
1.1. La taille, le diamètre hydrodynamique et la forme.....	152
1.2. La composition chimique, la composition de surface et la pureté.....	152
1.3. Le potentiel zêta.....	153
1.4. La surface spécifique et le <i>volume specific surface area</i> (VSSA).....	153
2. Article 1. Photoemission study of metallic iron nanoparticles surface aging in biological fluids. Influence on biomolecules adsorption.....	155
2.1. Introduction.....	155
2.2. Materials and methods.....	158
2.2.1. Chemicals.....	158
2.2.2. Apparatus.....	158
2.3. Results and discussions.....	159
2.4. Conclusion.....	169
3. Bilan du chapitre 3.....	170
4. Références bibliographiques.....	171
Chapitre 4. Les effets écotoxiques des nanoparticules de fer chez <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.....	177
1. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules de <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.....	178
1.1. Article 2. Atmospheric foliar iron engineered nanoparticle uptake by <i>Aphanorrhagma patens</i> (Hedw.) Lindb.....	179
1.1.1. Introduction.....	179
1.1.2. Materials and methods.....	180
1.1.2.1 Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles.....	180
1.1.2.2 Plant material and growth conditions and nanoparticle application.....	181
1.1.2.3 Microscopic analysis methods.....	181
1.1.3. Results.....	183
1.1.3.1 Characterization of iron nanoparticles.....	183
1.1.3.2 Uptake of iron nanoparticles in <i>Aphanorrhagma patens</i>	183
1.1.4. Discussion.....	187
1.1.5. Acknowledgements.....	187
1.2. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission.....	188
2. Les effets des nanoparticules de fer chez <i>Physcomitrella patens</i>.....	189
2.1. Article 3. Effects of iron engineered nanoparticles on <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp after foliar exposure.....	190
2.1.1. Introduction.....	191
2.1.2. Materials and methods.....	192

2.1.2.1 Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles	192
2.1.2.2 Plant material and growth conditions	193
2.1.2.3 Application of iron nanoparticles	193
2.1.2.4 Preparation of gametophytes for assays	193
2.1.2.5 Cells viability of <i>Physcomitrella patens</i> exposed to Fe-NP	193
2.1.2.6 Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS).....	194
2.1.2.7 Membrane lipid peroxidation: malondialdehyde	194
2.1.2.8 Antioxidant system: glutathione oxidation	195
2.1.2.9 Statistical analysis.....	196
2.1.3. Results.....	196
2.1.3.1 Characterization of iron nanoparticles.....	196
2.1.3.2 Cells viability of <i>Physcomitrella patens</i> exposed to Fe-NP.....	198
2.1.3.3 Oxidative stress in gametophytes of Fe-NP-treated <i>Physcomitrella patens</i>	199
2.1.4. Discussion	200
2.1.5. Acknowledgements.....	204
2.2. La modulation de l'expression génique	206
2.3. La génotoxicité	208
2.3.1. Les adduits à l'ADN	208
2.3.2. Le développement du test des comètes	210
3. Bilan du chapitre 4.....	213
4. Références bibliographiques	214

Chapitre 5. Les effets toxiques des nanoparticules de fer au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines..... 225

1. La culture primaire de cellules épithéliales bronchiques	226
2. Article 4. Effects of iron nanoparticles on primary cultures of lung cells.....	228
2.1. Introduction	229
2.2. Matériel et méthodes.....	230
2.2.1. Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles (Fe-NP)	230
2.2.2. Cell cultures	231
2.2.3. Periodic Acid Schiff (PAS) and Immunofluorescence stains.....	232
2.2.3.1 PAS stain.....	232
2.2.3.2 Immunofluorescence stain.....	232
2.2.4. Exposure of primary cultures of bronchial epithelial cells	232
2.2.5. Transmission electron microscopy.....	233
2.2.6. Cell Viability assay.....	233
2.2.7. Gene expression	233
2.2.7.1 RNA isolation.....	233
2.2.7.2 cDNA Synthesis	233
2.2.7.3 High throughput quantitative real-time PCR.....	233
2.2.7.4 Conventional quantitative real-time PCR.....	234
2.2.7.5 Analysis of gene expression.....	234
2.2.8. Intracellular ROS measurement.....	235
2.2.9. Malondialdehyde measurements	235
2.2.9.1 Sample preparation.....	235
2.2.9.2 Proteins assay.....	235
2.2.9.3 Malondialdehyde (MDA) assays	235
2.2.10. GSH and GSSH measurement.....	236
2.2.10.1 Sample preparation	236
2.2.10.2 Derivatization procedure.....	236
2.2.10.3 Chromatography method.....	236
2.2.11. Statistical Analysis.....	237
2.3. Results	239
2.3.1. Characterization of Fe-NP.....	239
2.3.2. Characterization of human bronchial primary cells	240
2.3.3. Iron nanoparticles uptake.....	241
2.3.4. Cell viability	241
2.3.5. Modulation of gene expression.....	242

2.3.6. Production of ROS in primary cultures of bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP	244
2.3.1. Glutathione status and production malondialdehyde evolution in primary cultures of bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP	247
2.4. Discussion	247
2.5. Acknowledgements	251
3. Bilan du chapitre 5	252
4. Références bibliographiques	253
Conclusion et perspectives.....	265
1. Conclusion	265
1.1. La caractérisation des nanoparticules.....	266
1.2. Les effets biologiques des nanoparticules manufacturées de fer sur des modèles végétaux et humains	267
2. Perspectives	268
3. Références bibliographiques	269
Bibliographie Générale	273
Annexes.....	307

Liste des tables

Tab. 1 : Application des nanotechnologies et des nanomatériaux en fonction des secteurs d'activité (INRS, 2012).....	17
Tab. 2 : Comparaison des concentrations élémentaires moyennes dans les PM10 (ng.m ⁻³) (Lamaison, 2006).....	24
Tab. 3 : Tableau récapitulatif sur les émissions de la source sidérurgie (Lamaison, 2006).....	25
Tab. 4 : Composants détectés dans les particules (Garçon <i>et al.</i> , 2006).....	26
Tab. 5 : Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité (www.inrs.fr).....	33
Tab. 6 : Synthèse des différents types de nanoparticules de fer et leur potentielle utilisation.....	35
Tab. 7 : Liste non exhaustive des différents types de cellules pulmonaires utilisés en culture <i>in vitro</i>	59
Tab. 8 : Quantités et concentrations en Fe-NP choisies pour les expositions des plants de <i>Physcomitrella patens</i>	108
Tab. 9 : Méthodes de broyage adaptées aux différents tissus de <i>Physcomitrella patens</i>	120
Tab. 10 : Gènes d'intérêt impliqués dans le stress oxydant chez <i>Physcomitrella patens</i> . Amorces sens (5'-3') : R (reverse) – Amorces anti sens (3'-5') : F (forward).....	124
Tab. 11 : Produits de réaction nécessaires à la réalisation d'une PCR en temps réel.....	128
Tab. 12 : Cycles programmés pour la réalisation de la PCR en temps réel.....	128
Tab. 13 : Bilan des méthodes utilisées lors de nos analyses effectuées lors de nos travaux de recherche.....	143
Tab. 14 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des nanoparticules de fer produites par le MCMC de Thiais (na : non adapté – nd : non déterminé – SS : sans sonication – AS : avec sonication – a. immersion de 24h – b. immersion de 48h) – Pour le potentiel zêta, les mesures ont été faites plusieurs fois mais les résultats restent similaires.....	154
Tab. 15: [Fe]/[O] calculated from peak intensities corrected by XPS sensitivity factors (SF) for the total O1s area (R1,r1), the O2- component (R2,r2), the OH component (R3,r3). For iron, the Fe2p3/2 peak has been considered and the SF is 2.0. For oxygen the SF is 0.66. This evaluation is shown for clean nFe nanoparticles (nFeb), nFe immersed in Volvic water for 24 hours (VOL24H), nFe immersed in HBSS solution for 24 hours (HBSS24H), nFe immersed in B-Ali solution for 24 hours (B-Ali24H) and finally) nFe immersed B-Ali solution for 48 hours (B-Ali48H). The 3 columns on the left are for the bare surface, the 3 columns on the right are for the surface after 5 s of sputtering (cleaned from surface contamination).	165
Tab. 16: Characterization of pristine state of nanoparticles of iron-engineered nanoparticles.....	182
Tab. 17: Characterization of pristine state of nanoparticles of iron-engineered nanoparticles.....	197
Tab. 18 : Modulation de l'expression des gènes d'intérêt étudié chez <i>Physcomitrella patens</i> après une exposition à des Fe-NP - 1/RQ en rouge ou RQ en vert mettant en évidence, respectivement, une sous-expression du gène (↘) ou une surexpression du gène (↗) – J3 : 3 jours d'exposition – J7 : 7 jours d'exposition – MDHAR : monodéhydroascorbate réductase – APX : ascorbate peroxydase – GR : glutathion réductase.....	206

Tab. 19: Characterization of pristine state of iron-engineered nanoparticles	238
Tab. 20: Differential gene expression in bronchial epithelial cells exposed to Fe_MCMC relative to non-exposed cells. Relative quantities (RQ) were calculated based on the comparative threshold cycle method ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$), with non-exposed cells as calibrator. – RQ \leq 0.25 in green – RQ \geq 0.25 in red.....	243
Tab. 21: Difference statistically significant between the controls and the samples exposed to 2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ of Fe-NP. One way ANOVA with Dunnett's <i>post hoc</i> test, *p<0,05 _ n = 9 (3 patients in 3 replicates).....	244

Liste des figures

Fig. 1 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique, 2005)	14
Fig. 2 : Répartition en pourcentage de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 dans le monde (INERIS, 2007)	18
Fig. 3 : Exemples de produits contenant des nanomatériaux (Larue, 2011)	18
Fig. 4 : Différentes sources et voies de transfert des polluants dans l'atmosphère (http://www.airfobep.org/pollution-atmospherique.html)	20
Fig. 5 : Emissions atmosphériques de particules totales en suspension ou TSP (<i>Total Suspended Particles</i>) par secteur d'activité en France métropolitaine (en kt) (CITEPA, 2012)	21
Fig. 6 : Emissions atmosphériques de PM ₁ par secteur d'activité en France métropolitaine (en kt) (CITEPA, 2012)	23
Fig. 7 : Distribution de taille des particules collectées à Dunkerque. La courbe représente la fréquence cumulative (%) et l'histogramme représente la fréquence relative (%) (Garçon <i>et al.</i> , 2006).....	26
Fig. 8 : Représentation schématique de l'évaluation de la qualité globale d'une étude de toxicité des nanomatériaux sur la base des scores « nano étude ». La zone claire représente la gamme des scores pour lesquels une étude peut être considérée comme de bonne qualité globale ; à l'inverse, la zone ombrée représente la région dont la qualité globale est faible (Card et Magnuson, 2010).	28
Fig. 9 : Evolution du rapport surface/volume (en bleu) et de la fraction de molécules présentes à la surface de la particule (en rouge) en fonction de son diamètre – Hypothèse de calcul : particule sphérique de structure dense composée de molécules de 5Å, d'une surface spécifique de 300 m ² .g ⁻¹ et d'une masse volume de 1 g.cm ⁻¹ (Witschger et Fabriès, 2005)	30
Fig. 10 : Différents états de configuration des particules à l'état de poudre et dispersées en milieu liquide (Jiang <i>et al.</i> , 2009).....	31
Fig. 11 : Les différents concepts de la biosurveillance (Cuny, <i>comm. pers.</i>)	38
Fig. 12 : Voies pour l'absorption du plomb après le dépôt de particules contenant du plomb : dépôt de particules sur la surface des feuilles (1), transformation chimique sur la surface foliaire menant à des phases secondaires contenant du Pb et éventuellement des solutés (2), accumulation de particules dans les stomates et éventuellement pénétration de nanoparticules (3a), diffusion possible des solutés par les pores aqueux présents sur les rebords de la cuticule des stomates (3b ₁) et les parois cellulaires anticlinal de cuticules (3B ₂). Les symptômes de toxicité (nécroses) induite par la présence des particules contaminées sur la feuille (4) (Uzu <i>et al.</i> , 2010).....	44
Fig. 13 : Voies associées à la pénétration, à l'absorption et à la translocation des nanoparticules dans les plantes. L'épaisseur des lignes est corrélée à titre provisoire avec la signification supposée des voies. Le schéma présente les parties aériennes des plantes (boîte verte) et les racines (boîte jaune), le mouvement dans le tissu et le transfert pour le transport longue-distance (connexion boîte bleue). Des lignes discontinues indiquent les hypothèses de transports les moins probables (Dietz et Herth, 2011).	45
Fig. 14 : Relation entre les caractéristiques physiques, chimiques et surfaciques des nanoparticules et les effets biologiques (Dietz et Herth, 2011)	47

Fig. 15 : Représentation schématique des voies aériennes et des alvéoles humaines (Leclerc, 2011).....	56
Fig. 16 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéo-bronchique et glandulaire (Roux, 2010).....	57
Fig. 17 : Culture primaire d'un épithélium bronchique. Représentation d'une section de culture en interface air-liquide avec la présence de mucus (M), du liquide de surface (ASL), de cellules sécrétoires (G), de cellules ciliées (C), de cellules basales (B), de cellules intermédiaires (I) et la membrane du support de culture (p). Photo de Scott H. Randell. (Guggino et Guggino, 2000)	61
Fig. 18 : Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires chez l'Homme en fonction de leur taille – Flèche rouge : 200 nm – Flèche bleue : 400 nm (CIPR, 1994, Witschger et Fabriès, 2005).....	63
Fig. 19 : Hypothèse concernant les effets sur la santé des particules fines et nanoparticules de l'aérosol ambiant d'après Kreyling <i>et al.</i> (2004) (Witschger et Fabriès, 2005)	68
Fig. 20 : Mécanismes d'absorption cellulaire des nanoparticules et translocation intracellulaire liés: (A) La phagocytose, un mécanisme utilisant l'actine se produisant principalement dans les phagocytes, conduisant à des phagosomes (AI) et phago-lysosomes (L). (B) La macropinocytose, également une voie utilisant l'actine, englobant les nanoparticules, conduisant à des macropinosomes (BI) qui pourraient être exocytés ou fusionnés avec les lysosomes (L). (C) L'endocytose avec la clathrine, associée à la formation d'un réseau de clathrine et en fonction de la GTPase, formant des endosomes primaires (CI) et endosomes tardifs (CII), y compris des corps multivésiculaires (CIII). (D) Les clathrines et cavéoles indépendantes des voies d'endocytose. (E) Cavéoles et endocytose, formant des caveosomes (EI), qui fusionnent avec le réticulum endoplasmique (EII) ou passent à travers la membrane cellulaire (EIII). (F) La diffusion des particules/transport à travers la membrane plasmique apicale, conduisant à des particules situées librement dans le cytosol. D'après Brandenberger <i>et al.</i> (2010) (Paur <i>et al.</i> , 2011).	71
Fig. 21 : Cellules A549 observées au MET après 24h d'exposition à des nanoparticules de magnétite (10 µg.cm ⁻²) (Konczol <i>et al.</i> , 2011).....	71
Fig. 22 : Exemple de modèle de co-culture d'une barrière de l'épithélium pulmonaire humain composée de cellules épithéliales (A549), de macrophages et de cellules dendritiques (dérivés de monocytes humain) (Rothen-Rutishauser <i>et al.</i> , 2008)....	73
Fig. 23 : Schéma montrant la voie conduisant à l'inflammation suite à une exposition de particules et nanoparticules induisant une inflammation provoquée dans un premier temps par un stress oxydant. Schéma repris d'après Donalson <i>et al.</i> (2005).	74
Fig. 24 : XPS _ K-ALPHA (Thermo Scientific)	105
Fig. 25 : Porte-échantillons de l'XPS_K-ALPHA placé dans la chambre d'insertion.....	105
Fig. 26 : <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch et Schimp (Source: David Cove - http://biology4.wustl.edu/moss/slideshow/pages/gametophores%20.htm).....	107
Fig. 27 : Schéma réactionnel entre luciférase et luciférine en présence d'ATP. La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de Mg ²⁺ , d'ATP et d'oxygène (d'après le kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, PROMEGA).....	111
Fig. 28 : Mécanisme de la méthode de dosage des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les bryophytes (d'après le OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit - Green Fluorescence, Cell Biolabs).	112

Fig. 29 : Protocole d'extraction d'ADN chez <i>Physcomitrella patens</i> (d'après "Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit", GE HealthCare)	115
Fig. 30 : Protocole de dosage de la 8-OHdG (d'après New 8-OHdG Check ELISA, Gentaur)	117
Fig. 31 : Protocole général adapté pour la réalisation d'un test des Comètes (version pH neutre ou version alcaline) chez <i>Physcomitrella patens</i>	118
Fig. 32 : BD™ Medimachine system	120
Fig. 33 : Ciseaux en céramique (Kyocera)	120
Fig. 34 : Protocole de montage des lames de microscopie pour le test des comètes adapté pour <i>Physcomitrella patens</i> (d'après Manier, 2008).	121
Fig. 35 : Principe des sondes TaqMan™ (D'après Céline Loriol, 2006)	127
Fig. 36 : Culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (Photo L. Canivet)	130
Fig. 37 : Culture de cellules épithéliales bronchiques humaines en interface air liquide	131
Fig. 38 : Protocole d'exposition des cellules pulmonaires humaines aux Fe-NP	134
Fig. 39 : Schéma du protocole défini pour réaliser une analyse de la modulation de l'expression génique au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues d'un patient en utilisant des <i>TaqMan™ Gene Expression Assay</i> (TLDA) – R : réplicat ; Ech : échantillon	142
Fig. 40: Survey XPS Spectrum of cleaned nFe sample. Main photoelectron peaks are located near 531 eV for the O1s core level and between 700 eV and 1000 eV for the Fe2p core level and Auger Fe LMM transitions. We can observe a relative low carbon contamination, as the C1s peak near 285 eV is about ten times lower in intensity than the O1s	159
Fig. 41: O1s XPS Spectrum of cleaned nFe sample. Two components can be fitted: one located at 530.4 eV for the O2- species and the other near 531.9 eV for the hydroxyl OH-	160
Fig. 42: Fe2p spectral region evolution during Ar+ sputtering experiment. Sputtering step has been set to 2s between each spectrum. This region reveals two broad bands attributed to Fe2p3/2 and Fe2p1/2 multiplet splitting. Each band can be decomposed in components characteristic of the iron oxidation state	160
Fig. 43: Fe2p3/2 spectrum of cleaned nFe sample. The high spin component has been decomposed following Grosvenor and al procedure [ref]. Before sputtering, only the trivalent oxidation state can be observed (a). After some sputtering cycles (b), divalent state is apparent at lower binding energy	161
Fig. 44: TEM of clean nFe: (a) agglomeration of different size iron nanoparticles due to magnetism. (b) picture magnification on a single particle showing a less dense film on the sphere surface with a thickness of approximatively 2.0 nm	162
Fig. 45: On the left: evolution of Iox and Imet relative intensities (Imet = 1 and Iox = 0 before sputtering) as function of sputtering time for nFe exposed 24 hours in different aqueous solutions. Clean nFe reference (a), Volvic water (b), HBSS solution (c), B-Ali solution (d). On the right: corresponding O1s spectra evolution during sputtering. Note that non-zero intensity for the metallic state is detected at different etching time [6 s (a), 7 s (b), 8 s (c) and 14 s (d)]	163
Fig. 46: The same as in figure 6 for the more oxidant B-Ali solution for a 48 hours exposure time. For the other media, results do not significantly differ from 24 hours exposition and are thus not presented	164

- Fig. 47: Fe2p spectra for (a): clean nFe particle showing a characteristic loss (L1) located at 8.5 eV higher than the main 2p_{3/2} component. (b): nFe particle exposed 24 hours to B-Ali solution showing a characteristic loss (L2) located at a lower energy (5.4 eV) from the main 2p_{3/2} component..... 166
- Fig. 48: Survey spectra for nFe exposed 24 hours [(b), (e)] and 48 hours [(c) and (f)] in the most oxidant HBSS (II) and B-Ali (I) media. (a), (d) spectra are for the clean nFe reference. Spectra (b, c, e, f) have been shifted in energy to avoid peak superposition..... 167
- Fig. 49: XPS spectra of nFe aged particles (24 hours) immersed in DNA solution. (a) aging in Volvic water. (b) aging in HBSS solution. (c) aging in B-Ali solution. In each case (a, b, c), 3 immersion times are presented (bottom to top: 1min, 3 min, 20 min). C1s and N1s are much more important when aging is realized in B-Ali (c);..... 168
- Fig. 50: SEM image of iron nanoparticles..... 182
- Fig. 51: A - Microscopy image of leaf of *Aphanorrhagma patens* not exposed to iron-engineered nanoparticles (x10). B - Microscopy image of leaf of *Physcomitrella patens* under treatment of 500 ng/plants of Fe nanoparticles following 14-day exposure (x40). C - Microscopy image of leaf of *Physcomitrella patens* under treatment of 5 000 ng/plants of Fe nanoparticles following 7-day exposure (x40). The red circles around the agglomerates of nanoparticles..... 184
- Fig. 52: SEM micrographs (A) and EDX analysis (B) of the iron-engineered nanoparticles deposited on *Aphanorrhagma patens* leaves..... 185
- Fig. 53: A, B, C - Confocal fluorescence microscopy image of leaf of *Aphanorrhagma patens* under treatment of 5µg/plants of Fe nanoparticles following 14-day exposure. View A shows the leave of *Physcomitrella patens* in DIC method. The view B shows the same leave under an excitation of 561nm. The view C shows the same leaf in post-observation with ZEN (orthogonal section view). In this view, section 1 shows the horizontal optical section and section 2 shows the vertical optical section. The agglomerates of Fe nanoparticles observed are surrounded. (photos of L. Canivet, 2011). NPs: Nanoparticles..... 186
- Fig. 54 : Figure d'une cellule de *Physcomitrella patens* après une exposition de 21 jours à des Fe-NP (50 000 ng/plant) (Photo of C. Allet, 2010) – P : paroi – MP : membrane plasmique – Chl : chloroplaste – N: noyau – NPs : Fe-NP. 188
- Fig. 55: MEB image of iron nanoparticles 197
- Fig. 56: ATP formation in *Physcomitrella patens* plants non-exposed and exposed to increased concentration of Fe-NP after 1 h, 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days). All values are relative quantity means ± SD (n = 3). * p<0,05 vs non-exposed 198
- Fig. 57: ROS/RNS formation in *Physcomitrella patens* plants non exposed and exposed to increased concentration of Fe-NP after 1 h, 3 h, 6h, 24 h (1 day) and 72 h (3 days). All values are means ± SD (n = 3). * p<0,05 vs non exposed..... 199
- Fig. 58: Oxidative stress biomarkers formation in *Physcomitrella patens* plants non-exposed and exposed to increased concentration of Fe-NP after 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days). A. Malondialdehyde – B. Glutathione status. All values are relative quantity means ± SD (n = 3). * p < 0,05 vs non-exposed..... 201
- Fig. 59 : Electrophorégramme d'ARN montrant la qualité des ARNs extraits des gamétophytes de *Physcomitrella patens* après une exposition ou non aux Fe-NP - 1-18 : échantillons après 3 jours d'exposition (J3) – 19-36 : échantillons après 7 jours d'exposition (J7) – 1-3 et 19-21 : échantillons non exposés (NE) - 4-6 et 22-24 : échantillons exposés à 5 ng/plant (5ng) – 7-9 et 25-27 : échantillons exposés à 50

- ng/plant (50ng) – 10-12 et 28-30 : échantillons exposés à 500 ng/plant (500ng) – 13-15 et 31-35 : échantillons exposés à 5 000 ng/plant (5 000ng) – 16-18 et 34-36 : échantillons exposés à 50 000 ng/plant (50 000ng). 205
- Fig. 60 : Action de la glutathion réductase (GR). Une augmentation de GR entraîne une augmentation de la transformation de GSSG en GSH et donc une augmentation de GSH et par voie de conséquence une diminution du ratio GSSG/GSH. 207
- Fig. 61 : Action de l'ascorbate peroxydase (APX) et de la monodehydroascorbate réductase (MDHAR) – MDHA : monodehydroascorbate – AsA : ascorbate..... 207
- Fig. 62 : Evolution de la quantité moyenne (\pm écart type) d'adduit à l'ADN (8-OHdG) au niveau de gamétophytes de *Physcomitrella patens* exposés à des concentrations croissantes de nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC. ANOVA one way suivi d'un test *post hoc* de Dunnett - * $p < 0,05$ par rapport au non exposé (n=3) 208
- Fig. 63 : Photos de noyaux observés lors du développement du test des comètes au niveau de gamétophytes et de protonéma de *Physcomitrella patens*. A. Comète observée dans les conditions d'un protocole à pH 13, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage à la médimachine (objectif x50) – B. Comète observée dans les conditions d'un protocole à pH 13, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage à la médimachine (objectif x50) – B. Même image de comète observée et pointée à l'aide du logiciel COMET IV – D. Noyaux intacts observée dans les conditions d'un protocole à pH 7, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage au rasoir (objectif x40) – E. Noyaux intacts observée dans les conditions d'un protocole à pH 7, sur protonéma non exposé, avec un broyage au rasoir (objectif x40) (Photos L. Canivet, 2012)..... 211
- Fig. 64 : Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques cultivées en interface air-liquide, le jour de la mise en interface air-liquide (J0) et après 7 jours, 16 jours et 28 jours de culture en interface air-liquide (J7, J16 et J28) grossissement x60, Nikon Eclipse Ti-U microscope..... 226
- Fig. 65: MEB image of iron nanoparticles – magnitude x 50 000 - SEM LEO 1530 (Zeiss, Germany)..... 238
- Fig. 66: Immunofluorescence and PAS stains of bronchial epithelial cells – A. Immunostaining dilutions: 1:250 for MUC5AC and 1:100 for pan-cytokeratin, magnitude x40, LEICA DMIRE microscope – B. PAS, fuchsia color corresponds to polysaccharides, magnitude x60, Nikon Eclipse Ti-U microscope. 240
- Fig. 67: TEM images of bronchial epithelial cells (after 24-h exposure to Fe-NP. The Fe-NP are enclosed in vesicles (red cercle). C: intracellular medium – EC: extracellular medium 241
- Fig. 68: Cell viability of primary culture of HBEC (n-3) after 24-h exposure to Fe-NP.. 242
- Fig. 69: Evolution of ROS production in bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP. The production of ROS of exposed cells was normalized with that of non-exposed cells. NE: non-exposed cells - NP2-NE: results of cells exposed to Fe-NP (2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) normalized with non-exposed cells – PMA-NE: results of cells exposed to PMA normalized with non-exposed cells – NAC (NP2-NE): results of cells exposed to Fe-NP (2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) with NAC normalized with non-exposed cells with NAC – NAC(PMA-NE): results of cells exposed to PMA with NAC normalized with non-exposed cells with NAC – Kruskal Wallis test with Dunnett's *post hoc* test with T5min as reference to see the evolution over time, * $p < 0,05$ _ n = 12 (3 patients in 4 replicates). 245
- Fig. 70: Effect of Fe-NP on intracellular glutathione status (GSSG/GSH) content in HBECs. Results are expressed as the means \pm SD of three independent experiments conducted in triplicates (n=9)_NE: no exposed – T6: 6h of exposure – T24: 24h of

exposure - T48: 48h of exposure. One way ANOVA with Dunnett's <i>post hoc</i> test, *p<0,05 _ n = 9 (3 patients in triplicates)	246
Fig. 71: Changes in malondialdehyde (MDA) concentrations in HBECs following Fe-NP exposure. Results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments conducted in triplicates (n=9)_NE: no exposed - T6: 6h of exposure - T24: 24h of exposure - T48: 48h of exposure. One way ANOVA with Dunnett's <i>post hoc</i> test, *p<0,05 _ n = 9 (3 patients in triplicates).....	246
Fig. 72 : Approche transversale et transdisciplinaire nécessaire lors des études de nanotoxicologie et/ou de « <i>Plant nanotoxicology</i> » - NPs : nanoparticules.....	266

Liste des abréviations

8-OHdG : 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine	DLS : Diffusion dynamique de la lumière
ADN : Acide désoxyribonucléique	EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
Ag-NP : Nanoparticule d'argent	ETM : Eléments trace métalliques
APOX : Ascorbate peroxydase	EMX : Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
ARN : Acide ribonucléique	Fe-NP ou nFe : Nanoparticule de fer
B-Ali medium : « <i>Air-Liquid Interface Medium</i> » (milieu de culture pour cellules épithéliales bronchiques)	Fe₂O₃ : Nano-maghémite
BEGM : « <i>Bronchial Epithelial Cell Growth Medium</i> » (milieu de culture pour cellules épithéliales bronchiques)	Fe₃O₄ : Nano-magnétite
BHT : butylated hydroxytoluène	FeONP : Nanoparticule d'oxyde de fer
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive	GR : Glutathion réductase
Carboxy-H₂-DCFDA : 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	GSH : Glutathion réduit
CAT : Catalase	GSSG : Glutathion oxydé
CEN : European committee for standardization	HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
CITEPA : Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique	HBSS : « Hank's balanced salt solution »
CL₂ : Concentration létale 2	HBEC : « <i>Human bronchial epithelial culture</i> »
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	HPLC : high performance liquid chromatography ou chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)
DHAR : Déhydroascorbate réductase	HSP70 : Heat shock proteins 70
DIC : « <i>Differential interference contrast</i> »	IAL : Interface air-liquide
	LMPA : « <i>Low melting point agarose</i> » ou garose à bas point de fusion

LSVF : Laboratoire des sciences végétales et fongiques

MCMC : Métaux et céramiques à microstructures contrôlées

MDA : Malondialdéhyde

MDHAR : Monodéhydroascorbate réductase

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

miARN : micro-Acide ribonucléique

MWCNT : « *Multi-Walled Carbon Nanotube* »

NA : Agarose à point de fusion normal

NEM : N-ethylmaleimide

NHBE : « *Normal human bronchial epithelial* »

NiO-NP : Nanoparticule d'oxyde de nickel

NP : Nanoparticule

nZnO : Nanoparticule d'oxyde de Zinc

nZVI : Nano zero valent iron (nanoparticle)

OPA : Orthophtaldéhyde

PAS : Périodique-Acid-Schiff

PB : Tampon phosphate

PBS : « *Phosphate bufferd-saline* » ou tampon phosphate

PCB : Polychlorobiphényles

PM : « *Particle matter* »

QSP : Quantité suffisante pour

RLU : « *Relative luminescence unit* »

ROS : « *Reactive oxygen species* » ou espèces réactives de l'oxygène

RNS : « *Reactive nitrogen species* » ou espèces réactives de l'azote

RQ : « *Relative quantity* »

RT-PCR : « *Reverse transcription Polymerase chain reaction* »

SCENIHR : « *Scientific committee on emerging an newly identified health risk* »

SOD : Superoxyde dismutase

SPION : « *Supermagnetic iron oxide nanoparticle* »

SSA : « *Specific surface area* »

SWCNT : « *Simple-Walled Carbon Nanotube* »

TBA : Acide thiobarbiturique

TEP : 1,1,3,3-tétraéthoxypropane

TLDA : TaqMan™ Low Density Arrays

TSP : Particules totales en suspension

UFP : Ultra fines particules

VSSA : « *Volume specific surface area* » ou rapport surface/volume

XPS : « *X-ray photoelectron spectroscopy* »

Communication des travaux de recherche

❖ Publications internationales

– Publications acceptées

Canivet, L., Denayer, F.O., 2011. Staining of protonematal cells of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. for better highlighting micronuclei in bryophytes. *Cryptogamie Bryologie*, 32(3): 211-220 (Annexe 1)

Canivet, L., Dubot, P., Denayer, F.O., 2014. Atmospheric foliar iron engineered nanoparticle uptake by *Aphanorrhegma patens* (Hedw.) Lindb. *Journal of Bryology*, *Acceptée*

– Publications soumises

Canivet, L., Denayer, F.O., Champion, Y., Cenedese, P., Dubot, P., 2013. Photoemission study of metallic iron nanoparticles surface aging in biological fluids. Influence on biomolecules adsorption. *Applied Surface Science*, *Acceptée avec corrections mineures*

Canivet, L., Dubot, P., Garçon, G., Denayer, F.O., 2013. Effects of iron engineered nanoparticles on *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp after an atmospheric foliar exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *Soumis*

Canivet, L., Denayer, F.O., Dubot, P., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., Effects of iron nanoparticles on primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Toxicology in vitro*, *Soumis*

❖ Communications orales ou affichées

– Communications orales

Canivet, L., Dubot, P., Garçon, G., Courtecuisse, R., Denayer, F.O., 2013. Effects of iron nanoparticles on *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp. 23rd SETAC Europe Annual Meeting, Glasgow, Ecosse.

Canivet, L., Denayer, F.O., Courtecuisse, R., 2013. Evaluation des impacts écotoxicologiques et toxicologiques de nanoparticules métalliques manufacturées et environnementales : mesures de réponses précoces induites chez *Physcomitrella patens* (bryophytes) et chez l'homme. Journée Doctorants ADEME, Angers, France.

Canivet, L., Denayer, F-O., Courtecuisse, R., 2013. Evaluation des impacts écotoxicologiques et toxicologiques de nanoparticules métalliques environnementales et manufacturées : mesures de réponses précoces induites *Physcomitrella patens* (bryophytes) et chez l'homme. Journée Air ADEME, Paris, France

Canivet, L., Denayer, F-O., Courtecuisse, R., 2012. Caractérisation de l'écotoxicité des particules ultra-fines métalliques et de leurs réactivités biologiques chez les bryophytes. Journée Air ADEME, Paris, France

– Communications affichées

Canivet, L., Denayer, F.-O., Lo-Guidice, J.-M., Courtecuisse, R., 2012. Characterization of ultra-fine metal particle ecotoxicity and their biological reactivity on bryophytes and on lung cells. Journée André Verbert, Lille, France.

Canivet, L., Denayer, F.O., Lo-Guidice, J.-M., Courtecuisse, R., 2012. Characterization of ultra-fine metal particle ecotoxicity and their biological reactivity on bryophytes and on lung cells. Journée thématique IRENI, Dunkerque, France.

Canivet, L., Denayer, F.O., Courtecuisse, R., 2011. Caractérisation de l'écotoxicité des particules ultra-fines métalliques et de leurs réactivités biologiques chez les bryophytes. Journée Doctorantes ADEME, Angers, France.

Canivet, L., Denayer, F.O., Courtecuisse, R., 2011. Caractérisation de l'écotoxicité des particules ultra-fines métalliques et de leurs réactivités biologiques chez les bryophytes. Journée thématique IRENI, Dunkerque, France. – Prix du meilleur poster.

Canivet, L., Denayer, F.O., Courtecuisse, R., 2010. Caractérisation de l'écotoxicité des particules ultra-fines métalliques et de leurs réactivités biologiques chez les bryophytes. Colloque « Environnement-Santé », APPA Nord – Pas de Calais, Lille, France.

Canivet, L., Denayer, F.O., Courtecuisse, R., 2010. Caractérisation de l'écotoxicité des particules ultra-fines métalliques et de leurs réactivités biologiques chez les bryophytes. Journée RSEIN/OQAI – « Les particules dans l'air intérieure », Villeneuve d'Ascq, France.

Remarque : ce mémoire de thèse est rédigé en français, cependant la majorité des résultats issus de ces recherches ont fait ou feront l'objet de publications dans des revues internationales et sont présentés ici en anglais.

INTRODUCTION

Introduction

Ces dernières années, les impacts environnementaux et sanitaires de la pollution de l'air ont fait l'objet de nombreuses études (Gombert *et al.*, 2005 ; Faburé *et al.*, 2010 ; Brauer *et al.*, 2012 ; Dallmann *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2013 ; Pateraki *et al.*, 2013 ; Tagliari de Brito *et al.*, 2013). L'atmosphère est un mélange de gaz et de particules d'origines minérale et/ou organique. Les types de polluants qui y sont présents et les niveaux de pollution dépendent de plusieurs facteurs comme la source d'émission, les conditions physiques et les paramètres météorologiques (Meyer *et al.*, 2010). Le Nord de la France est particulièrement touché par la pollution atmosphérique et les problèmes de santé qui lui sont associés, en particulier au niveau de la ville industrialo-portuaire de Dunkerque. Cette ville située au bord de la mer du Nord, est soumise à une pollution atmosphérique particulière provenant non seulement des activités industrielles situées à proximité (industries sidérurgiques, industries de l'aluminium, raffineries de pétrole, industries de la chimie de base, industries pharmaceutiques, industries agroalimentaires), mais aussi de la circulation automobile. Des études de métrologie réalisées dans cette région (Lamaison, 2006, Garçon *et al.*, 2006) ont mis en évidence la présence de particules fines et ultra-fines avec une part importante de fer. Les particules atmosphériques issues de ces retombées industrielles représentent donc une partie majeure de la pollution de l'air (Meyer *et al.*, 2010 ; Ledoux, 2003 ; Garçon *et al.*, 2006). Emises dans l'environnement, elles sont constituées de particules de différentes tailles et durant ces dernières décennies, la proportion des particules ultra-fines a augmenté avec l'utilisation de filtres de plus en plus efficaces dans l'industrie (Muller *et al.*, 2007), retenant les particules micrométriques mais pas celles de taille nanométrique. Comme pour les autres polluants, l'abondance des particules ainsi que leur granulométrie sont dépendantes des conditions environnementales (rural, urbain, industriel, etc.) mais aussi de la proximité de la source, de l'intensité des émissions et des conditions météorologiques (Buseck et Adachi, 2008 ; Mariet *et al.*, 2011). Parallèlement, avec l'émergence des nanotechnologies et l'utilisation croissante de nanoparticules manufacturées dans différents secteurs activités (industrie, cosmétique, etc.), il existe un risque accru de relargage de ces polluants dans l'environnement, au travers des déchets industriels mais aussi domestiques. Ainsi, le risque d'exposition des écosystèmes et de la population humaine aux nanoparticules manufacturées est croissant, il est donc important d'évaluer le danger et le risque de ces polluants dont la préoccupation est émergente.

Un des défis sociétal du XXI^{ème} siècle sera de mieux prendre en compte les risques des nouvelles technologies pour l'environnement et la santé humaine. Les nanoparticules font partie de ces nouvelles technologies actuellement sous le couvert du principe de précaution. En effet, elles sont très peu réglementées et à l'heure actuelle, la connaissance du danger potentiel que certaines d'entre-elles pourraient représenter, pour la santé humaine et l'environnement, est très parcellaire. C'est pourquoi,

l'amélioration des connaissances dans ce domaine est fondamentale afin de mieux pouvoir gérer les risques à l'avenir. Pour le moment, ni REACH, ni d'autres réglementations ne les prennent réellement en compte pour leur évaluation des risques. Parallèlement, à ces considérations des institutions publiques, les experts scientifiques ont à plusieurs reprises émis leurs inquiétudes quant à la toxicité et à l'écotoxicité de ces nouveaux polluants émergents. Les experts estiment que les niveaux de risques, d'irréversibilité des risques et d'ignorance compte tenu du savoir scientifique disponible sont significativement élevés. Il paraît donc indispensable de caractériser les dangers et d'évaluer les risques de ces nanoparticules. Selon Jean-Pierre Dupuy et Françoise Roure (cités par Comité de la prévention et de la précaution, 2006), il est nécessaire d'aller bien au delà de l'analyse de risques «classique» (approche causale simple) et d'opter pour une approche systémique des risques induits par les nanoparticules et produits nanostructurés, suivant un corpus méthodologique bien balisé dans les études d'écotoxicologie. Cette approche ne doit pas se limiter aux risques *stricto sensu* mais prendre en compte les solutions que les nanotechnologies sont susceptibles d'apporter aux grands défis du développement durable (réduction de l'écopollution, filtres fonctionnalisés...). Ceci soulève d'ailleurs la question de l'évaluation de l'utilité sociale des nanotechnologies, dont les modalités sont à définir. Enfin, suite aux différentes crises environnementales et sanitaires telles que l'amiante, la vache folle ou le sang contaminé, la société civile peut se poser des questions sur les technologies. Suite à cela, les citoyens et les associations, demandent à prendre part aux décisions concernant les sciences et les technologies. Cependant, dans le cas des nanotechnologies, la société civile ne présente pas d'inquiétude car les dangers de ces technologies demeurent encore très méconnus. Elles bénéficient d'une image toujours positive. Cependant, les associations restent très vigilantes et les inquiétudes sur les risques des nanotechnologies viennent d'abord des experts avant d'être reprises par la société civile et les autorités publiques. Le premier débat public sur les nanotechnologies a eu lieu en France en 2010 où les pros et les antis se sont affrontés. Certains sociologues comme Brice Laurent se sont interrogés sur les modes de gestion de cette science nouvelle aux impacts sanitaires et environnementaux incertains. Le débat reste encore d'actualité et ces nouvelles technologies ouvrent un champ de recherche important sur la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules.

C'est dans ce contexte que la « nanotoxicologie » (Oberdörster *et al.*, 2005) et la « *plant nanotoxicology* » (Dietz et Herth, 2011) sont apparues comme de nouvelles disciplines qui prennent tout leur sens.

Au cours de ces dernières décennies, des travaux de recherche se sont intéressés aux effets de la pollution atmosphérique en développant différents modèles dans le cadre d'études de toxicité et d'écotoxicité. Notamment, dans les années 1970, des bio-indicateurs (aiguilles de conifères, lichens, etc.) étaient utilisés comme de véritables outils de diagnostic de pollution atmosphérique (Van Haluwyn *et al.*, 2011). Ces années étaient caractérisées par une pollution de quelques contaminants majeurs. Mais à partir

des années 1980, le contexte réglementaire a transformé cette dernière en pollution de fond multiforme. Les scientifiques se sont vite aperçus qu'il était essentiel d'adapter l'outil biologique à cette pollution atmosphérique de fond. En 2002, Garrec et Van Haluwyn ont défini la notion de biosurveillance comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour suivre l'évolution ». Les études de biosurveillance permettent, encore aujourd'hui, d'acquérir une meilleure connaissance des effets de la pollution par l'utilisation d'espèces sentinelles. Parallèlement, de nombreux travaux en sciences environnementales ont montré que les bryophytes sont d'excellentes sentinelles de la qualité de l'air (bons accumulateurs d'ETM, standardisation des normes AFNOR et CEN, espèces pionnières colonisatrices de sols, etc.). Ainsi, leur utilisation comme modèles biologiques nous a semblé tout à fait indiquée pour étudier les effets des particules fines et ultra-fines dispersées par voie atmosphérique.

Les contaminants particuliers présents dans l'air n'impactent pas uniquement les écosystèmes mais aussi la population humaine, par l'intermédiaire de la fonction respiratoire (voie majeure d'exposition). En effet, leur inhalation contribue à leur transfert rapide vers le poumon, leur taille leur permet d'atteindre le poumon profond, pour les plus petites d'entre-elles, et de se transférer de façon systémique à l'ensemble de l'organisme humain. Des études récentes ont ainsi mis en évidence que l'exposition aux polluants atmosphériques particuliers est associée à un risque accru de morbidité et de mortalité liées à des maladies respiratoires et cardiovasculaires (Corbo *et al.*, 1993 ; Ostro *et al.*, 1993 ; Schwartz, 1994 ; Gamble *et al.*, 1996 ; Spuny, 1998 ; Abbey *et al.*, 1999 ; Künzli *et al.*, 2000 ; Brunekreef et Holgate, 2002 ; Hoek *et al.*, 2002 ; Aga *et al.*, 2003 ; Jerrett *et al.*, 2005 ; Gutiérrez *et al.*, 2006 ; Viegi *et al.*, 2006 ; Dominici *et al.*, 2007 ; Pui *et al.*, 2008 ; Pope *et al.*, 2009). Avec la complexité de l'arbre trachéo-bronchique, les particules ultra-fines et nanoparticules inhalées sont en contact régulier avec les cellules de l'épithélium bronchique et donc susceptibles, à terme, de favoriser l'émergence de pathologies inflammatoires chroniques (asthme, BPCO, etc.).

Face à ce contexte de pollution nanoparticulaire, nous souhaitons étudier les effets des particules ultra-fines sur les écosystèmes et la santé humaines. Pour cela, nous avons décidé de travailler avec des nanoparticules manufacturées mais représentatives de la pollution nanoparticulaire dunkerquoise. Nous avons ainsi choisi des nanoparticules manufacturées de fer fabriquées par le laboratoire « Métaux et céramiques à microstructures contrôlées » de l'Institut de Chimie des Matériaux de Paris-Est (UMR 7182) qui sont représentatives de celles des fumées émises par les industries métallurgiques (Hervé-Bazin, 2007). Puis, il est important de noter que les études relatives aux effets toxiques des particules ultra-fines et/ou nanoparticules nécessitent une approche pluridisciplinaire physico-chimique, toxicologique voire écotoxicologique. Ainsi, la caractérisation des nouvelles propriétés de ces

nanoparticules comme leur taille, leur surface spécifique, leur réactivité est indispensable pour mener convenablement des études de toxicité et d'écotoxicité. Puis, notre stratégie de recherche nous a conduit à mener en parallèle des études d'écotoxicité sur un modèle bryophytique (*Physcomitrella patens*) et des études de toxicité sur un modèle cellulaire humain (cellules épithéliales bronchiques humaines). Finalement, pour mener à bien ces travaux de recherche, une caractérisation physico-chimique et surfacique fine des nanoparticules manufacturées de fer dans les différents milieux d'exposition, était fondamentale, tout comme la vérification préalable de leur internalisation au sein des cellules de nos modèles avant d'en rechercher les impacts en conditions contrôlées. Puis, nos travaux se sont principalement focalisés sur la recherche de différents biomarqueurs d'exposition et d'effet impliqués dans la réponse au stress oxydant (espèces réactives de l'oxygène, glutathion, malondialdéhyde, génotoxicité, etc.) ainsi que sur la mesure de la modulation de l'expression génique.

Ces recherches nous permettront de mieux mettre en évidence et parfois caractériser certains effets de ces aéro-contaminants manufacturés de fer de taille nanoparticulaire et de mieux aborder la problématique encore plus complexe des nanoparticules environnementales. Nos travaux contribueront également au développer de nouvelles méthodes de biosurveillance adaptées à ces aéro-contaminants nanoparticulaires. Nous espérons ainsi pouvoir développer des indicateurs adaptés à cette problématique et être capables, dans le cadre d'études de santé-environnement, d'alerter de façon précoce du danger que ces dernières sont susceptibles de représenter.

1. Références bibliographiques

- Abbey, D.E., Nishino N., Mcdonnell, W.F., Burchette, R.J., Knutsen, S.F., Lawrence Beeson, W. & Yang, J.X.** 1999. Long term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(2): 373-382.
- Aga, E., Samoli, E., Touloumi, G., Anderson, H.R., Cadum, E., Forsbergz, B., Goodman, P., Goren, A., Kotesovec, F., Kriz, B., Macarol-Hiti, M., Medina, S., Paldy, A., Schindler, C., Sunyer, J., Tittanen, P., Wojtyniak, B., Zmirou, D., Schwartz, J. & Katsouyanni, K.** 2003. Short term effects of ambient particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur Respir J Suppl*, 40: 28-33.
- Brauer, M., Amann, M., Burnett, R.T., Cohen A., Dentener, F., Ezzati, M., Henderson, S.B., Krzyzanowski, M., Martin, R.V., Van Dingenen, R., Van Donkelaar, A. & Thurston, G. D.,** 2012. Exposure assessment for estimation of the global burden of disease attributable to outdoor air pollution. *Environmental Science and Technology*, 46(2): 652–660; DOI: 10.1021/es2025752.
- Brunekreef, B. & Holgate, S.T.** 2002. Air pollution and health. *Lancet*, 360(9341): 1233-1242.
- Buseck, P.R. & Adachi, K.** 2008. Nanoparticles in the atmosphere. *Elements*, 4: 389-394.
- Comité de la Prévention et de la Précaution,** 2006. Nanotechnologies, nanoparticules - Quels dangers, quels risques ?. Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris, 64p.
- Corbo, G.M., Forastiere, F., Dell'orco, V., Pistelli, R., Agabiti, N., De Stefanis, B., Ciappi, G. & Perucci, C.A.** 1993. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol*, 92(4): 616-623.
- Dallmann, T.R., De Martini, S.J., Kirchstetter, T.W., Herndon S.C., Onasch T.B., Wood, E.C. & Harley, R.A.** 2012. On-road measurement of gas and particle phase pollutant emission factors for individual heavy-duty diesel trucks. *Environmental Science and Technology*, 46(15): 8511–8518 ; DOI: 10.1021/es301936c.
- Dietz, K.J. & Herth, S.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11): 582-589.
- Dominici, F., Peng, R.D., Zeger, S.L., White, R.H. & Samet, J.M.** 2007. Particulate air pollution and mortality in the United States: did the risks change from 1987 to 2000? *Am J Epidemiol*, 166(8): 880-808.

- Fabure, J., Meyer, C., Denayer, F., Gaudry, A., Gilbert, D. & Bernard, N.** 2010. Accumulation Capacities of Particulate Matter in an Acrocarpous and a Pleurocarpous Moss Exposed at Three Differently Polluted Sites (Industrial, Urban and Rural). *Water Air Soil Pollution*, 212: 205-217.
- Gamble, J.F. & Lewis R.J.** 1996. Health and respirable particulate (PM10) air pollution: a causal or statistical association? *Environ Health Perspect*, 104(8): 838-850.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E. & Shirali, P.** 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology in vitro*, 20: 519-528.
- Garrec, J-P. & Van Haluwyn, C.** 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. TechetDoc., Lavoisier, Paris, 116p.
- Gombert, S., Galsomies L., Rausch De Traubenberg, C., Leblond, S., Losno, R., Colin J.L. & Charre, B.** 2005. Pollution atmosphérique par les métaux, Biosurveillance des retombées. EDP sciences/ADEME, LesUlis.
- Gutierrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrian-Garcia, M.E., De Vizcaya-Ruiz, A., Sordo-Cedeño, M. & Ostrosky-Wegman, P.** 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen*, 47: 199-211.
- Hervé-Bazin, B.** 2007. Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?. EDP Sciences.
- Hoek, G., Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P. & Van Den Brandt, P.** 2002. Association between mortality and indicators of traffic related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*, 360(9341): 1203-1209.
- Jerrett, M., Buzzelli, M., Burnett, R.T. & Deluca, P.F.** 2005. Particulate air pollution, social confounders, and mortality in small areas of an industrial city. *Soc Sci Med*, 60(12): 2845-2863.
- Kim, K.H., Jahan, S. A. & Kabir, E.** 2013. A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma. *Environment International*, 59: 41-52.

- Künzli, N., Kaiser, R., Medina, S., Studnicka, M., Chanel, O., Filliger, P., Herry, M., Horak, F. Jr, Puybonnieux-Texier, V., Quenel, P., Schneider, J., Seethaler, R., Vergnaud, J.C. & Sommer, H., 2000.** Public health impact of outdoor and traffic related air pollution: a European assessment. *Lancet*, 356(9232): 795-801.
- Lamaison, L. 2006.** Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
- Ledoux F. 2003.** Les aérosols particulaires atmosphériques sur le Dunkerquois: caractérisations chimiques, physiques, spectroscopiques et évaluation de leur toxicité. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque.
- Mariet, C., Gaudry, A., Ayrault, S., Moskura, S., Denayer, F. & Bernard, N. 2011.** Heavy metal bioaccumulation by the bryophyte *Scleropodium purum* at three French sites under various influences: rural conditions, traffic, and industry. *Environ Monit Assess*, 174: 107–118.
- Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure, J. & Bernard, N. 2010.** Relationship of atmospheric pollution characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to microbial communities living in bryophytes at three differently polluted sites (rural, urban, and industrial). *Microbial Ecology*, 59: 324–334; DOI 10.1007/s00248-009-9580-2.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D. 2007.** Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. 2005.** Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, 113: 823–839.
- Ostro, B.D., Lipsett, M.J., Mann, J.K., Krupnick, A. & Harrington, W. 1993.** Air pollution and respiratory morbidity among adults in southern California. *Am J Epidemiol*, 137(7): 691-700.
- Pateraki, St., Assimakopoulos, V.D., Maggos, Th, Faneli, K.M., Kotroni, V. & Vasilakos, Ch. 2013.** Particulate matter pollution over a Mediterranean urban area. *Science of the Total Environment*, 463–464: 508–524.

- Pope, C.A. 3rd, Ezzati, M. & Dockery, D.W.** 2009. Fine particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*, 360(4): 376-386.
- Pui, D.Y., Qi, C., Stanley, N., Oberdörster, G. & Maynard A.** 2008. Recirculating air filtration significantly reduces exposure to airborne nanoparticles. *Environ Health Perspect*, 116: 863–866.
- Schwartz J.**, 1994. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ Res*, 64(1): 36-52.
- Spurny, K.R.** 1998. On the physics, chemistry and toxicology of ultrafine anthropogenic, atmospheric aerosols (UAAA): new advances. *Toxicol Let*, 96-97: 253-261.
- Tagliari De Brito, K.C., Torres De Lemos, C., Vaz Rocha, J.A., Mielli, A.C., Matzenbacher, C. & Ferrão Vargas, V. M.** 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM2.5) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 14–20.
- Van-Haluwyn, C., Cuny, D. & Garrec, J.P.** 2011. Définitions, concepts et enjeux généraux de la biosurveillance de la qualité de l'air. *Pollution atmosphérique*. Numéro spécial: 7-12.
- Viegi, G., Maio, S., Pistelli, F., Baldacci, S. & Carrozzi, L.** 2006. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology*, 11(5): 523-532.

CHAPITRE 1 - ETAT DE L'ART

Chapitre 1 – Etat de l’art

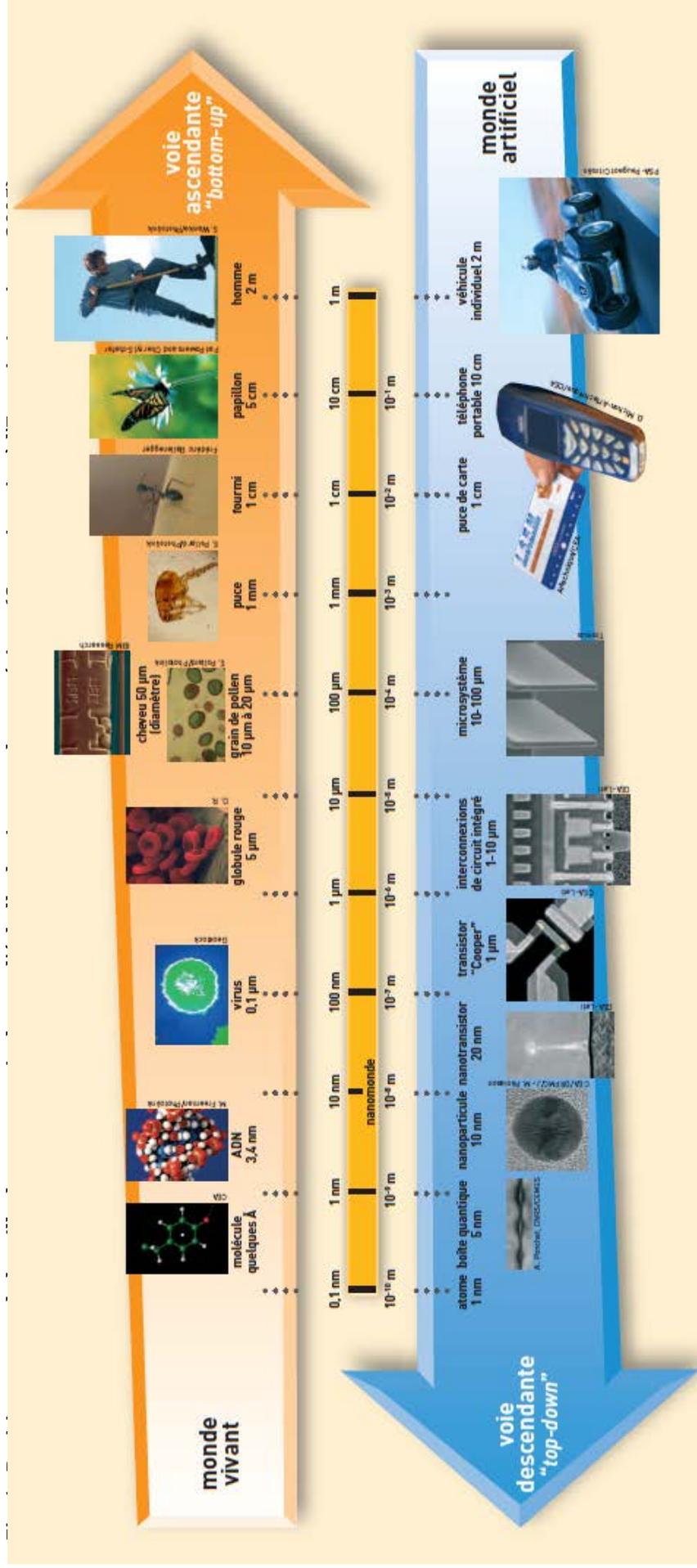
1. Les nanoparticules et nanomatériaux

1.1. Définition

A ce jour, il n'existe de consensus sur la définition de nanoparticules ou nanomatériaux. Cependant, les nanoparticules sont couramment définies comme des particules ayant au moins une de leurs dimensions inférieure à 100 nm. L'INERIS (2007) parle classiquement de nano-objets pour désigner des nanoparticules ou particules ultrafines inférieures à 100 nanomètres, des nanotubes, des nanofibres, des nanofilaments, nano-objets cylindriques dont une seule dimension peut-être supérieure à 100 nanomètres mais dont le diamètre va de un à quelques dizaines de nanomètres et des nanofilms, nanocouches dont deux dimensions sont supérieures à 100 nanomètres, mais dont l'épaisseur va de un à quelques dizaines de nanomètres. A l'échelle du monde vivant, les nanoparticules se situent entre l'hélice d'ADN (3,4 nm) et un virus (100 nm) (figure 1).

Les nano-objets ont été définis par la norme ISO TS 27687 (Nanotechnologies – Terminologie et définitions relatives aux nano-objets – nanoparticule, nanofibre et nanoplat), publiée à la fin du mois de septembre 2008. Plus récemment, la Commission européenne a finalement adopté, le 18 octobre 2011, la recommandation concernant la définition des nanomatériaux :

- ❖ « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. »
- ❖ « De plus, dans des cas spécifiques et lorsque cela est justifié par un souci pour l'environnement, la santé, la sécurité ou la compétitivité, le seuil de distribution de taille de 50 % peut être remplacé par un seuil compris entre 1 et 50 %.
- ❖ Par dérogation à ce qui précède, les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi unique avec une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm devraient être considérées comme des nanomatériaux. » (Communauté Européenne, 2011).



La terminologie de matériaux de taille nanométrique est donc complexe. Et, les nanoparticules manufacturées présentent des caractéristiques chimiques bien définies donc doivent être distingués des nanoparticules ambiantes (naturelles et anthropiques) qui peuvent être composées de constituants divers. Selon Oberdörster *et al.* (2005), le terme « particules de taille nanométrique » ou « *nano-sized particles* » (NSP) peut être utilisé pour l’ensembles des nanoparticules manufacturées et environnementales, le terme « nanoparticules » (NP) sera plutôt employé pour désigner les nanoparticules manufacturées et le terme « particules ultrafines » plutôt pour les nanoparticules environnementales.

1.2. Les sources

Les nanoparticules peuvent être produites par différentes sources, naturelles, anthropiques ou être produites intentionnellement par l’Homme (nanoparticules manufacturées).

La production naturelle de nanoparticules se caractérise par les poussières minérales, les éruptions volcaniques, l’érosion éolienne, les particules d’origines marines, etc.

Aux émissions naturelles viennent s’ajouter les nanoparticules anthropiques, dont les combustions de gazole (diesel) et d’essence des véhicules automobiles, l’utilisation de combustibles domestiques solides (charbon, lignite et biomasse) et les procédés industriels représentent les principales sources (Fontan *et al.*, 2005). Ces nanoparticules d’origine naturelle et/ou anthropique se retrouvent mélangées dans l’atmosphère et sont souvent désignées sous le nom de particules ultrafines.

Les nanoparticules atmosphériques ont des tailles polydispersées, allant de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres. (Comité de la prévention et de la précaution, 2006).

Enfin, les nanoparticules peuvent être produites intentionnellement par l’homme par le biais des nanotechnologies. Ces nanoparticules manufacturées correspondent en général à des particules dont la fraction granulométrique est monodispersée. Selon leur nature et leur forme nous distinguons différentes catégories (selon le Comité de la prévention et de la précaution, 2006) :

- ❖ les nano objets de forme et taille contrôlées conçus pour remplir une fonction (ex. : les dendrimères, polymère de structure bien définie) ;
- ❖ les métaux, semi-conducteurs, oxydes métalliques, carbone, polymères composites ;
- ❖ les céramiques ;
- ❖ les nanosphères, fils, aiguilles, tubes, enveloppes, anneaux, plaquettes (ex. : nanotubes de carbone) ;
- ❖ les molécules (fullerènes) et complexes ;

❖ les agrégats moléculaires ou atomiques non traités ou enrobés (nanotechnologie appliquée à de nombreux produits : cosmétiques, médicaments, textiles, électronique, optique, afficheurs, etc.) :

- matériaux nanostructurés ;
- matériaux mésoporeux (zéolites artificielles) ;
- nanomatériaux greffés ;
- nanomatériaux interactifs (ou intelligents).

Dans l’ensemble des pays industrialisés, nous assistons à un essor considérable des nanosciences et des nanotechnologies. En effet, elles constituent un champ de recherche et de développement pluridisciplinaire en pleine croissance. Les nanotechnologies sont d’ores et déjà largement utilisées dans les domaines de l’informatique et de l’électronique. Le marché actuel des nanotechnologies est réparti sur plusieurs secteurs d’activités (tableau 1). Nous pouvons citer l’électronique qui occupait en 2007, 30% du marché, la pharmacie (18%), la chimie (10%), etc. Le domaine d’activité le plus important est celui des nanomatériaux, qui représentait à la même période 34% du marché (INERIS, 2007). La figure 2 présente la répartition du marché mondial de ces nanotechnologies en 2010.

Tab. 1 : Application des nanotechnologies et des nanomatériaux en fonction des secteurs d’activité (INRS, 2012)

Secteurs d’activité	Exemples d’applications actuelles et potentielles
Automobile, aéronautique et aérospatial	Matériaux renforcés et plus légers; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, antirayures, anticorrosion et antisalissures; capteurs optimisant les performances des moteurs; détecteurs de glace sur les ailes d’avion; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion; pneumatiques plus durables et recyclables
Électronique et communications	Mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés; cellules solaires; bibliothèques électroniques de poche; ordinateurs et jeux électroniques ultrarapides; technologies sans fil; écrans plats
Agroalimentaire	Emballages actifs; additifs: colorants, antiagglomérants, émulsifiants
Chimie et matériaux	Pigments; charges; poudres céramiques; inhibiteurs de corrosion; catalyseurs multifonctionnels; textiles et revêtements antibactériens et ultrarésistants
Construction	Ciments autonettoyants et antipollution, vitrages autonettoyants et antisalissures; peintures; vernis; colles; mastics
Pharmacie et santé	Médicaments et agents actifs; surfaces adhésives médicales antiallergènes; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis; surfaces biocompatibles pour implants; vaccins oraux; imagerie médicale
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes; pâtes à dentifrice abrasives; maquillage avec une meilleure tenue
Énergie	Cellules photovoltaïques nouvelle génération; nouveaux types de batteries; fenêtres intelligentes; matériaux isolants plus efficaces; entreposage d’hydrogène combustible
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone; production d’eau ultrapure à partir d’eau de mer; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables; analyseurs chimiques spécifiques
Défense	Détecteurs d’agents chimiques et biologiques; systèmes de surveillance miniaturisés; systèmes de guidage plus précis; textiles légers et qui se réparent d’eux-mêmes

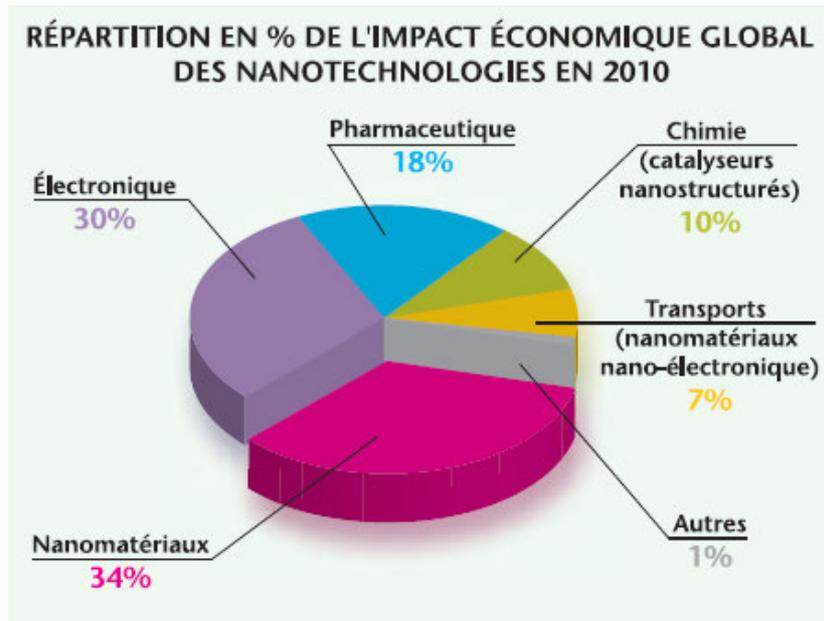


Fig. 2 : Répartition en pourcentage de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 dans le monde (INERIS, 2007)

Parmi les types de produits les plus cités contenant des nanoparticules, nous pouvons trouver les vêtements, les accessoires sportifs, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle. Nous recensons également des jouets, des appareils électroniques et informatiques, des matériaux de construction et d'ameublement (figure 3) (Larue, 2011).



Fig. 3 : Exemples de produits contenant des nanomatériaux (Larue, 2011)

1.3. Nanoparticules et pollution atmosphérique

1.3.1. Généralités

L'air, indispensable à la vie, peut être modifié par divers éléments qui sont susceptibles d'être nuisibles à la santé humaine et aux écosystèmes, dans ce cas, nous pouvons parler d'air pollué. La loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (LAURE) de 1996 définit la pollution atmosphérique comme étant "l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives".

L'atmosphère est un mélange de gaz et de particules d'origines minérale et organique. Les différents types de polluants atmosphériques et les niveaux de pollution dépendent de plusieurs facteurs, comme les sources d'émission, les paramètres physiques et les conditions météorologiques (Meyer *et al.*, 2010). Ainsi, l'air peut être plus ou moins contaminé par des polluants gazeux, liquides ou solides d'origine naturelle (comme les émissions volcaniques et océaniques, les plantes produisant des pollens, etc.) ou d'origine anthropique provenant des transports, de l'industrie, du chauffage des bâtiments, de l'agriculture, de l'incinération des déchets, etc. Après être émis dans l'atmosphère, les différents polluants vont interagir, être transformés et même dispersés dans l'air sur de plus ou moins longues distances (figure 4). En effet, en suivant les masses d'air, la pollution tend à se disperser par mélange et par diffusion, contribuant à diminuer sa concentration. Elle subit aussi un processus d'auto-épuration de certains de ces éléments, notamment ceux qui présentent la plus grande réactivité (dépôt sec par captation, dépôts humides par lessivage, condensation). Au final, la qualité de l'air résulte d'un équilibre complexe entre les apports de pollution et les phénomènes de dispersion et de transformation dans l'environnement.

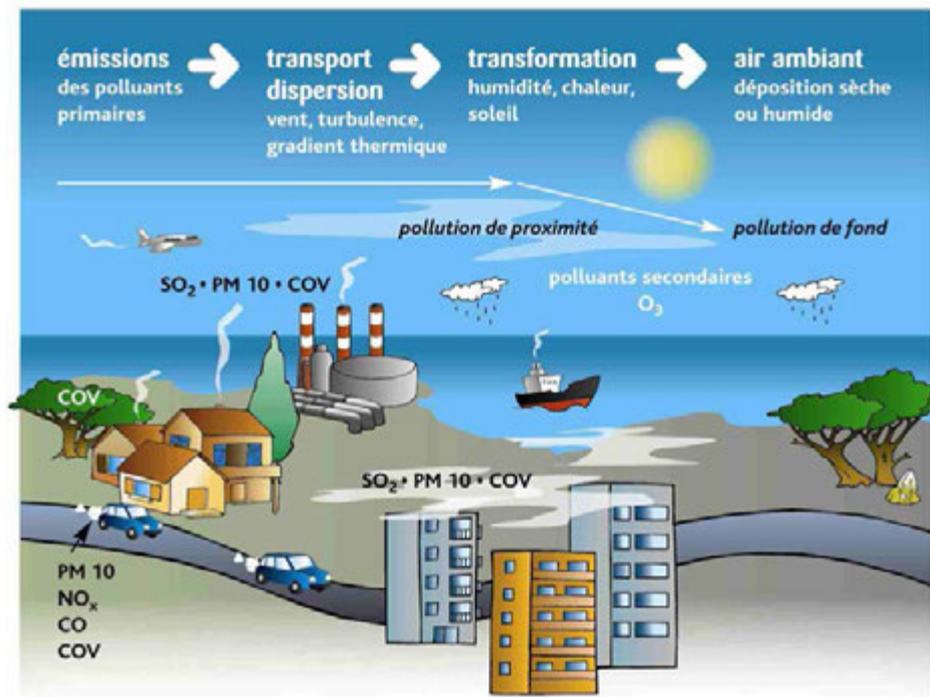


Fig. 4 : Différentes sources et voies de transfert des polluants dans l'atmosphère (<http://www.airfobep.org/pollution-atmospherique.html>)

Les politiques actuelles portent une attention toute particulière à la surveillance de la qualité de l'air. Cependant, les polluants atmosphériques étant très nombreux, tous ne peuvent être suivis. Certains servent d'indicateurs de pollution atmosphérique car ils sont caractéristiques d'un type de pollution et pour leurs effets nuisibles pour l'environnement et la santé humaine. Les particules en suspension ou PM (particulate matters) constituent un de ces indicateurs de pollution. Les PM sont des particules fines, invisibles à l'œil nu, qui sont constituées :

- ❖ des particules PM₁₀ dont la taille est inférieure à 10 µm ;
- ❖ des particules PM_{2,5} dont la taille est inférieure à 2,5 µm ;
- ❖ des particules PM₁ dont la taille est inférieure à 1 µm ;
- ❖ et des particules ultra-fines ou nanoparticules dont la taille est inférieure à 100 nm.

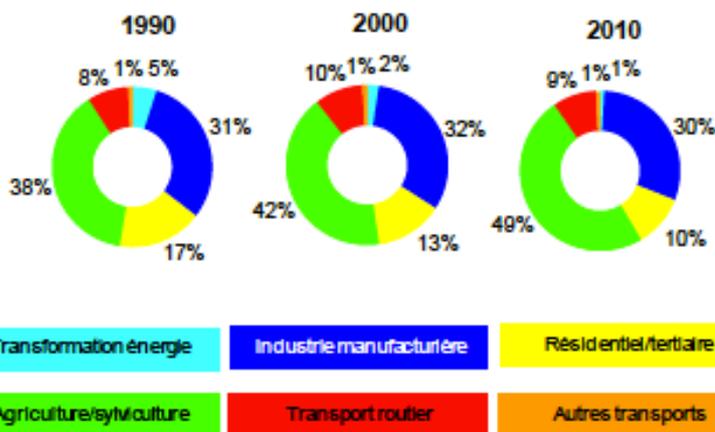
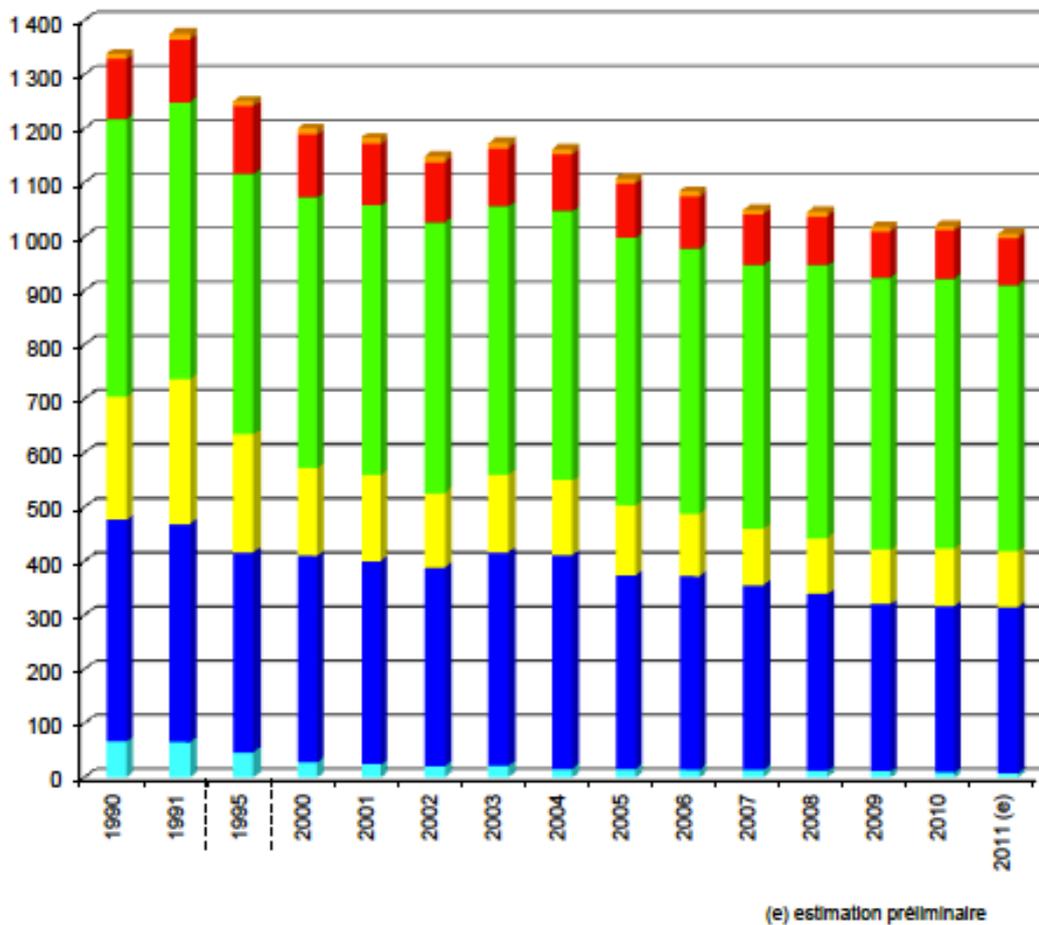


Fig. 5 : Emissions atmosphériques de particules totales en suspension ou TSP (*Total Suspended Particles*) par secteur d’activité en France métropolitaine (en kt) (CITEPA, 2012)

Ces particules fines et ultra-fines proviennent de rejets directs dans l’atmosphère, de la remise en suspension des particules déposées au sol et par la transformation chimique des gaz. Ces PM sont soit d’origine naturelle ou anthropique. Les principales sources naturelles de particules sont terrigènes (envol de poussières du sol, érosion des roches), marines, biogéniques (pollens, spores) ou liées à la combustion (feux de forêt et éruptions volcaniques). Le vent, par érosion, peut mettre en suspension des particules de sol ou de roche (Lamaison, 2006). Concernant les sources anthropiques d’émission de particules, nous pouvons citer :

- ❖ l’agriculture-sylviculture (pesticides, engrais, labours) ;
- ❖ l’industrie manufacturière (chimie, construction, agro-alimentaire, métallurgie, cimenteries, cokeries, traitement des déchets) ;
- ❖ le résidentiel et tertiaire (combustion du bois, charbon et fioul, utilisation de peintures, etc.) ;
- ❖ les transports (automobile, ferroviaire, fluvial, maritime et aérien) ;
- ❖ et la transformation d’énergie (production d’électricité, raffinage pétrole) (Lamaison, 2006).

Le CITEPA¹ est le Centre Interprofessionnel Technique d’Etudes de la Pollution Atmosphérique qui publie chaque année des inventaires d’émission de particules en France. En 2010, les émissions de particules totales en suspension (TSP) s’élèvent à 1020 kt (figure 5). Parmi les secteurs émetteurs en 2010, il s’agit par ordre d’importance de :

- ❖ l’agriculture/sylviculture avec 49% des émissions de la France métropolitaine en 2010 (499 kt), notamment du fait des cultures qui représentent 82 % du secteur ;
- ❖ l’industrie manufacturière avec 30 % (308 kt), notamment du fait de la construction, avec les chantiers et le BTP qui représentent 47,4 % du secteur ;
- ❖ le résidentiel/tertiaire (10 %) du fait de la consommation de bois ;
- ❖ le transport routier (9 %) (CITEPA, 2012).

¹ Centre Interprofessionnel Technique d’Etudes de la Pollution Atmosphérique (www.citepa.org)

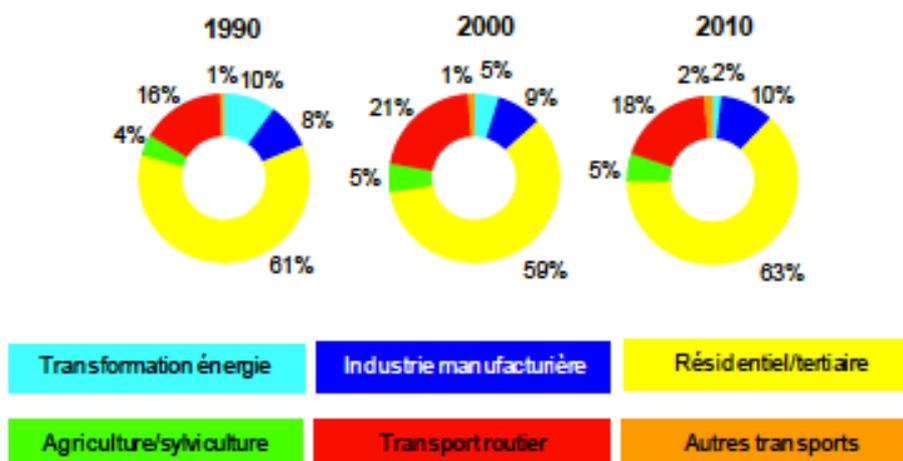
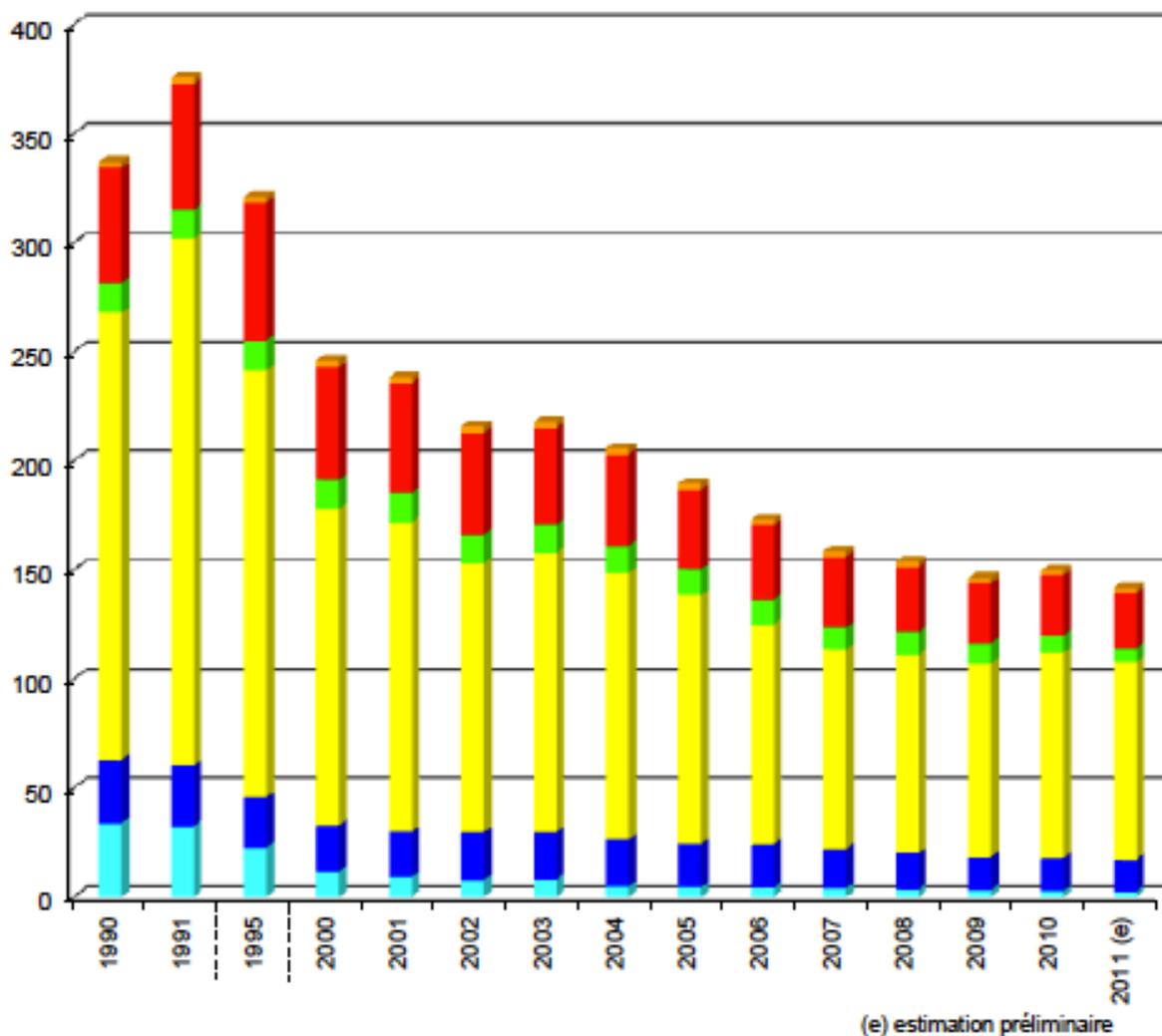


Fig. 6 : Emissions atmosphériques de PM₁ par secteur d’activité en France métropolitaine (en kt) (CITEPA, 2012)

1.3.1. Les particules fines et les nanoparticules dans le compartiment atmosphérique de sites industriels

Actuellement, il n’y a pas de suivi spécifique des nanoparticules ou particules ultra-fines dans l’atmosphère, mais les particules dont le diamètre est inférieur à 1 micron (PM₁) sont suivies. Selon le CITEPA, les émissions totales de la France métropolitaine de PM₁ atteignent en 2010 le niveau de 150 kt. Les émissions (figure 6) sont engendrées majoritairement par le résidentiel/tertiaire avec 63 % des émissions de la France métropolitaine, en 2010, à cause principalement de la combustion du bois et, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul. En 2010, le transport routier se situe, en 2010, en seconde position avec 18 %, essentiellement du fait de la combustion du gazole. La contribution des autres secteurs aux émissions de PM₁ en 2010 est de 10 % pour l’industrie manufacturière, de 5 % pour l’agriculture/sylviculture, de 1 % pour la transformation d’énergie et de 2 % pour les autres transports (hors transport routier).

Tab. 2 : Comparaison des concentrations élémentaires moyennes dans les PM₁₀ (ng.m⁻³) (Lamaison, 2006)

Site d'étude	(Lamaison, 2006) Dunkerque, France	(Robache, 2000) Hénin-Beaumont, France	(Le Floch, 2004) France, Toulon, urbain	(Querol <i>et al.</i> , 2002) Agglomération de Barcelone, Espagne	(Voutsas <i>et al.</i> , 2002) Thessaloniki, Grèce	(Zheng <i>et al.</i> , 2004) Shanghai, Chine
Période	juin 2003-février 2005	1998-1999	2001-2002	juin 1999-juin 2000		Nov. 2001-Jan. 2002
Al	270		207,6			
As	5,09		1,02		2,4	42,1
Ba	6,8	32,4	8,4	38		2479
Ca	862	366	1340,4	2250		9634
Cd	1,32	1,7	0,46		0,9	10,9
Co	0,55				2,4	2,8
Cu	12,6	13,7	19,1	74	36	171
Fe	977	308	577,3	890	2159	2690
K	674	189	137,4	560	836	3331
Mg	242	117	145,8	290		1984
Mn	147	9,5	13,5	24	28	186
Na	1550	1036	1361,6	940	573	1257
Ni	12,4			7	11	13,9
Pb	37,4	69,5	7,5	149	62	515
S	1784	1439				6461
Sb	2,3		3,4		3,2	22,7
Sr	3,31	1,9		7		33,2
Ti	27	41,6	6,2	50		221
V	18,5	6,1	6,9	13	39	17,6
Zn	80	99,9	78,6	250	212	1409

Tab. 3 : Tableau récapitulatif sur les émissions de la source sidérurgie (Lamaison, 2006)

Atelier ou échantillon	Eléments majeurs	Eléments traces
Charbon	C, Al, Ca, S, Si, Ti	
Cokerie	C, Al, Ca, S, Si, Ti	Ag, Bi, Cd, Cu, Cs, Pb et Rb
Minerai	Fe	
Agglomération	Fe, Ca	Ag, Bi, Cd, Cu, Cs, Pb et Rb
Aciérie	Fe	

Ainsi, les particules atmosphériques issues de retombées industrielles représentent une source importante de pollution atmosphérique (Ledoux, 2003; Garçon *et al.*, 2006 ; Meyer *et al.*, 2010). Les particules émises dans l’environnement ont une large gamme de taille et durant ces dernières décennies, la proportion des particules fines a augmenté avec l’utilisation dans l’industrie de filtres plus efficaces (Muller *et al.*, 2007). De plus, l’emploi de particules ultra-fines et de nanoparticules s’est considérablement développé ces dernières années. Dans le cadre de notre travail, nous nous intéresserons à la partie la plus fine des particules atmosphériques que sont les particules ultra-fines ou nanoparticules émises dans un contexte industriel. Le site industrialo-portuaire de Dunkerque est un site d’études privilégié de la région Nord Pas de Calais qui se caractérise par la présence de nombreuses industries émettrices de particules et de particules ultra-fines. Actuellement, peu de chercheurs se sont intéressés à la métrologie des nanoparticules. Des études (Choel, 2005 ; Lamaison, 2006 ; Rimetz, 2007) donnent cependant des informations sur la nature et les concentrations de particules (PM₁₀, PM_{2,5}) présentes dans l’atmosphère de sites industriels comme le site industrialo-portuaire de Dunkerque (tableau 2). Lors d’une première approche de la caractérisation des particules atmosphériques du littoral dunkerquois, Ledoux (2003) avait pour projet de caractériser la charge particulaire de l’atmosphère de Dunkerque, d’évaluer l’influence des émissions de l’environnement urbano-industriel et d’appréhender l’étude de leur toxicité. Les particules collectées sur deux sites de l’agglomération dunkerquoise ont été analysées pour les éléments Na, Mg, Ca, Al, Cu, Fe, K, Mn, Pb, Sr, Ti et Zn. Cette étude a montré notamment que les teneurs en métaux sont plus importantes en hiver qu’en été. L’étude des concentrations moyennes par secteur de vent indique que les activités industrielles entraînent des concentrations atmosphériques plus importantes en Al, Ba, Fe, Pb et Ti l’été et en Fe et Mn l’hiver. Les vents passant par la ville de Dunkerque, de vitesses très faibles et accompagnés de conditions anticycloniques, entraînent une pollution plus importante. De même que pour l’étude de Badol, Ledoux a mis en évidence l’importance des directions locales de vent sur les concentrations en polluants (Lamaison, 2006). Lamaison (2006) a établi des profils d’une source «sidérurgie» (tableau 3). En effet, l’usine sidérurgique est la principale source de particules de l’agglomération de Dunkerque. Selon ce profil, le pourcentage de fer est important et fait partie des éléments majeurs retrouvés dans les rejets de cette industrie.

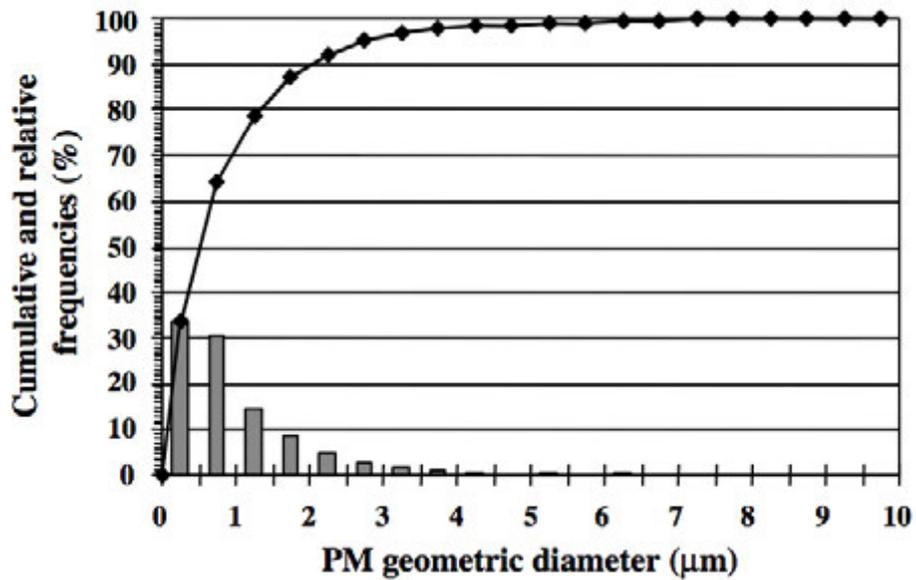


Fig. 7 : Distribution de taille des particules collectées à Dunkerque. La courbe représente la fréquence cumulative (%) et l’histogramme représente la fréquence relative (%) (Garçon *et al.*, 2006)

Tab. 4 : Composants détectés dans les particules (Garçon *et al.*, 2006)

Inorganic compounds detected in PM	
Inorganic compounds	Concentrations (% w/w)
Fe	7.84
Al	5.83
Ca	4.95
Na	1.88
K	0.97
Mg	0.81
Pb	0.80
Ti	0.51
Mn	0.352
Zn	0.184
Ba	0.064
Cu	0.037
Cr	0.032
V	0.030
Ni	0.029
Sr	0.022
Li	0.011
Mo	0.004
Cd	<0.001
Co	<0.0006

Il faut cependant noter que ces échantillons n’ont pas été prélevés directement à la source, c’est-à-dire à la sortie des cheminées ou dans les panaches d’émission, mais au niveau du système de filtration des différents ateliers pour les ateliers d’agglomération du minerai et d’aciérie. Ils correspondent en fait à ce qui est retenu et non pas à ce qui est émis ; Lamaison (2006) suppose toutefois que les particules émises ont des profils physico-chimiques assez identiques aux particules retenues. Elle a également comparé ses résultats avec ceux obtenus lors de différentes études (tableau 2).

Ce tableau met en évidence la prépondérance du fer dans les prélèvements atmosphériques sur le site industrialo-portuaire de Dunkerque mais également lors d’autres études réalisées dans d’autres pays européens et du monde. En 2006, Garçon *et al.* se sont intéressés aux effets cytotoxiques, au stress oxydant et aux réponses inflammatoires au niveau des cellules épithéliales pulmonaires humaines (L132) en cultures induites par la pollution atmosphérique. Lors de cette étude, ils ont récupéré des particules au niveau d’un site industriel de Dunkerque à l’aide d’un impacteur en cascade. Puis, ces particules ainsi collectées ont pu être caractérisées au niveau de leur taille et de leur nature. Ainsi, 64,24 %, 92,15 % et 98,49 % des particules totales ont respectivement une taille égale ou inférieure à 1 μm , 2,5 μm et 5 μm . Le plus grand nombre des particules collectées ont une taille dont le diamètre géométrique est inférieur ou égal à 2,5 μm : 0-0,5 μm (33,63 %), 0,5-1,0 μm (30,61 %), 1,0-1,5 μm (14,33 %), 1,5-2,0 μm (8,69 %) et 2,0-2,5 μm (4,89 %) (figure 7). Leur surface spécifique était de 1 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. De plus, lors de cette étude, il a été mis en évidence que les éléments majoritairement collectés étaient Fe, Al, Ca, Na, K, Mg Pb et Ti. Le tableau 4 donne la liste des composés détectés dans les échantillons de particules.

L’engouement pour les nanotechnologies et la prise de conscience de la présence de diverses nanoparticules dans l’atmosphère a amené les scientifiques à s’interroger sur les dangers et les risques de ces contaminants sur l’environnement mais aussi la santé humaine.

1.4. Lien entre les propriétés des nanoparticules et leurs effets toxicologiques et écotoxicologiques

A cause de leurs propriétés particulières, il est nécessaire de caractériser du point de vue physico-chimique et surfacique les nanoparticules étudiées avant toutes études d’écotoxicité ou de toxicité (Jiang *et al.*, 2009 ; Card et Magnuson, 2010). Selon Card et Magnuson (2010), la qualité de l’expérimentation sur les nanoparticules et donc la qualité des résultats vont dépendre de 2 étapes. La première étape consiste en la validation de la fiabilité de l’étude. Pour cela, il est important de se baser sur la documentation, les méthodes, le matériel et les résultats déjà disponibles (Study score). Un logiciel est disponible pour faciliter cette évaluation. Il s’agit du logiciel ToxRTool (<http://ecvam.jrc.it/>). La seconde étape consiste à l’évaluation de la caractérisation des nanoparticules (Nanomaterial score). Pour cela, il est préconisé de caractériser les nanoparticules selon une liste de 10 critères principaux (Card et Magnuson, 2010) sélectionnés parmi les 59 critères définis par l’OCDE (2009). Ces 10 critères principaux sont les suivants :

- ❖ Agglomération et/ou agrégation ;
- ❖ Composition chimique ;
- ❖ Structure cristalline/cristallinité ;
- ❖ Taille des particules/distribution des tailles ;
- ❖ Pureté ;
- ❖ Forme ;
- ❖ Surface spécifique ;
- ❖ Charge de surface ou potentiel zeta ;
- ❖ Composition chimique de surface (incluant composition et réactivité) ;
- ❖ Et toute caractéristique mise en évidence lors de l’expérimentation.

La figure 8 présente le niveau de qualité de l’expérimentation en fonction des deux scores obtenus.

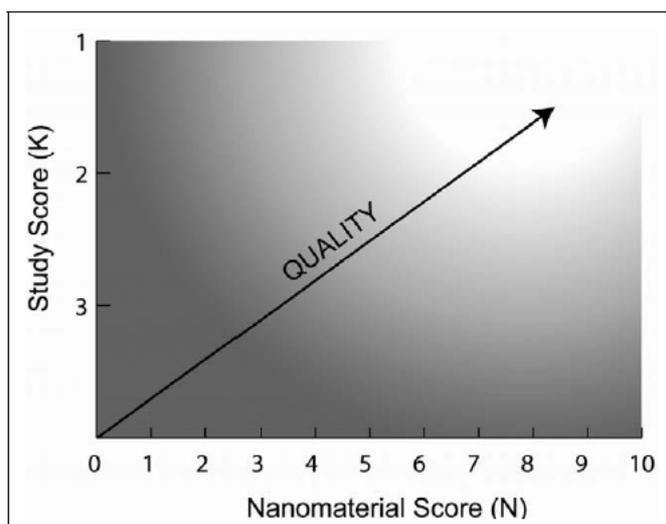


Fig. 8 : Représentation schématique de l’évaluation de la qualité globale d’une étude de toxicité des nanomatériaux sur la base des scores « nano étude ». La zone claire représente la gamme des scores pour lesquels une étude peut être considérée comme de bonne qualité globale ; à l’inverse, la zone ombrée représente la région dont la qualité globale est faible (Card et Magnuson, 2010).

Le *Study Score* est évalué en répondant à un questionnaire portant sur les conditions de l'expérimentation. Un questionnaire est adapté pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*. Cette méthode d'évaluation permet de valider une expérimentation du point de vue qualitatif.

Plusieurs caractéristiques de ces nanoparticules vont influencer leur toxicité et leur écotoxicité. Tout d'abord, les nanoparticules se situent par leur taille à une échelle moléculaire leur permettant d'interagir plus facilement avec les composants biologiques. La diminution de la taille facilite à la fois leur pénétration dans l'organisme, le passage d'un système (pulmonaire, digestif, nerveux) à l'autre via la circulation sanguine et/ou la voie lymphatique et la pénétration dans les cellules. Lorsque la taille décroît, nous parvenons à une frontière caractérisée par l'apparition de propriétés ou de comportements nouveaux. De plus, pour une même masse, plus la taille des particules diminue, plus leur nombre augmente. La forme de ces nanoparticules leur confère également des propriétés particulières. Les particules peuvent être sous forme de sphère, fibre, tube, feuille. Des études ont montré que les fibres étaient associées à un risque de fibrose pulmonaire et de cancer. Pour une même nature, la forme fibreuse est plus toxique que la forme sphérique. Un autre paramètre caractérisant les nanoparticules est la surface spécifique. Il s'agit de la surface totale de la particule normalisée par la masse. Ainsi, une particule de 10 nm de diamètre aura une surface spécifique 10 fois plus importante qu'une nanoparticule de 300 nm de diamètre. Cela représente une surface disponible 10 fois plus grande à masse égale pour interagir avec les membranes, les molécules biologiques ou les organites cellulaires. Certaines nanoparticules possèdent également une grande réactivité de surface, plus importante que celle des particules micrométriques. Les interactions nanoparticules/composants biologiques peuvent ainsi être plus importantes par unité de surface (Auffan, 2007). De plus, avec la diminution de leur taille, les particules voient la proportion de molécules en surface et leur rapport surface/volume augmenter. La figure 9 montre l'évolution de ces deux paramètres. Le modèle utilisé pour les besoins des calculs considère une particule sphérique constituée de molécules suivant une structure dense (Witschger et Fabriès, 2005). En analysant le graphique, nous constatons rapidement que les deux facteurs considérés augmentent de façon significative lorsque le diamètre de la particule diminue. Le SCENIHR (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, 2010) a ainsi défini le « *Volume Specific Surface Area* » (VSSA) comme un critère complémentaire pour caractériser les nanoparticules. Il est basé sur l'intégralité de la surface spécifique du matériel par unité de volume. Il correspond au produit de la surface spécifique des nanomatériaux et de leur densité. Un VSSA supérieur à $60 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ indique une taille moyenne de 100 nm. On peut ainsi considérer le matériel comme nanoparticule. Ainsi, toute particule avec un VSSA supérieur à $60 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ entrent dans la catégorie des matériaux nanostructurés.

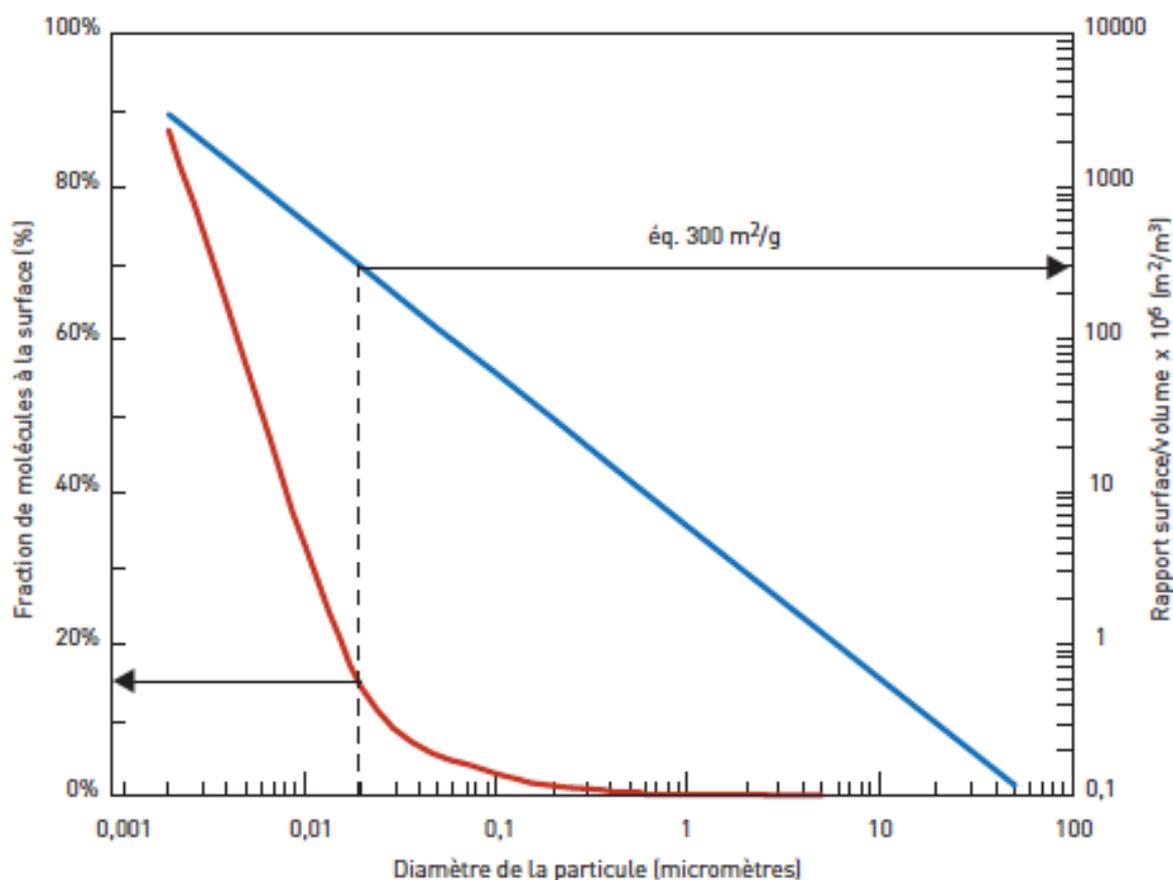
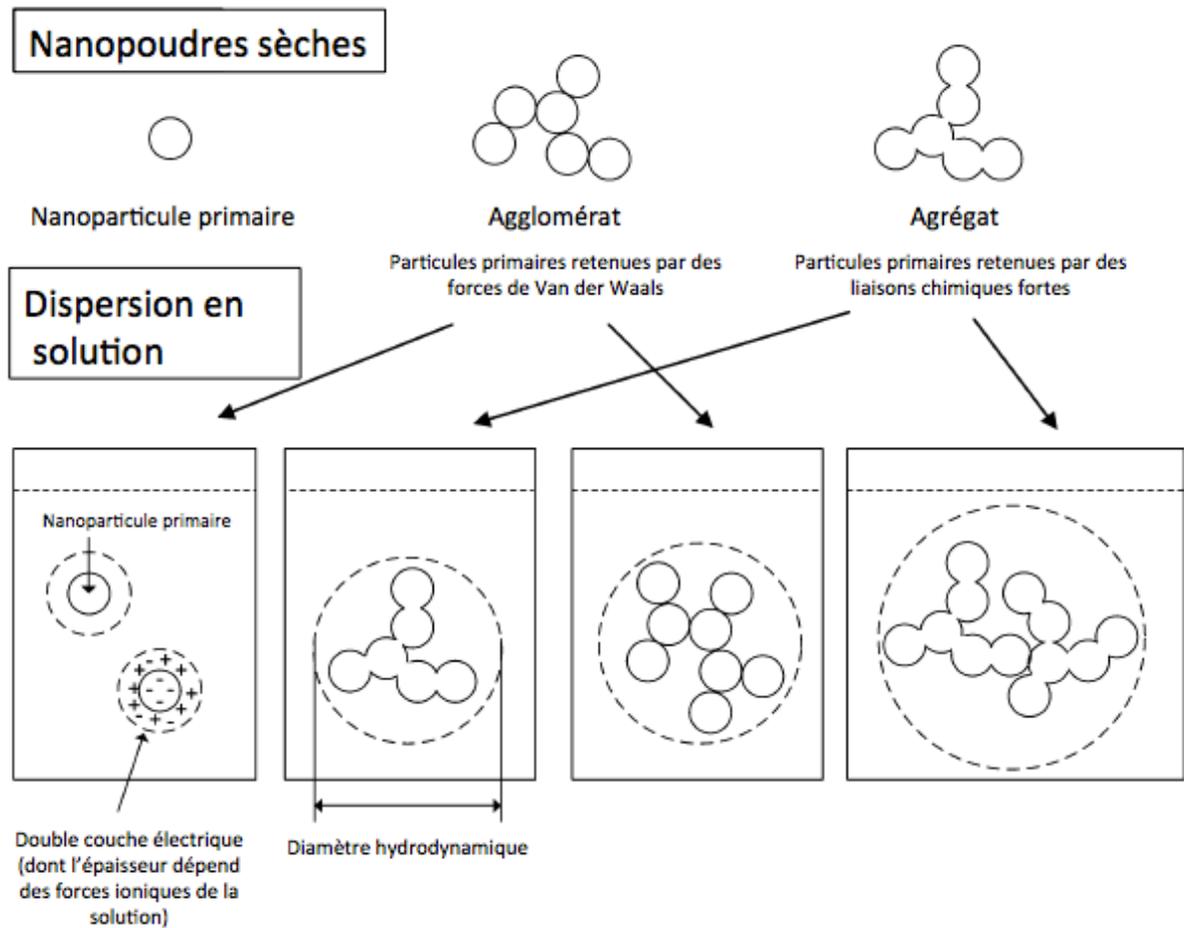


Fig. 9 : Evolution du rapport surface/volume (en bleu) et de la fraction de molécules présentes à la surface de la particule (en rouge) en fonction de son diamètre - Hypothèse de calcul : particule sphérique de structure dense composée de molécules de 5 \AA , d'une surface spécifique de $300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et d'une masse volumique de $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (Witschger et Fabriès, 2005)

D'autres paramètres recherchés pour les nano- et microparticules comme la forme, la composition chimique, la structure cristalline, la pureté doivent également être prises en compte lors de l'étude des interactions entre les nanoparticules et les composants biologiques (Auffan, 2007). De plus, certaines particules ont la propriété d'adsorber à leur surface des molécules présentes dans l'environnement qui peuvent être toxiques. C'est le cas par exemple des nanoparticules d'oxyde de fer qui ont une grande capacité d'adsorption de l'arsenic (Auffan *et al.*, 2007). Dans ces conditions, la toxicité ne relève pas seulement de la nature chimique de la nanoparticule elle-même mais aussi des substances véhiculées à sa surface. Les sites réactifs de la surface des particules jouent un rôle primordial sur les interactions entre le solide et le monde vivant, et ceci à différentes échelles : adsorption de petites molécules biologiques, interaction avec des polypeptides ou des protéines dont la conformation peut être modifiée, interaction avec des acides nucléiques, insertion dans des systèmes membranaires...



Forces de répulsion dominantes :
charge de surface élevée, double couche épaisse, forces stériques

Faibles forces de répulsion en solution résultant en agglomération :
charge de surface faible, double couche mince, pas de forces stériques

Paramètres importants : taille de la particule primaire (nm), diamètre hydrodynamique (nm), potentiel zeta ou différence de potentiel (mV), épaisseur de la double couche (nm), forces stériques.

Fig. 10 : Différents états de configuration des particules à l'état de poudre et dispersées en milieu liquide (Jiang *et al.*, 2009)

Le rôle de la surface des nanoparticules est donc aussi fondamental dans ce type de problématique et des moyens d'investigation fins, capable d'analyser la composition élémentaire et les liaisons chimiques dans les premiers nanomètres de la surface du solide, sont nécessaires. Pour cela, une étude de la chimie de surface des nanoparticules permet de faire un lien entre réactivité de surface et effets biologiques. En effet, avec leur forte réactivité, leur surface peut être fortement modifiée selon le milieu dans lequel elles vont séjourner. De plus, les nanoparticules sous forme de poudre sèche peuvent être présentes sous deux formes : agrégées (liaisons fortes entre les particules primaires) et agglomérés (forces de Van der Waals). Après leur dispersion en solution, elles restent isolées, forment des agglomérats ou demeurent agrégées, entourées par une double couche électrique (Jiang *et al.*, 2009 ; figure 10). En règle générale, lorsque des échantillons de nanoparticules agglomérées sont ajoutés à un liquide, ils sont susceptibles d'être séparés en cassant les forces d'attraction les plus faibles par différentes méthodes (ex : la sonication), alors que les nanoparticules agrégées ne peuvent pas l'être. La capacité des nanoparticules à former des agglomérats ou des agrégats s'explique par leur forte réactivité de surface. Leur stabilité dépend aussi de la double couche électrique caractérisée par le potentiel zéta (charge de surface) et l'épaisseur de la double couche électrique.

Dietz et Herth (2011) ont mis en évidence le lien entre caractéristiques physiques, chimiques et surfaciques des nanoparticules et les effets biologiques. Par exemple, la chimie de surface risque de jouer sur la réactivité des nanoparticules et leur nature chimique, leur persistance et leur interaction avec le vivant. Les paramètres physico-chimiques et surfaciques sont donc essentiels pour comprendre le sort et le comportement des nanoparticules dans l'environnement, comme la pénétration et la distribution dans les organismes ; et l'interaction des nanoparticules avec les autres polluants présents dans les écosystèmes (Handy *et al.*, 2008). De récentes études ont identifié et confirmé qu'un certain nombre de paramètres influencent la toxicité des nanoparticules (Nel *et al.*, 2006; Oberdörster *et al.*, 2005), comme la dose (Kwon *et al.*, 2009), la taille (Kreyling *et al.*, 2006), la forme (Oberdörster *et al.*, 2005), le matériau brut (Hussain *et al.*, 2005), la charge de surface (Cho *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2004), la surface spécifique (Brandenberger *et al.*, 2009; Stoeger *et al.*, 2006), ainsi que la composition du milieu d'exposition (Herzog *et al.*, 2009a) (tableau 5).

Tab. 5 : Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité (www.inrs.fr)

Facteurs liés aux nanoparticules qui déterminent leur toxicité	
Composition chimique	La nature des nanoparticules (notamment métallique), ainsi que la présence de composés chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbés sur leur surface, sont susceptibles d’influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d’espèces réactives de l’oxygène.
Taille	Une diminution de la taille des particules ou des fibres favorise leur pénétration dans les cellules et leur migration dans l’organisme.
Surface	La surface spécifique d’une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Or, la réactivité chimique d’une particule dépend de sa surface. Ainsi, une diminution de la taille des particules et des fibres induit une augmentation de leur surface spécifique et donc une augmentation de leur réactivité chimique. De plus, la surface des nanoparticules joue un rôle fondamental dans les contacts et les interactions avec les différents tissus et cellules. Elle favorise également la pénétration de certaines substances dans l’organisme : celles-ci sont adsorbées et peuvent atteindre divers sites.
Nombre	L’augmentation du nombre favorise la pénétration des nanoparticules dans l’organisme.
Forme	La toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nanoparticules. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique. Cet effet est notable pour les particules avec une longueur supérieure à 8 µm et un diamètre inférieur à 0,25 µm, indépendamment de leur composition chimique.
Structure	La cristallinité, pour les composés minéraux (comme la silice ou le titane), peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des nanoparticules.
Solubilité	La dissolution constitue une étape critique dans la détermination du devenir des nanoparticules dans l’organisme.
Degrés d’agrégation et d’agglomération	Dans les faits, les nanoparticules individuelles existent rarement. Aussitôt formées au cours des divers procédés, elles ont une tendance naturelle à s’unir de façon irréversible pour donner naissance à des structures secondaires nommées agrégats. Sous certaines conditions, les agrégats peuvent à leur tour se lier pour former des structures tertiaires réversibles nommées agglomérats dont la taille peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nanoparticules dans l’organisme, leur pénétration dans ou à travers les cellules et leurs effets biologiques.

Les recherches sur les effets des nanoparticules sur l’environnement sont peu nombreuses et pourtant certains résultats sont contradictoires. Ces différences peuvent être expliquées par l’absence de normes sur les protocoles d’exposition mis en place et par une mauvaise caractérisation physico-chimique et surfacique des nanoparticules utilisées (Auffan, 2007). Il apparaît donc indispensable de connaître au mieux les nanoparticules avant d’en étudier leur toxicité (Card et Magnuson, 2010). Une relation peut ainsi être faite entre chimie, réactivité de surface et action biologique (toxicité et écotoxicité). Il est aussi important de vérifier les caractéristiques des nanoparticules dans le milieu d’exposition, ce dernier pouvant modifier la réactivité de surface et donc les effets biologiques. Dans une revue sur les effets des nanoparticules de ZnO, Ma *et al.* (2013) montrent que la corrélation entre propriétés physico-chimiques et écotoxicologie n’est pas évidente à faire mais qu’elle permettrait de prédire certains effets. De même, ils ont montré des effets toxiques de nanoparticules de ZnO chez des espèces aquatiques et terrestres mais ces effets dépendent fortement des conditions d’exposition et des caractéristiques des nanoparticules. Ainsi, avec la grande variabilité des nanoparticules testées et leurs concentrations utilisées *in vitro* généralement plus élevées à celles rencontrées *in vivo*, l’interprétation des études expérimentales sur les effets des nanoparticules doit rester très prudente (Andujar *et al.*, 2009) et nécessite une caractérisation précise afin de pouvoir comparer les résultats obtenus et de faciliter leur interprétation.

1.5. Les nanoparticules de fer

Depuis quelques années, nous assistons à l’émergence des nanotechnologies, qui lorsqu’elles rencontrent le vivant, se nomment nanobiotechnologies (Auffan, 2007). Les champs de recherche et d’investigation se développent dans différents domaines : la recherche pharmaceutique et médicale (nanoparticules comme vecteurs de médicaments (Chen *et al.*, 2013 ; Lv *et al.*, 2013), la destruction de tumeurs par chauffage de nanoparticules (Hang et Hainfeld, 2013), l’utilisation de nanoparticules comme agent de contraste pour l’imagerie par résonance magnétique (Ohno *et al.*, 2013) et la recherche dans le domaine des nanotechnologies environnementales (dépollution des eaux (Jiang *et al.*, 2012 ; Mueller *et al.*, 2012) et des sols (Machado *et al.*, 2013), le traitement des eaux de consommation (Chai *et al.*, 2013), le recyclage des déchets (Lee *et al.*, 2009).

1.5.1. Les nanoparticules de fer et leurs utilisations

Les nanoparticules de fer sont souvent utilisées dans différents domaines de recherches : cosmétologie, électronique, nanomédecine, remédiation environnementale. Il existe plusieurs types de nanoparticules de fer en fonction de l’oxyde qui les compose, la présence de fer métallique ou encore des adjuvants ou autres métaux qui lui sont associés. Parallèlement, à ces nanoparticules manufacturées, des nanoparticules de fer peuvent être retrouvées dans l’environnement suite à des rejets industriels d’industries métallurgiques par exemple.

Tab. 6 : Synthèse des différents types de nanoparticules de fer et leur potentielle utilisation

Types de nanoparticules de fer	Utilisation	Références
Nano-maghémities – Fe₂O₃	<ul style="list-style-type: none"> - Dépollution des eaux par adsorption de microcystine-LR (MC-LR) dans les eaux - Dépollution de l’arsenic (III, V) dans les eaux - Dépollution de l’As(V) dans les eaux de boisson 	<ul style="list-style-type: none"> - Gao <i>et al.</i>, 2012 - Tang <i>et al.</i>, 2011 - Tuutijärvi <i>et al.</i>, 2012
Nano-magnétites – Fe₃O₄	<ul style="list-style-type: none"> - Application dans l’imagerie de diagnostic et de thérapie du cancer - Utilisation de nanoparticules magnétiques (MNP) à base d’oxyde de fer comme sondes sensibles pour l’imagerie par résonance magnétique et les applications thérapeutique 	<ul style="list-style-type: none"> - Mody <i>et al.</i>, 2010 - Xu et Sun, 2013
Nanoparticules zero valent iron - nZVI	<ul style="list-style-type: none"> - Dépollution du chrome dans les eaux usées - Dépollution d’ibuprofène présent dans les sols - Dépollution du Cr(VI) dans les eaux - Dépollution des eaux par dégradation du lindane en solution aqueuse 	<ul style="list-style-type: none"> - Lin <i>et al.</i>, 2013 - Machado <i>et al.</i>, 2013 - Petala <i>et al.</i>, 2013 - San Roman <i>et al.</i>, 2013
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles – SPION *	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation pour de l’imagerie par résonance magnétique - Utilisation comme vecteurs de médicaments - Utilisation comme agent de contraste pour le diagnostic de tumeurs - Nanomédecine : Utilisation des propriétés magnétiques uniques, grâce à laquelle elles présentent une excellente efficacité de ciblage tumoral, ce qui ouvre la voie à un traitement personnalisé du cancer efficace 	<ul style="list-style-type: none"> - Hilger et Kaiser, 2012 - Wahajuddin et Arora, 2012 - Cheng <i>et al.</i>, 2013 - Santhosh et Ulrich, 2013

* SPIONs correspondent à des nanoparticules synthétiques de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (maghémite) ou de Fe_3O_4 (magnétite). Ces particules magnétiques sont coâtées avec certains polymères biocompatibles, comme le dextran ou le polyéthylène glycol, qui fournissent des produits chimiques pour la conjugaison d’agents thérapeutiques.

Le tableau 6 présente les différentes nanoparticules de fer que l’on peut retrouver dans l’environnement suite à des retombées atmosphériques ou à leur relargage (volontaire ou accidentelle) dans l’environnement.

Les nano-maghémites (Fe_2O_3) et les nano-magnétites (Fe_3O_4) peuvent aussi se retrouver dans l’environnement et notamment dans l’atmosphère suite à des éruptions volcaniques. Elles peuvent aussi être émises par les rejets atmosphériques d’industries. Les nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC de Thiais sont représentatives des nanoparticules qui peuvent être émises dans l’atmosphère par des industries métallurgiques de par leur mode de fabrication (Hervé-Bazin, 2007).

Cet engouement pour le développement des nanotechnologies génère une course scientifique et commerciale à l’échelle mondiale. Mais quels sont les impacts environnementaux et sanitaires de ces nanotechnologies ? Emergent-elles comme un développement durable au service de l’environnement ou comme une nouvelle source de toxicité ? (Wiesner *et al.*, 2006).

Avec les multiples applications des nanoparticules de fer et le risque de leur relargage dans l’environnement ainsi que leur émission dans les fumées de diverses industries (notamment métallurgiques), des études de dangers et de risques prennent tout leur sens. Dans ce contexte, il est important d’évaluer leur impact sur les différentes cibles potentielles (Ghosh *et al.*, 2010 ; Tagliari de Brito *et al.*, 2013). C’est pourquoi, nous avons choisi de travailler sur deux cibles : les végétaux et l’Homme. Les végétaux jouent un rôle écologique important au sein des écosystèmes et sont les premiers à être exposés à des retombées atmosphériques nanoparticulaires. L’Homme est principalement exposé à travers son système respiratoire.

Avant de débiter nos travaux, un état des connaissances sur les effets des nanoparticules a été réalisé au niveau des végétaux (inférieurs et supérieurs) et au niveau de l’Homme.

2. Les nanoparticules et les plantes

Nous exposerons dans un premier temps les principes généraux de l’utilisation des végétaux dans le domaine de la biosurveillance. Puis nous présenterons un état actuel des connaissances liées aux effets des nanoparticules sur les plantes.

2.1. La biosurveillance végétale

Les végétaux (inférieurs et supérieurs) représentent d’excellentes sentinelles dans le cadre d’études écotoxicologiques. Les végétaux chlorophylliens sont des producteurs primaires de biomasses et contribuent au bon fonctionnement des écosystèmes terrestres. Ils constituent également des habitats pour la faune, participent au cycle géochimique des éléments et notamment, la formation de la matière organique, qui joue un rôle fondamental dans la fertilité des sols et assure une protection contre l’érosion. Enfin, les plantes sont l’un des maillons d’entrée de certains polluants dans la chaîne alimentaire ce qui en fait un modèle d’étude indispensable pour l’évaluation des dangers et des risques (Manier, 2008).

Comme dit précédemment, des bio-indicateurs furent développés et représentent encore aujourd’hui de véritables outils de diagnostic de pollution atmosphérique (Van Haluwyn *et al.*, 2011). En 2002, Garrec et Van Haluwyn ont défini la notion de biosurveillance comme « l’utilisation des réponses à tous les niveaux d’organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d’un organisme ou d’un ensemble d’organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l’environnement et pour suivre l’évolution ».

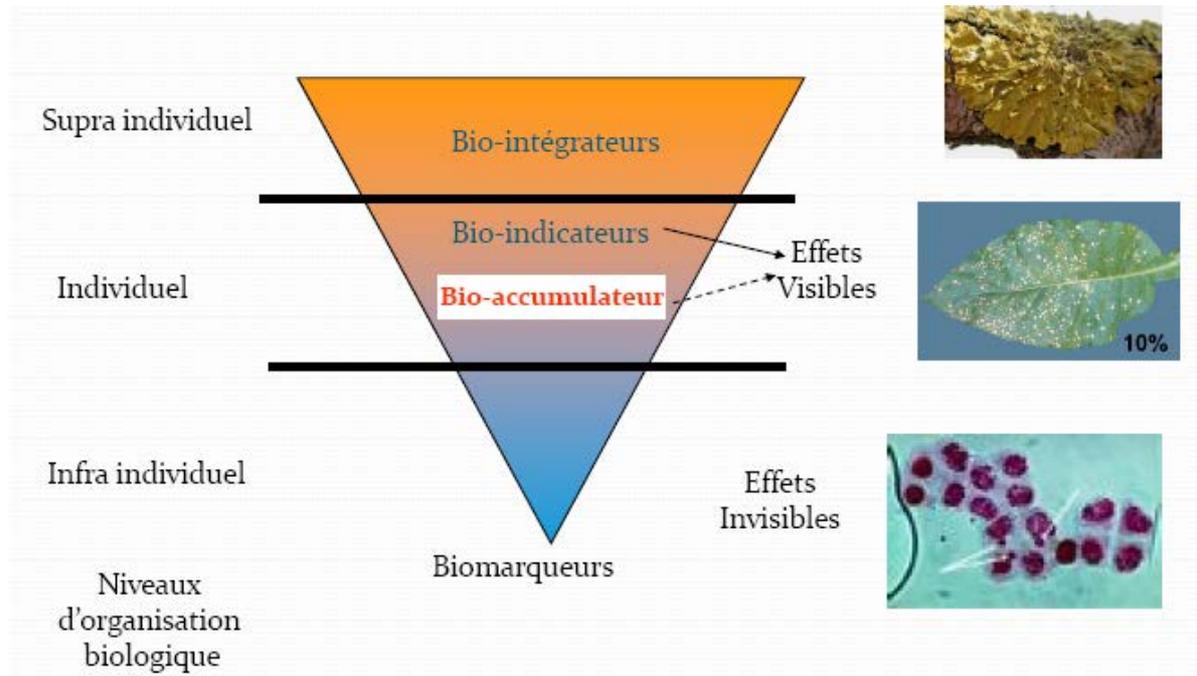


Fig. 11 : Les différents concepts de la biosurveillance (Cuny, *comm. pers.*)

Les analyses physico-chimiques permettent une analyse indépendante des différents polluants préalablement sélectionnés pour représenter un niveau de pollution, la biosurveillance, méthode d’études complémentaires, apporte des informations sur le devenir et la toxicité de substances dans les systèmes biologiques. Elle peut intervenir à différents niveaux d’organisation biologique ce qui correspond à plusieurs concepts : biomarqueurs, bioindicateurs, biointégrateurs et bioaccumulateurs (figure 11).

Lagadic *et al.* (1997) définissent un biomarqueur (niveau infra-individuel) comme un « changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique qui révèle l’exposition présente ou passée d’un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

Les bioindicateurs (niveau individuel ou populationnel) permettent de mettre en évidence des effets visibles au niveau de l’individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires, physiologiques (croissance ou reproduction). Ce terme ne peut être utilisé que pour les polluants fortement phytotoxiques, présents à fortes concentrations ou encore pour les végétaux dits « sensibles » (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

En utilisant le terme « biointégrateurs », nous nous situons au niveau de la population et des communautés d'espèces. Ils sont caractéristiques d'une modification de la présence ou de l'abondance d'une espèce et ils nous indiquent toutes modifications de l'environnement de cette espèce. Ces modifications peuvent être dues à l'introduction dans l'écosystème d'un polluant. Enfin, les bioaccumulateurs sont des organismes vivants capables d'accumuler des substances pouvant être toxiques dans leurs tissus. Les polluants vont donc s'accumuler au niveau de l'individu (bioaccumulateur) à des concentrations supérieures à celle du milieu et cela, sans dommage immédiat pour la physiologie et la morphologie de l'individu. Le taux du polluant devra être déterminé par une analyse physico-chimique. La bioaccumulation est un équilibre dynamique entre l'air et la plante mais avec une constante de temps variable dépendant de la plante, de sa biomasse, de la vitesse de métabolisation du polluant ou de sa vitesse de dépôt (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

Les études de biosurveillance permettent, ainsi, d'acquérir une meilleure connaissance des expositions environnementales mais aussi humaines avec l'utilisation d'espèces sentinelles. Aujourd'hui, des végétaux sont utilisés dans le cadre de ces études pour évaluer la qualité de l'air, comme le tabac, le ray-grass et les bryophytes (mousses). Dernièrement, le bouleau et la chaux ont même été utilisés pour étudier la bioaccumulation de l'arsenic et cadmium dans l'est de la Serbie (Alagic *et al.*, 2013). L'utilisation d'espèces sentinelles a donnée lieu à la rédaction de normes AFNOR, notamment la norme NF X 43-900 relative au tabac, la norme NF X43-902 relative aux mousses, et la norme NF X43-901 relative au ray-grass.

Le tabac est un bioindicateur de la pollution à l'ozone, en constante augmentation susceptible de causer des dommages à la santé humaine et au niveau l'environnement. Ainsi l'utilisation d'organismes bioindicateurs se révèle particulièrement indiquée. Le tabac Bel W3 permet de révéler la présence d'ozone dans l'atmosphère par l'observation de nécroses foliaires. Le tabac "Bel-B" est, quant à lui, le plus résistant à la pollution photo-oxydante. Dans la région Nord - Pas de Calais, les cultivars Bel-W3 et Bel B sont utilisés dans le cadre du réseau régional de bioindication. L'utilisation de ce bioindicateur est reconnu et utilisé au niveau européen (Nali *et al.*, 2007 ; Alves *et al.*, 2011).

Lodenus (2013) a défini une cartographie de la distribution spatiale de mercure autour des sources de pollution en utilisant notamment des mousses comme sentinelles et précise que ces dernières ont été utilisées avec succès depuis des décennies pour étudier le dépôt d'éléments traces métalliques.

2.1.1. Les bryophytes et la biosurveillance

Les bryophytes sont fréquemment employées comme sentinelles pour évaluer la qualité de l'air (Barandovski *et al.*, 2008 ; Rzepka et Cuny, 2008 ; Faburé *et al.*, 2010 ; Meyer *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2010 ; Lodenius, 2013). Leur utilisation semble tout à fait indiquée pour les raisons suivantes (Faburé, 2009) :

- ❖ les bryophytes possèdent un rapport élevé surface/volume ou surface/masse qui favorise le piégeage des grosses particules ;
- ❖ elles n'ont pas de vaisseaux conducteurs ni un vrai système racinaire, ce qui assure une exposition quasi exclusive aux composés d'origine atmosphérique ;
- ❖ la formation de nouvelles tiges feuillées se fait au sommet de la précédente : il n'y a donc pas de contact direct ou d'interaction avec le sol ;
- ❖ elles n'ont pas de cuticule cireuse (pour certaines d'entre elles) mais une paroi épidermique mince, ainsi les tissus sont facilement perméables à l'eau et aux minéraux, notamment les ions métalliques ;
- ❖ la paroi cellulaire des bryophytes est constituée de nombreux groupes anioniques et jouent un rôle efficace d'échangeurs de cations ;
- ❖ les bryophytes sont capables de filtrer les particules contaminées par des polluants organiques et d'absorber de grosses molécules, elles se révèlent donc être un bon matériel pour le dosage des polluants organiques (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), dioxines/furanes, polychlorobiphényles (PCB), pesticides) ;
- ❖ plusieurs espèces sont ubiquistes;
- ❖ la longévité des bryophytes permet leur utilisation pour intégrer des dépôts sur une durée importante (habituellement 5 ans) ;
- ❖ chez la plupart des espèces bryophytiques, il existe peu de transfert de contaminants entre des segments adjacents ou à partir d'une tige feuillée ancienne sur laquelle se développe une nouvelle, ceci permet d'être plus précis lorsque l'on cherche à étudier par exemple la bioaccumulation de contaminants au cours d'une période donnée ;
- ❖ chez certaines espèces, il est possible de reconnaître et de séparer les pousses annuelles. Ceci facilite la détermination de la durée d'exposition du matériel vivant à une pollution, par exemple dans le cadre de la biosurveillance ;
- ❖ leur nature poïkilohydrique leur assure une grande résistance aux conditions climatiques difficiles ; leur faculté de reviviscence leur permet de survivre dans des conditions de température très froide et de sécheresse ;
- ❖ la forte proportion d'acides gras insaturés présents dans les chloroplastes confère aux mousses une forte résistance aux faibles températures (Valanne, 1984) ;
- ❖ leur activité photosynthétique est continue tout au long de l'année et leurs capacités photosynthétiques ne varient pas en fonction des saisons, ce qui en fait un bio-indicateur utilisable à n'importe quelle période de l'année ;

❖ enfin, la simplicité et le faible cout des méthodes d’échantillonnage des bryophytes sont des qualités importantes en diagnostic environnemental. (Valanne, 1984; Denayer, 2000 ; Garrec et Van Haluwyn, 2002 ; Zechmeister *et al.*, 2003).

C’est pour toutes ces raisons que nous avons choisi ce modèle végétal. En 2008, Rezpka et Cuny ont présenté une liste non exhaustive des espèces de bryophytes qui ont été utilisées dans différentes études. Ils ont précisé que les mousses acrocarpes seraient les plus aptes aux dépôts secs et à l’étude des éléments traces métalliques, et que les genres *Bryum*, *Tortula* et *Ceratodon* étaient les plus utilisés actuellement. Des normes nationales (NF X43-902) et européennes (EN 16414 – *en cours de publication*) ont aussi été élaborées de manière à standardiser l’utilisation de ces modèles pour évaluer la qualité de l’air. Enfin, certaines mousses sont des espèces pionnières, qui contribuent de façon importante à la colonisation des sols nus ou dégradés et permettent donc l’installation et le maintien pérenne d’une végétation secondaire indispensable à une bonne dynamique végétale des sols et au développement d’écosystèmes durables. Ainsi, l’utilisation des bryophytes comme modèles de biosurveillance nous a semblé tout à fait indiquée pour étudier les effets des nanoparticules de fer dispersées par voie aérienne.

2.2. Les végétaux et les nanoparticules

Les nanoparticules, facilement dispersées par voie atmosphérique, peuvent impacter les écosystèmes. Des études ont montré qu’elles peuvent être toxiques pour les bactéries, les algues, les invertébrés et des espèces de poissons ainsi que pour certaines espèces de mammifères (Handy *et al.*, 2008). A notre connaissance, il n’existe pas d’étude s’intéressant aux effets de nanoparticules au niveau d’espèces de bryophytes. Nous avons donc décidé d’ouvrir notre recherche bibliographique aux végétaux au sens large.

Les végétaux sont les premiers à être exposés aux polluants, notamment aux nanoparticules, au niveau du sol et de l’air. De plus, comme nous l’avons précisé précédemment les végétaux ont un rôle écologique crucial au sein des écosystèmes et ont un intérêt tout particulier lors d’études d’écotoxicologie en tant que sentinelles. L’expression « *Plant nanotoxicology* » a été introduite comme une discipline qui étudie les effets et les mécanismes de toxicité des nanoparticules chez les plantes, comme le transport, les interactions de surface et les réponses spécifiques des plantes en fonction de la nature des nanoparticules (Dietz et Herth, 2011).

2.2.1. La pénétration cellulaire des nanoparticules chez les végétaux

Les plantes jouent un rôle important dans le comportement et le transport des particules ultra-fines et des nanoparticules dans l’environnement au travers leur pénétration et leur bioaccumulation au sein des plantes (Monica et Cremonini, 2009). Même si les investigations scientifiques sur la pénétration intercellulaire et intracellulaire, et l’accumulation des nanoparticules chez les végétaux sont encore

rudimentaires, de nouvelles publications sont venues compléter ce domaine de recherche (pénétration, comportement, accumulation, toxicité) (Ma *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré la pénétration tissulaire de différentes nanoparticules chez des plantes supérieures suite à une exposition racinaire (Battke *et al.*, 2008; Gonzalez-Melendi *et al.*, 2008; Lin et Xing, 2008; Larue *et al.*, 2011, 2012.) ou foliaire (Corredor *et al.*, 2009 ; Uzu *et al.*, 2010 ; Dietz et Hertz, 2011).

2.2.1.1 L’exposition racinaire

Lin et Xing (2008) ont analysé l’internalisation et la translocation de nanoparticules de ZnO chez *Lolium perenne* (ray-grass). Adsorbées sur la surface des racines, elles ont ensuite été observées dans l’apoplaste. Leur facteur de translocation observé de la racine à la pousse était très lent. De même, Battke *et al.* (2008) ont analysé la pénétration de nanoparticules de palladium (Pd-NP) par *Hordeum vulgare* (orge) et leur comportement dans la solution nutritive utilisée pour la croissance des plantes. Des Pd-NP, de différentes tailles, ont été testées et les résultats montrent que les Pd-NP ont pénétré, via les racines, en fonction de leur diamètre, les plus petites ayant causé un stress au niveau les feuilles (par translocation) à faibles concentrations.

Certains auteurs ont focalisé leurs recherches sur le comportement de nanoparticules de fer (Fe-NP). Gonzalez-Menlendi *et al.* (2008) ont utilisé des Fe-NP avec une couche de carbone sur des plantes comme *Cucurbita pepo* (courgette) et les résultats ont montré leur présence dans l’ensemble des espaces extracellulaires et à l’intérieur de plusieurs cellules. De même, Zhu *et al.* (2008) ont étudié les effets de nanoparticules de magnétites (NP-Fe₃O₄) sur *Cucurbita maxima* (potiron) cultivé en milieu liquide, mettant en évidence leur adsorption et leur accumulation dans les tissus des plantes, à la différence, *Phaseolus limensis* (haricots de lima) n’a pas été capable d’absorber et de mobiliser ces mêmes nanoparticules. Ainsi, différentes plantes donnent des réponses différentes suite à une exposition aux mêmes nanoparticules. Enfin, en raison de la capacité de certaines espèces, certaines plantes sont hyper-accumulatrices sans qu’apparaisse de dommages physiologiques, au moins dans les conditions de l’expérience (Ruffini-Castiglione et Cremonini, 2009).

2.2.1.2 L’exposition aérienne

En revanche, il existe peu d’études sur l’exposition de végétaux aux nanoparticules dispersées par voie aérienne (Corredor *et al.*, 2009 ; Uzu *et al.*, 2010 ; Dietz et Hertz, 2011). Or, le milieu atmosphérique est un milieu privilégié de dispersion des particules fines dans l’environnement. Le temps de résidence atmosphérique d’une poussière varie beaucoup selon sa taille et sa composition. Compte tenu de leur taille, les nanoparticules sont donc facilement dispersées par voie atmosphérique, transportées sur de très longues distances puis redéposées sur les sols ou les milieux aquatiques très loin de leur lieu d’émission. La distance parcourue par une nanoparticule dans le milieu atmosphérique dépendra énormément de ses propriétés physico-chimiques et de sa

réactivité chimique. En effet, si cette dernière est élevée, elle aura tendance à fixer d’autres polluants présents dans l’air et donc à se déposer plus rapidement sur le sol par sédimentation, la vitesse de sédimentation augmentant avec le diamètre des particules (AFSSET, 2006). Ceci montre bien l’intérêt de l’étude des nanoparticules dans le compartiment atmosphérique.

En 2009, Corredor *et al.* ont étudié la pénétration et le transport de nanoparticules de fer coatées avec du carbone chez la citrouille suite à une exposition par une pulvérisation localisée sur les parties aériennes de la plante. Seuls les échantillons observés après une exposition de 168h (7 jours) au microscope électronique ont permis de mettre en évidence la présence de nanoparticules dans les cellules de l’épiderme au niveau du pétiole, c’est à dire au point d’application. Dans ces cellules, les nanoparticules sont apparues isolées, non agrégées. Les auteurs ont également noté qu’aucune nanoparticule n’a été clairement détectée dans les cellules voisines de l’épiderme. Ainsi, suite à une application par pulvérisation, des nanoparticules isolées étaient présentes dans le cytoplasme des cellules de l’épiderme dans la région proche du point d’application.

2.2.1.1 Les voies de penetration (intercellulaire et intracellulaire)

D’autres auteurs se sont intéressés aux voies de pénétration des nanoparticules au sein des cellules végétales. Uzu *et al.* (2010) ont étudié la pénétration foliaire de particules (dont nanoparticules) de plomb chez la laitue suite à une exposition à des retombées atmosphériques. Les plantes terrestres ayant gardé, de par leur évolution, la capacité d’absorber les nutriments à travers leurs feuilles (Mengel, 2002), les contaminants peuvent prendre la même voie pour pénétrer à travers les tissus. Les nutriments et les contaminants doivent traverser plusieurs barrières physiques avant d’entrer dans le cytosol des cellules. Cette pénétration est fortement dépendante des conditions climatiques, des espèces de plantes, du statut physiologique et de la spéciation chimique de l’élément (Schönherr et Luber, 2001). Il existe deux routes parallèles pour traverser la cuticule : la voie liposoluble et la voie hydrosoluble (Schönherr, 2000 ; Schönherr, 2006). Les ions et les solutés hydrophiles suivent souvent la voie hydrophilique via les pores aqueux (Schönherr, 2000). En plus de ces voies, les contaminants peuvent pénétrer par les stomates présents à la surface des feuilles des végétaux supérieurs. Uzu *et al.* (2010) ont montré que les nanoparticules de plomb ont pénétré le milieu cellulaire au travers les stomates. Deuxièmement, le plomb résultant de la dissolution des particules ont pu diffuser à travers les pores aqueux de la cuticule et des stomates suivant la voie hydrosoluble induisant la formation de nécroses (figure 12).

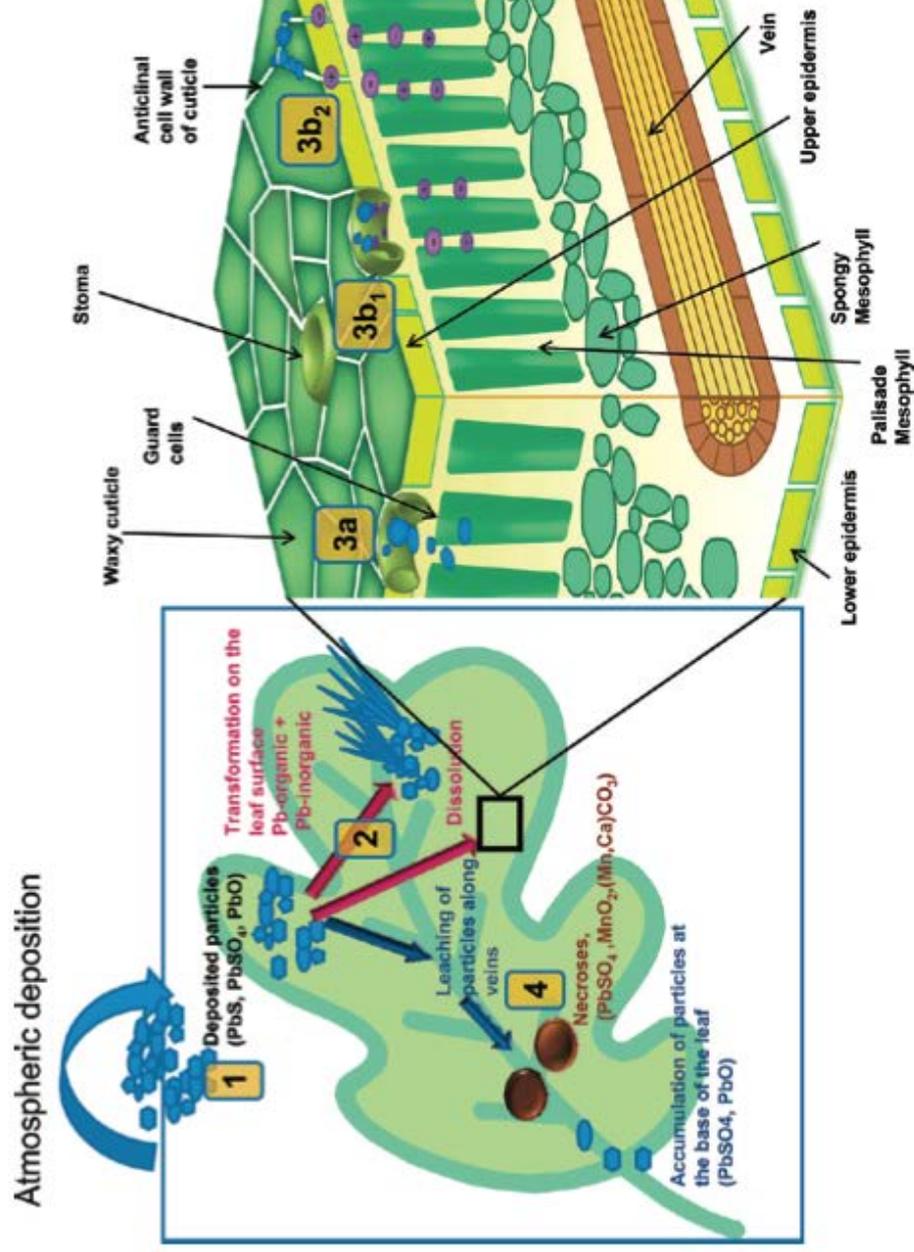


Fig. 12 : Voies pour l'absorption du plomb après le dépôt de particules contenant du plomb : dépôt de particules sur la surface des feuilles (1), transformation chimique sur la surface foliaire menant à des phases secondaires contenant du Pb et éventuellement des solutés (2), accumulation de particules dans les stomates et éventuellement pénétration de nanoparticules (3a), diffusion possible des solutés par les pores aqueux présents sur les rebords de la cuticule des stomates (3b₁) et les parois cellulaires anticlinal de cuticules (3b₂). Les symptômes de toxicité (nécroses) induite par la présence des particules contaminées sur la feuille (4) (Uzu *et al.*, 2010).

D’autres auteurs ont confirmé que les nanoparticules pénètrent dans les plantes par différentes voies, sachant que le taux de pénétration dépend surtout de la taille et des propriétés de surface des nanoparticules (Dietz et Herth, 2011). Ainsi, les très petites particules lipophiles peuvent être incorporées dans les fluides apolaires passant par les pores de la cuticule, laquelle peut aussi contenir des voies polaires en plus des voies apolaires permettant leur pénétration intercellulaire. Les propriétés de pénétration diffèrent entre la cuticule des cellules de l’épiderme et des trichomes ou des stomates. Les nanoparticules aux dimensions plus importantes pénètrent à travers des zones sans cuticule, comme au niveau des hydathodes, des stigmates des fleurs ou des stomates. Les nanoparticules doivent, notamment, passer la paroi avant de pénétrer dans le milieu cellulaire végétal (Dietz et Herth, 2011). Les différentes voies de pénétration (racinaires et foliaires) des nanoparticules au niveau des plantes, décrites par Dietz et Herth en 2011, sont présentées dans la figure 13.

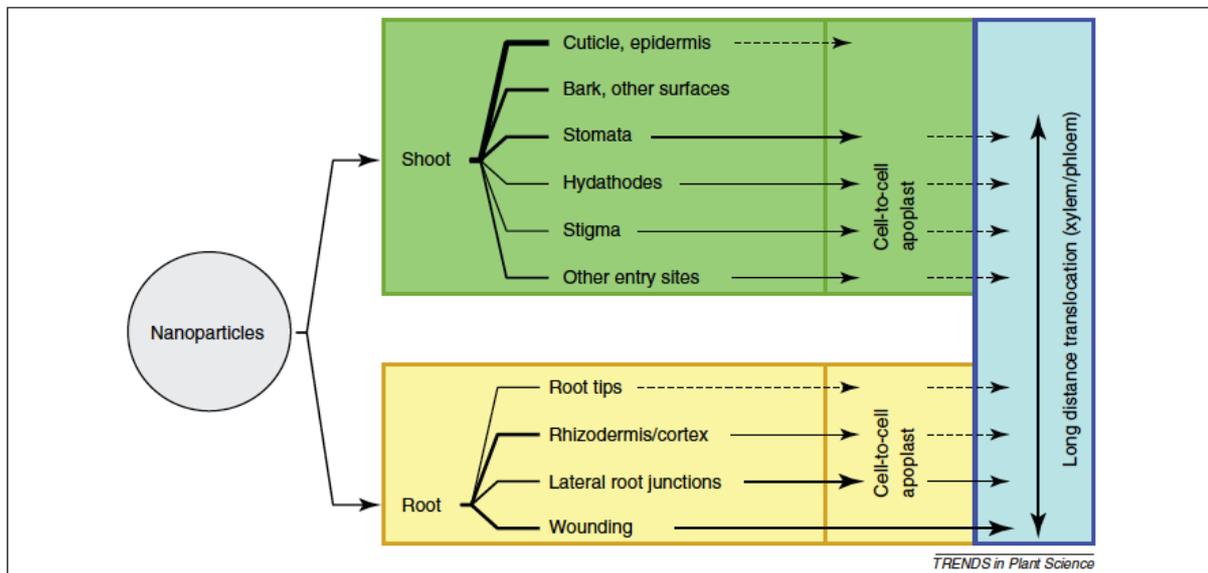


Fig. 13 : Voies associées à la pénétration, à l'absorption et à la translocation des nanoparticules dans les plantes. L'épaisseur des lignes est corrélée à titre provisoire avec la signification supposée des voies. Le schéma présente les parties aériennes des plantes (boîte verte) et les racines (boîte jaune), le mouvement dans le tissu et le transfert pour le transport longue-distance (connexion boîte bleue). Des lignes discontinues indiquent les hypothèses de transports les moins probables (Dietz et Herth, 2011).

Finalement, il a été mis en évidence une translocation des nanoparticules aux différents tissus et de la racine à la partie aérienne (Uzu *et al.*, 2010; Eichert *et al.*, 2008; Fernandez and Eichert, 2009). Mais certains auteurs précisent et confirment que la pénétration tissulaire des nanoparticules et leur translocation dépendent fortement de l'espèce étudiée (Zhu *et al.*, 2008) et aussi des caractéristiques des nanoparticules comme la taille, la réactivité de surface, etc. (Ma *et al.*, 2010 ; Dietz et Herth, 2011).

2.2.2. Les effets des nanoparticules chez les végétaux

Comme dit précédemment, différentes publications présentent des résultats souvent discordants. En effet, des études sur les effets de nanoparticules sur les végétaux mettent en évidence des effets bénéfiques et des effets néfastes (Larue, 2011). Les différents résultats sur la toxicité des nanoparticules sur les plantes dépendent du type de nanoparticules (Feng *et al.*, 2013) et de leurs propriétés (Ma *et al.*, 2010 ; Dietz et Herth, 2011 ; Ghafariyan *et al.*, 2013) (chapitre 1-1), mais aussi des espèces végétales (Zhu *et al.*, 2008) et de leur stade de développement, du temps, des doses (Ma *et al.*, 2013) et des méthodes d'exposition. Des recherches ont été menées pour mettre en évidence l'importance de prendre en compte les méthodes de préparation des solutions d'exposition. En effet, ces dernières vont donner lieu à des distributions de taille et les propriétés toxicologiques différentes des nanoparticules (Nurmi *et al.*, 2005 ; Lovern et Klaper, 2006). Enfin, dans une revue sur les effets des nanoparticules de ZnO, Ma *et al.* (2013) confirment l'importance des différents paramètres cités ci-dessus en affirmant que les effets toxiques des nanoparticules de ZnO chez des espèces aquatiques et terrestres dépendent fortement des conditions d'exposition et de leurs caractéristiques.

2.2.2.1 Les modes d'action

Les études des effets toxiques des nanoparticules chez les végétaux commencent à se développer. Il a été mis en évidence que les nanoparticules peuvent être toxiques pour les tissus végétaux dus à des effets chimiques et/ou physiques. Les nanoparticules interagissent avec les systèmes biologiques par cinq principaux modes (Dietz et Herth, 2011 ; figure 14) :

- ❖ les effets chimiques des ions métalliques susceptibles d'être dissous dans la solution ;
- ❖ les effets mécaniques dus à des sphères dures et les interfaces définies ;
- ❖ les effets catalytiques sur les surfaces ;
- ❖ les effets de surface, en raison de la liaison des protéines à la surface, soit par des mécanismes non-covalents ou covalents ou des effets oxydants ;
- ❖ et les changements dans l'environnement chimique (pH).

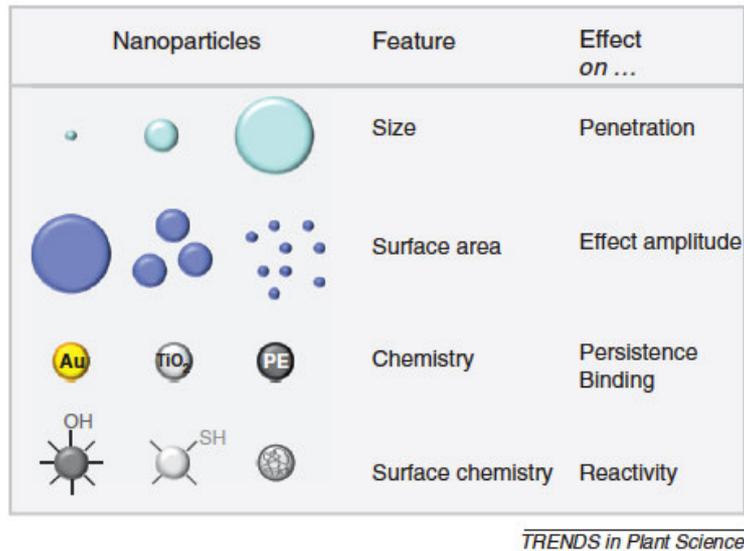


Fig. 14 : Relation entre les caractéristiques physiques, chimiques et surfaciques des nanoparticules et les effets biologiques (Dietz et Herth, 2011)

Les effets chimiques dépendent principalement de la composition des nanoparticules. Certains métaux toxiques (Cu, Cd, Hg, etc.) peuvent se lier à certains composants cellulaires comme des protéines et ainsi modifier leurs propriétés ou leurs activités. Ces interférences avec les processus cellulaires causent souvent des déséquilibres des potentiels redox et un stress oxydant chez les plantes exposées aux métaux (Schützendübel et Polle, 2002 ; Sharma et Dietz, 2009). D’autres métaux comme le fer peuvent transférer des électrons à l’O₂ comme accepteurs pour former des radicaux O₂⁻ ou H₂O₂ et un radical extrêmement réactif OH[•]. Ces réactions provoquent un stress oxydant qui peut affecter la cellule et donc l’organisme. Les nanoparticules peuvent également entraîner des effets mécanistiques qui dépendent de leur taille et de leur concentration en bloquant certains pores cellulaires par exemple. Certains métaux comme l’argent (Ag), le platine (Pt), le plomb (Pb), l’or (Au), le fer (Fe) et le cobalt (Co) peuvent catalyser certaines réactions chimiques comme les réactions d’oxydo-réduction. Enfin, les effets de surface peuvent aussi jouer un rôle dans la toxicité des nanoparticules. Les particules avec un oxyde de surface forme souvent une couche de groupements OH⁻, lesquels donnent une charge négative et donc qui attirent les groupements cationiques des protéines (Larsen *et al.*, 2010). Comme de nombreux facteurs de stress abiotiques et biotiques, l’une des conséquences les plus fréquente suite à une exposition nanoparticulaire semble être le développement d’un stress oxydant par production d’espèces réactives de l’oxygène et par des processus de peroxydation (Oberdorster *et al.*, 2007). Le stress oxydatif en réponse aux nanoparticules a été observé dans différents tissus d’animaux mais reste largement inexploré chez les plantes (Dietz et Herth, 2011).

2.2.2.2 Les effets sur le développement et le métabolisme

Beaucoup d’études sur la toxicité des nanoparticules chez les plantes se sont intéressées à certains paramètres comme la germination (Khodakovskaya *et al.*, 2009 ; 2011; Kumar *et al.*, 2013 ; Shaw et Hossain, 2013), la croissance au travers de l’élongation des différentes parties de la plantes (Khodakovskaya *et al.*, 2009 ; Tripathi *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2013) et la biomasse (Zheng *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2008, Feng *et al.*, 2013).

Des effets négatifs sur la croissance et le développement des végétaux supérieurs ont été étudiés Ruffini-Castiglione et Cremonini (2009). Selon Sayed El-Temseh et Joner (2010), des nanoparticules d'argent (Ag-NP) ont inhibé la germination, à faibles concentrations, de végétaux comme le ray-grass et l’orge (5 à 7 jours d’exposition, 10 mg.ml⁻¹), mais n'ont montré aucun effet taille-dépendant clair, et elles n’ont jamais complètement empêché la germination. Ainsi, pour ces auteurs, des tests de germination des graines semblent moins adaptés à l'estimation de l'impact environnemental d'Ag-NP. Similairement, Lin et Xing (2007) ont testé la phytotoxicité de cinq types de nanoparticules (nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs), aluminium, alumine, zinc et oxyde de zinc) sur la germination des graines et la croissance des racines de six espèces de plantes supérieures (radis, colza, ray-grass, laitue, maïs et concombre). Seules les nanoparticules de Zn et de ZnO ont entraîné une inhibition significative de la germination des graines et la croissance des racines sur les différentes espèces. Shaw et Hossain (2013) ont récemment mis en évidence une diminution significative de la germination des plantes de riz exposées à des nanoparticules de CuO.

A l’inverse, Barrena *et al.* (2009) ont mis en évidence que des nanoparticules d’or (10 nm), d’argent (2 nm) et de Fe₃O₄ (7 nm) avaient peu ou pas d’effets sur la germination du concombre et de la laitue aux concentrations dosées (62, 100 et 116 mg.l⁻¹, respectivement). De même, avec un test de bioluminescence sur *Photobacterium phosphoreum* et un test de toxicité anaérobie (étude de la production de biogaz par des bactéries), ces auteurs n’ont pas montré d’effets induits par ces nanoparticules aux concentrations utilisées, tout comme Lopez-Moreno *et al.* (2010) ont montré une absence de diminution de la germination de graines de soja exposées à des nanoparticules de CeO₂ et de ZnO. Parallèlement, un travail de recherche a indiqué que des MWCNTs (*multi-wall carbon nanotubes*) dont les concentrations étaient comprises entre 10 et 40 mg.l⁻¹, a considérablement amélioré la germination des graines et la croissance des plants de tomates (Khodakovskaya *et al.*, 2009). Les chercheurs ont émis l’hypothèse que l’effet positif de MWCNTs vient de la capacité des nanotubes de carbone à pénétrer les téguments et donc à favoriser l’absorption d’eau. Enfin, des nanoparticules d’Al₂O₃ (jusqu’à 4000 mg.l⁻¹) n’ont pas eu d’effet détectable sur l’élongation des racines et le développement d’*Arabidopsis thaliana*, même si une légère inhibition de la germination des graines a été détectée (Lee *et al.*, 2010).

2.2.2.3 Les effets sur le stress oxydant

Parmi les mécanismes à l'origine de la phytotoxicité des nanoparticules, le stress oxydant est souvent évoqué. Cependant, comme dit précédemment, l'induction d'un stress oxydant chez les végétaux exposés à des nanoparticules est un domaine de recherche qui reste encore peu exploité (Dietz et Herth, 2011).

L'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est souvent la plus recherchée. La plupart des publications montrent une augmentation des ROS chez différentes espèces végétales exposées à des nanoparticules (Panda *et al.*, 2011 ; Zhao *et al.*, 2012b ; Faisal *et al.*, 2013 ; Shaw et Hossain, 2013). A l'inverse, Rico *et al.* (2013) a noté que les quantités de ROS produites dans les échantillons de riz exposés à 62,5 et 125 mg.l⁻¹ de nanoparticules de CeO₂ sont réduites, comparées aux plants non exposés, dans l'ensemble des feuilles et des racines. En revanche à 250 et 500 mg.l⁻¹, les quantités de ROS ne semblent pas modifiées. Les auteurs suggèrent que les nanoCeO₂ auraient la capacité de piéger les radicaux libres, de façon inversement proportionnelle à la diminution de leur taille et de leur concentration. Cependant d'autres études sont nécessaires pour clarifier ce phénomène (Rico *et al.*, 2013).

D'autres marqueurs du stress oxydant ont aussi été étudiés, comme la lipoperoxydation lipidique et les systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques). Shaw et Hossain (2013) ont étudié la toxicité de nanoparticules de CuO sur *Oryza sativa* cv. *Swarna* (riz). Ils ont mis en évidence que les nanoparticules de CuO ont causé un important stress oxydant avec une production de H₂O₂ et une production de proline. De même, ils ont constaté une modulation d'enzymes impliquées dans le stress oxydant comme les ascorbates peroxydases (APOX), les superoxydes dismutases (SOD), les monodéhydroascorbates réductases (MDHAR) et les glutathions reductases (GR). Enfin, les niveaux de malondialdéhyde ont aussi été induits. De même, Faisal *et al.* (2013) ont étudié les effets des nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO-NP) sur le stress oxydant. Ils ont mis en évidence une augmentation de l'activité des catalases (CAT), les SOD ainsi qu'une augmentation du glutathion (GSH) et de la lipoperoxydation membranaire ce qui confirme un stress oxydant induit. De même, en 2012(b), Zhao *et al.* se sont intéressés à l'impact de nanoparticules de CeO₂ (400 et 800 mg.kg⁻¹ de sol) sur le maïs (*Zea mays*) en étudiant des paramètres relatifs au stress comme H₂O₂, l'activité de certaines enzymes comme les catalases (CAT) et les ascorbates peroxydases (APOX), la production de protéines de choc thermique (HSP70), la lipoperoxydation lipidique et la mort cellulaire après 10, 15 et 20 jours suivant la germination. Comme dans d'autres publications, ils ont constaté une augmentation des ROS tout comme les activités des CAT et des APOX et une hausse des HSP70 en réponse au stress. Mais aucune peroxydation lipidique n'a été observée. Les résultats suggèrent que les CAT, les APOX et les HSP70 pourraient aider les plantes à se défendre contre les dommages oxydatifs induits par les nanoCeO₂ et de survivre à l'exposition des nanoparticules. Dans un autre cas, Rico *et al.* (2013) n'ont pas observé de production de malondialdéhyde (MDA),

témoignant d'une lipoperoxydation membranaire chez le riz, au niveau racinaire et des parties aériennes, exposé à des nanoparticules de CeO₂ (62,5, 125, 250 et 500 mg.l⁻¹) excepté au niveau des parties aériennes exposées à 500 mg.l⁻¹. Cette étude a permis de mettre en évidence une modulation de certaines enzymes impliquées dans le système antioxydant (CAT, guaiacols peroxidases (GPOX), SOD, APOX, déhydroascorbates reductases (DHAR) et GR) principalement suite à une exposition à 500 mg.l⁻¹, lié à l'augmentation des dommages à la membrane.

Dans d'autres publications, il a été observé des effets plutôt anodins des nanoparticules sur les plantes. Par exemple, Seeger *et al.* (2009) ont étudié les effets de nanoparticules de TiO₂ sur des boutures de saules et mis en évidence des effets limités sur la croissance en termes d'utilisation de l'eau et de la transpiration. De même, Doshi *et al.* (2008) n'ont pas observé d'effets toxiques sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et le ray-grass anglais (*Lolium perrene*) exposés à des nanoparticules d'Al à des concentrations allant jusqu'à 17 mg.l⁻¹.

Enfin, certaines études se sont intéressées à la dissolution de nanoparticules dans les milieux d'exposition et permis de souligner l'importance de ce phénomène. Ces études ont inclus la toxicité des ions dissous provenant des nanoparticules testées. Deux catégories peuvent être distinguées : les nanoparticules solubles dans les milieux d'exposition (Zn, Cu, Ag, Fe...) dont une partie des effets peut être attribuée aux ions et les nanoparticules insolubles (CeO₂, TiO₂, nanotubes de carbone...) (Larue, 2011). En 2007, Lin and Xing ont étudié les effets des nanoparticules appartenant à ces deux différentes catégories (MWCNTs, Al, Al₂O₃, Zn et ZnO) sur 6 espèces végétales (radis, colza, ray-grass, laitue, maïs et concombre). Ils ont montré une diminution de l'élongation racinaire pour toutes les espèces végétales suite à une exposition à des nanoparticules à base de zinc mais les effets sont beaucoup moins importants suite à une exposition à des nanoparticules à base d'aluminium ou des MWCNTs. Une étude sur les effets des nanoparticules de ZnO sur le ray-grass (*Lolium perenne*) a indiqué que la phytotoxicité ne peut pas être expliquée que par la dissolution des nanoparticules de ZnO (ZnO-NP) à partir du matériau brut (Lin et Xing, 2008). De même, la phytotoxicité des ZnO-NP chez *Arabidopsis* a été beaucoup plus forte que celle des solutions contenant la même concentration de Zn soluble, mettant en évidence des effets plus importants dus à la forme nanoparticulaire (Lee *et al.*, 2010).

2.2.2.4 Les effets génotoxiques

Divers effets génotoxiques ont été mis en évidence après une exposition à différentes nanoparticules comme une diminution de l'indice mitotique (Kumari *et al.*, 2009 ; Panda *et al.*, 2011 ; Patlolla *et al.*, 2012) ; l'augmentation des aberrations chromosomiques (Kumari *et al.*, 2009 ; Klančnik *et al.*, 2011 ; Panda *et al.*, 2011 ; Ghosh *et al.*, 2012 ; Patlolla *et al.*, 2012) ; l'augmentation des dommages au niveau de l'ADN, mise en évidence par le test des comètes (Ghosh *et al.*, 2010 ; Panda *et al.*, 2011 ; Ghosh

et al., 2012) ou des cassures au niveau chromosomique mise en évidence par le test des micronoyaux (Panda *et al.*, 2011; Patlolla *et al.*, 2012). En revanche, à notre connaissance, il n'existe pas de recherche sur la production d'adduits à l'ADN de type 8-OHdG au sein des cellules végétales exposées à des nanoparticules.

2.2.2.5 La modulation de l'expression génique

Depuis quelques années, une discipline se développe « la toxicogénomique ». Elle se définit comme l'étude de la réponse d'un génome exposé à des substances polluantes, et utilisant les technologies "omiques" telles que l'expression d'ARNm à l'échelle génomique (transcriptomique), l'expression des protéines dans les tissus et les cellules (protéomique), et les profils métaboliques (métabolomique), en combinaison avec les outils bioinformatiques et la toxicologie conventionnelle (OCDE, 2013).

Ainsi, les recherches sur la modulation de l'expression génique témoignant d'une exposition à des nanoparticules se développent. Certains auteurs ont pu mettre en évidence des modifications transcriptomiques chez des espèces de plantes supérieures suite à une exposition nanoparticulaire. Khodakovskaya *et al.* (2011) ont constaté une surexpression de gènes impliqués dans la régulation de stress et celle du fonctionnement des aquaporines chez la tomate exposée à des MWCNTs. Landa *et al.* (2012) se sont intéressés aux effets d'une exposition de 100 mg.l⁻¹ de nanoparticules d'oxyde de zinc (nZnO), de fullène (suie) (FS) et de dioxyde de titane (nTiO₂) sur le niveau d'expression de transcrits au niveau des racines de *Arabidopsis thaliana*. Les nZnO, les plus toxiques selon l'étude, ont causé des changements spectaculaires dans la modulation de gènes, notamment par une surexpression de ceux impliqués dans les mécanismes de stress hydrique, oxydatif et osmotique. Les FS ont aussi provoqué une réponse significative et principalement au niveau des gènes liés au stress. Enfin, les nTiO₂ ont eu un impact plus faible sur la modulation génique indiquant une toxicité minimale. En conclusion de leur étude, Landa *et al.* (2012) ont indiqué clairement que les mécanismes de phytotoxicité sont très dépendants des nanoparticules. Kaveh *et al.* (2013) ont observé, quant à eux, une surexpression de 286 gènes et une sous-expression de 81 gènes chez *Arabidopsis thaliana* suite à une exposition à 5 mg.l⁻¹ de nanoparticules d'Ag recouvertes par une couche de polyvinylpyrrolidone. Beaucoup de gènes surexprimés étaient impliqués dans la réponse des plantes au stress oxydant et aux métaux et les gènes sous-exprimés étaient plus associés à une réponse à un pathogène ou stress hormonal. Enfin, Yan *et al.* (2013) ont étudié l'influence de SWCNTs (single-walled carbon nanotubes) sur le développement des racines de maïs, notamment en étudiant la modulation de l'expression génique. Les SWCNTs induiraient bien une modulation de l'expression de certains gènes ce qui aurait pour conséquences d'affecter la croissance racinaire.

2.2.2.6 La modulation de miARN

D'autres auteurs se sont également intéressés à la modulation de micro-ARN ou miARN (Burklew *et al.*, 2012). Il s'agit d'une nouvelle classe endogène d'ARN, ce sont des régulateurs post-transcriptionnels qui fonctionnent pour modifier l'expression des gènes. Il a été démontré que les miARN sont liés aux réactions de stress abiotiques tels que la sécheresse et la salinité dans les plantes. Burklew *et al.* (2012) ont eu pour objectif d'étudier le rôle de certains miARN dans la réponse de plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) exposés à des nanoparticules d'Al₂O₃. Dans cette étude, les auteurs ont notamment mis en évidence une surexpression des miR395, miR397, miR398 et miR399 suite à une exposition aux nanoparticules d'Al₂O₃ (1%). Les auteurs ont émis l'hypothèse que les miARN peuvent jouer un rôle dans la capacité des plantes à résister au stress causé par des nanoparticules Al₂O₃ dans l'environnement.

2.2.3. Les effets de nanoparticules de fer chez les végétaux

Les recherches des effets des nanoparticules de fer sur les végétaux sont peu nombreuses et s'intéressent aux différentes nanoparticules composées de fer et à différents modèles végétaux. Comme pour les autres types de nanoparticules, les études ont vérifié la pénétration, voir même la translocation des nanoparticules au sein de modèles végétaux (Zhu *et al.*, 2008 ; Ghafariyan *et al.*, 2013). Cette partie ayant été détaillée précédemment, nous nous focaliserons ici sur les autres effets des nanoparticules (accumulation, toxicité, stress oxydant...).

En 2008, Zhu *et al.* se sont intéressés à la pénétration, la translocation mais aussi à l'accumulation de nano-magnétites (Fe₃O₄) chez la citrouille (*Cucurbita maxima*). Ils ont pu observer une internalisation et une translocation de ces nanoparticules dans les différentes parties du végétal. Ils ont également noté une accumulation des nanoparticules au niveau des racines mais aussi des feuilles. Cependant, après 20 jours de croissance dans un milieu contenant des nano-magnétites, aucun effet toxicologique n'a pu être mis en évidence. Ainsi, cette plante serait un transport potentiel des nanoparticules dans l'environnement mais aussi au sein de la chaîne alimentaire. De même, Sayed El-Temsah et Joner (2010) ont étudié l'impact de nanoparticules de fer (zero-valent iron nanoparticules ou nZVI) sur la germination et leur biodisponibilité au cours d'une exposition en solution aqueuse et dans le sol. Les résultats indiquent que les nZVI à faibles concentrations peuvent être utilisées sans effet néfaste sur les plantes et peuvent donc être adaptées à l'assainissement. Enfin, récemment, Ghafariyan *et al.* (2013) ont étudié la pénétration et la translocation de SPIONs sur le soja en milieu hydroponique. Ils se sont aussi intéressés à leurs effets sur les niveaux de chlorophylle. Ils ont mis en évidence la pénétration et la translocation des SPIONs avec une augmentation des niveaux de chlorophylle sans trace de toxicité. Le ratio équivalent de chlorophylle a et b suite à tous les traitements avec un milieu de croissance conventionnel avec des SPIONs comme source de fer, n'a indiqué aucune différence significative sur l'efficacité de la photosynthèse. Ce résultat suggère que la biosynthèse

de la chlorophylle a est directement influencée par celle de la chlorophylle b. Ils ont aussi démontré que les caractéristiques des nanoparticules (potentiel zeta, magnétisme) avaient un rôle crucial sur la modulation des quantités de chlorophylle au niveau des feuilles de soja.

A l'inverse, en 2013, Feng *et al.* se sont intéressés, en outre, aux effets de nanoparticules d'oxyde de fer (FeONPs) sur le trèfle (*Trifolium repens*) et ses champignons mycorhiziens. Ces champignons sont bénéfiques pour la croissance de la plante car ils facilitent l'absorption des nutriments et spécialement le phosphore (P). Ils donnent à la plante une résistance contre les éléments trace métalliques (ETM) (Alguacil *et al.*, 2011), ils améliorent la structure du sol (Hassan *et al.*, 2011), ils protègent la plante contre des agents pathogènes (Singh *et al.*, 2010) et éliminent les mauvaises herbes (Rinaudo *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'à forte concentration (3,2 mg.kg⁻¹), les FeONPs entraînent une diminution significative de la biomasse (des racines et des parties aériennes) du trèfle. Cette diminution de la biomasse et donc de la croissance montre que le rôle du champignon est perturbé. Ils précisent que leur résultats vont à l'encontre de certaines études qui indiquent que les FeONPs auraient plutôt un rôle favorable pour les plantes (Ren *et al.*, 2011). Or, normalement, le champignon a notamment pour rôle de moduler les apports de Fe (en jouant sur sa biodisponibilité) pendant la croissance du trèfle. Ils supposent aussi que les FeONPs ne sont pas directement phytotoxiques pour le trèfle, car il n'y a pas d'accumulation de fer dans la plante, ni pour le champignon car il n'y a pas d'effets sur la croissance du champignon. Cependant, elles pourraient perturber l'excrétion d'une glycoprotéine : la glomaline. Ce phénomène aurait pour conséquence d'empêcher un apport normal de nutriments et donc une diminution de la croissance du trèfle. La diminution de la croissance serait caractérisée par une baisse des activités de trois enzymes impliquées dans le stress oxydant (SOD, CAT, peroxydase).

Marusenko *et al.* (2013) ont, quant à eux, évalué la biodisponibilité de nanoparticules d'hématite (Fe) chez *Arabidopsis thaliana* par une exposition racinaire par support gélosé. Leur travail de recherche suggère que les nanoparticules de fer (dont le diamètre moyen est de 40,9 nm) n'ont pas été internalisées et ne sont donc pas biodisponibles pour ce modèle végétal. Les auteurs concluent que *Arabidopsis*, cultivée sur support gélosé additionné de nanoparticules d'hématites, présenterait des signes de carence en fer. En effet, ces plantes n'étaient pas aussi grandes, contenaient moins de chlorophylle et avaient des concentrations en fer interne inférieures aux plantes cultivées avec du fer lié à de l'EDTA. Ce travail suggère donc que les stratégies d'acquisition du fer à partir de nanoparticules d'hématites par *Arabidopsis thaliana* ont été inefficaces.

Au vu des différents domaines de recherche utilisant les nanoparticules de fer, certains chercheurs souhaitent utiliser les nanoparticules comme « nano-engrais » ou encore « nano-pesticide ». C'est pour cela, que des études s'intéressent à la pénétration

des nanoparticules comme transporteur de substances au niveau des plantes afin d'appliquer, par exemple, un traitement contre une maladie. C'est dans ce contexte que Corredor *et al.* (2009) ont étudié les effets de nanoparticules de fer coatées avec du carbone et ont mis en évidence leur capacité à pénétrer les tissus végétaux et à migrer vers différentes régions de la plante, même si des translocations de courtes distances sont privilégiées. Ces résultats montrent que l'utilisation de particules magnétiques recouvertes de carbone comme vecteurs de substances dans les végétaux est une application envisageable.

Malgré le développement des études sur l'écotoxicité des nanoparticules, il semble encore indispensable de continuer les recherches et de standardiser les méthodes d'analyse de la phytotoxicité des nanoparticules et des nanomatériaux.

3. Les nanoparticules et l’Homme

L’intérêt pour les nanoparticules et le développement de leur utilisation dans différents secteurs d’activités (cf chapitre 1-1) va de pair avec l’étude de leur toxicité. Actuellement, les interactions nanoparticules – organisme humain sont encore peu connues. Les nanoparticules peuvent pénétrer dans l’organisme via différentes voies : cutanée, inhalation, ingestion. Les efforts de recherche au niveau international ont été très notables ces dernières années comme nous pouvons le constater par le nombre croissant de publications dans des revues scientifiques à comité de lecture (Witschger et Fabriès, 2005).

De ce fait, de nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées aux comportements et au devenir des nanoparticules ainsi qu’à leurs effets dans l’organisme après leur inhalation (principale voie de pénétration) (Andujar *et al.*, 2011).

D’autres recherches *in vitro* s’intéressant à la toxicité des nanoparticules sur les cellules pulmonaires humaines se sont développées. Notre étude bibliographique a mis en évidence que ces travaux de recherche s’orientent vers deux objectifs :

- ❖ études de toxicité des nanoparticules comme polluant atmosphérique ;
- ❖ études de toxicité de nanoparticules à visée thérapeutique (nanomédecine).

Pour ce second objectif, durant ces dernières années, les études sur les effets des nanoparticules (NPs) en médecine et en biologie ont augmenté, spécialement pour la bio-imagerie (Jain *et al.*, 2008) ; la bio-détection (Olofsson *et al.*, 2003) et pour la délivrance de médicaments (Dhar *et al.*, 2008 ; Joshi *et al.*, 2006).

Après avoir fait une brève présentation des voies aériennes et des différents types cellulaires pouvant être utilisés en toxicologie, les connaissances sur la toxicocinétique des nanoparticules pénétrées dans l’organisme par inhalation ont été décrits. Puis, nous avons fait un état des lieux de la toxicité des nanoparticules sur les cellules pulmonaires humaines.

3.1. L’arbre trachéo-bronchique, les poumons et les cellules pulmonaires

3.1.1. Les caractéristiques de l’arbre trachéo-bronchique et des poumons

Les particules et nanoparticules inhalées vont passer au niveau de l’arbre trachéo-bronchique en débutant leur parcours au niveau des voies aériennes supérieures pour se terminer au sein des poumons et notamment au niveau des bronches et des alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes supérieures se composent des cavités nasales, des sinus, du pharynx et du larynx. La cavité nasale a pour fonction

de réchauffer et d’humidifier l’air inspiré afin d’éviter le dessèchement des voies aériennes au cours de l’inspiration. Elle assure également, grâce à une muqueuse, une première filtration de l’air inspiré grâce à la présence de nombreux cils qui filtrent les poussières contenues dans l’air. La partie aérienne inférieure allant de la trachée aux bronchioles, assure un rôle de conduction. La trachée se divise en bronches souches qui pénètrent dans les poumons. Elles se ramifient en bronches lobaires au niveau de chaque lobe pulmonaire. Ainsi, au fur et à mesure de leur progression intra-pulmonaire, les bronches se ramifient de manière dichotomique en bronches segmentaires, puis en petites bronches, pour enfin aboutir aux bronchioles. Cette partie aérienne inférieure assure le transport de l’air riche en oxygène jusqu’à la partie alvéolaire des poumons lors de l’inspiration et par la suite d’évacuer l’air riche en dioxyde de carbone par l’expiration (figure 15) (Roux, 2010).

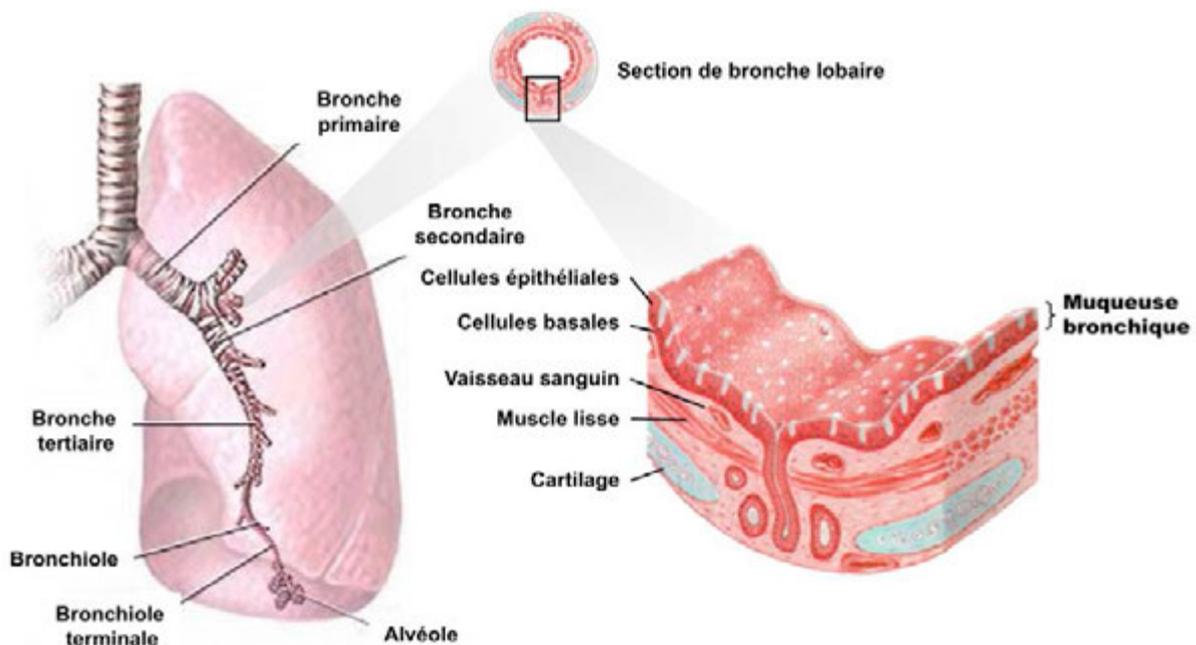


Fig. 15 : Représentation schématique des voies aériennes et des alvéoles humaines (Leclerc, 2011)

L'appareil respiratoire humain est tapissé d'un épithélium dont l'organisation morphologique est différente selon sa localisation dans les voies aériennes. Sa composition cellulaire change en fonction de sa position dans l'arbre respiratoire, et chacune aura des propriétés spécifiques. L'épithélium des voies aériennes inférieures est composé de trois types d'épithelia : l'épithélium bronchique, l'épithélium bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire (Roux, 2010). Nous nous sommes intéressés tout particulièrement à l'épithélium bronchique. En effet, les explants, sur lesquels nous avons travaillé, sont prélevés chirurgicalement sur des patients au niveau des bronches.

Les voies aériennes bronchiques sont recouvertes, quant à elles, d'une muqueuse respiratoire. Elle est constituée d'un épithélium de surface pseudostratifié reposant sur une lame basale et un chorion sous-jacent. La figure 16 présente les différents types cellulaires qui composent cet épithélium de surface bronchique.

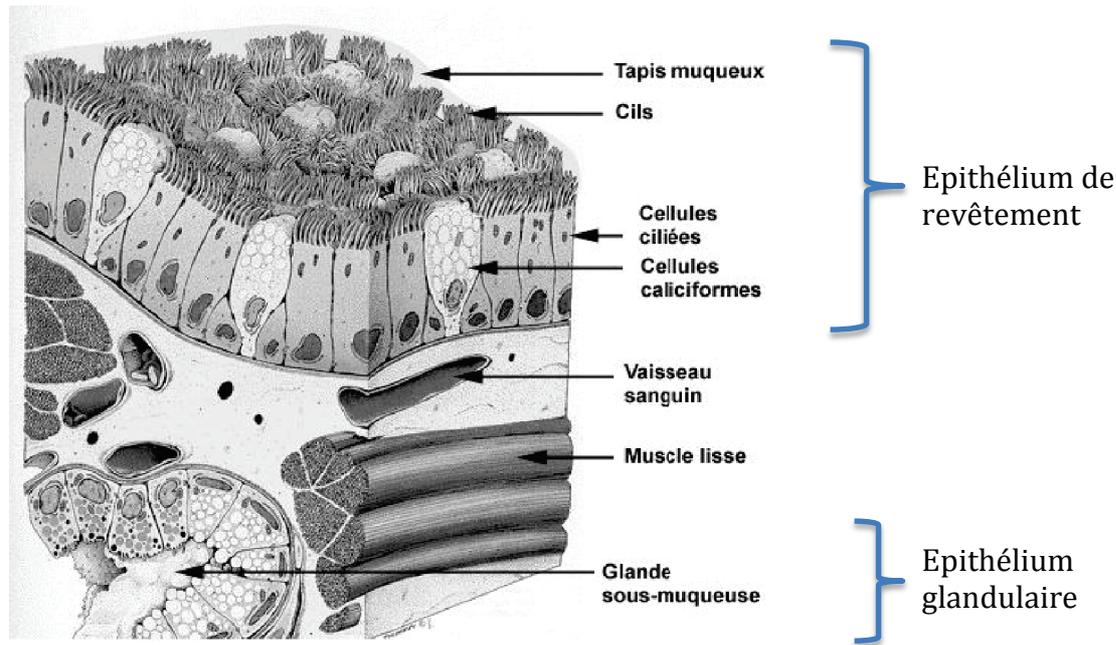


Fig. 16 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéo-bronchique et glandulaire (Roux, 2010)

Les différents types cellulaires de l'épithélium de revêtement ont des caractéristiques et des fonctions particulières. L'épithélium bronchique se compose de :

- ❖ cellules caliciformes ;
- ❖ cellules ciliées ;
- ❖ cellules basales ;
- ❖ cellules intermédiaires ou parabasales.

Les **cellules caliciformes** ou sécrétoires assurent une partie de la sécrétion du mucus. Elles représentent 6 000 à 7 000 cellules par mm^2 (Ellefsen et Tos, 1972). En microscopie électronique, ces cellules ont un noyau cellulaire en position basale, autour duquel s'amassent la plupart des organites qui vont être impliqués dans la synthèse des mucines. La partie apicale est caractérisée par la présence de nombreux granules sécrétoires peu denses aux électrons. Ces granules sont des grains de sécrétion volumineux de 800 nm de diamètre, occupant la majeure partie du cytoplasme (Jeffery et Li, 1997). Le nombre de cellules caliciformes peut augmenter dans certains cas, notamment lorsque l'épithélium respiratoire est agressé par des xénobiotiques.

Les **cellules ciliées**, quant à elles, constituent plus de 56 % de la population cellulaire au sein de l'épithélium respiratoire bronchique et assurent une fonction essentielle dans la clairance mucociliaire par le battement coordonné des cils. Un ratio de cinq cellules ciliées pour une cellule caliciforme peut être observé (Wanner *et al.*, 1996).

Les **cellules basales** représentent approximativement 30 % de la population cellulaire de l'épithélium respiratoire humain bronchique (Rock *et al.*, 2009). Elles sont localisées dans la partie basale de l'épithélium bronchique, en contact direct avec la lame basale, qu'elles recouvrent à 90 % (Mercer *et al.*, 1994). Elles assurent la cohésion de l'épithélium respiratoire bronchique en se liant aux cellules ciliées et caliciformes par les desmosomes (jonctions intercellulaires). Elles sont elles-mêmes solidement ancrées à la **lame basale** par la présence d'hémidesmosomes assurant la stabilité de l'épithélium à la membrane basale (Shebani *et al.*, 2005). Les cellules basales ont un rôle majeur dans la plasticité cellulaire en intervenant lors des processus de régénération et de réparation de l'épithélium respiratoire (Hajj *et al.*, 2007 ; Maouche *et al.*, 2009).

Enfin, les **cellules intermédiaires ou parabasales** constituent 7 % de la population totale des cellules de l'épithélium bronchique. Elles sont localisées entre les cellules basales et cylindriques (Boers *et al.*, 1998). Des observations en microscopie électronique à transmission indique des similitudes morphologiques avec les cellules basales mais leur noyau se situe en position suprabasale. La fonctionnalité de ces cellules n'est pas encore bien définie (Roux, 2010).

Tab. 7 : Liste non exhaustive des différents types de cellules pulmonaires utilisés en culture *in vitro*

Nom	Caractéristiques	Références
Cultures primaires		
NHBE ou HBEC	Cellules saines (non cancéreuses) épithéliales bronchiques humaines	Herzog <i>et al.</i> , 2009a, 2009b; Zhang <i>et al.</i> , 2011; Courcot <i>et al.</i> , 2012 ; Ekstrand-Hammarström <i>et al.</i> , 2012
Lignées immortalisées		
BEAS-2B	Cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées transformées par un adénovirus 12-SV40 hybride	Eom et Choi, 2011 Kim <i>et al.</i> , 2011 Courcot <i>et al.</i> , 2012 Ekstrand-Hammarström <i>et al.</i> , 2012 Gilbert <i>et al.</i> , 2012
16-HBE	Cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées par transfection du gène codant pour le grand antigène T de SV 40.	Keenan <i>et al.</i> , 2009 Belade <i>et al.</i> , 2012 Courcot <i>et al.</i> , 2012 Otero-Gonzalez <i>et al.</i> , 2012
1HAEO	Cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées transformées par un adénovirus 12-SV40	Courcot <i>et al.</i> , 2012
L-132	Cellules alvéolaires embryonnaires humaines transformées par un adénovirus	Courcot <i>et al.</i> , 2012
Lignées cancéreuses		
H727	Cellules épithéliales bronchiques humaines issues d’une tumeur carcinoïde	Courcot <i>et al.</i> , 2012
A549	Cellules épithéliales basales alvéolaires humaines issues d’un adénocarcinome	Muhlfeld <i>et al.</i> , 2008 Konczol <i>et al.</i> , 2011 Courcot <i>et al.</i> , 2012 Khan <i>et al.</i> , 2012
NCIH441	Cellules épithéliales humaines issues d’un adénocarcinome papillaire	Horev-Azaria <i>et al.</i> , 2013
H358	Cellules épithéliales métastatiques humaines issues d’un carcinome bronchio-alvéolaire	Courcot <i>et al.</i> , 2012
Calu-1	Cellules métastatiques humaines issues d’un carcinome épidermoïde	Courcot <i>et al.</i> , 2012
Calu-3	Cellules humaines issues d’un adénocarcinome	Fowler <i>et al.</i> , 2013
H292	Cellules métastatiques humaines issues d’un carcinome pulmonaire mucoépidermoïde	Courcot <i>et al.</i> , 2012
H460	Cellules métastatiques humaines issues d’un carcinome à grandes cellules	Courcot <i>et al.</i> , 2012

3.1.2. Les modèles de cellules pulmonaires *in vitro*

Afin d’étudier les effets de contaminants sur les poumons et la fonction respiratoire, des modèles de cellules pulmonaires humaines *in vitro* sont souvent utilisés (cultures primaires, lignées cellulaires immortalisées ou lignées cancéreuses). Les études expérimentales *in vitro* utilisant des lignées cellulaires ont l’avantage de mettre directement en relation le polluant et sa cible cellulaire, permettant ainsi d’établir une relation dose-effet et d’identifier les mécanismes d’action toxique à l’échelle cellulaire et moléculaire (Courcot, 2012). Différents modèles existent (tableau 7). Précédemment, nous avons pu voir que le dépôt des nanoparticules inhalées au niveau des bronches n’était pas négligeable. Certains auteurs ont donc étudié les effets de nanoparticules sur des cellules épithéliales bronchiques humaines : BEAS-2B (Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012 ; Eom et Choi, 2011 ; Gilbert *et al.*, 2012 ;) et 16HBE (Keenan *et al.*, 2009 ; Belade *et al.*, 2012 ; Otero-Gonzalez *et al.*, 2012). D’autres auteurs ont utilisé des cellules épithéliales bronchiques humaines normales (NHBE) pour étudier l’impact des nanoparticules (Herzog *et al.*, 2009a, 2009b; Zhang *et al.*, 2011; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012).

Afin de mimer la réaction de l’épithélium pulmonaire humain exposé à divers polluants atmosphériques, il est important de choisir un modèle cellulaire dont les capacités métaboliques se rapprochent de celles du tissu pulmonaire sain. Ces capacités métaboliques conditionnent la capacité des cellules à se défendre face aux xénobiotiques. Chez l’homme, l’étude des effets de polluants n’est pas facile à démontrer du fait de l’existence d’une importante variabilité interindividuelle de réponse et de très nombreux facteurs confondants comme le tabagisme, l’alcoolisme, les habitudes alimentaires ou médicamenteuses, qui peuvent gêner l’interprétation des résultats (Courcot *et al.*, 2012). Afin de mimer au mieux la réponse *in vivo*, la culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines issue d’explants de patients semble être la technique la plus appropriée pour évaluer les effets des nanoparticules sur la fonction respiratoire. Lors de l’utilisation de ces cultures primaires, nous nous confrontons à cette variabilité interindividuelle. Cette dernière oblige donc la répétition des expérimentations avec l’utilisation de cellules provenant de différents individus mais elle peut aussi affecter la reproductibilité de ces expérimentations. Elles ont cependant un avantage important car elles permettent de mimer au mieux ce qui se passe au niveau du poumon. En effet, Courcot *et al.* (2012) ont comparé 10 lignées cellulaires pulmonaires (A549, H292, H358, H460, H727, Calu-1, 16HBE, 1HAE0, BEAS-2B et L-132) et 4 cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines avec des tissus pulmonaires humains non-tumoraux. Pour cette étude, ils ont comparé l’expression de 380 gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), les transporteurs et les récepteurs nucléaires définissent les capacités métaboliques de chaque tissu et donc les capacités de défense cellulaire face à l’environnement chimique. L’étude de Courcot *et al.* (2012) a mis en évidence que les cultures primaires de cellules épithéliales

bronchiques avaient plus de similarités (en termes de transcriptome) avec les tissus de la muqueuse bronchique que les dix lignées cellulaires pulmonaires étudiées. Ce modèle de culture primaire semble ainsi plus pertinent pour étudier le métabolisme et la réponse pulmonaire face aux xénobiotiques. Les lignées cellulaires H292 et BEAS-2B peuvent tout de même servir de substitut car ce sont les lignées les plus proches du tissu pulmonaire après les cultures primaires (Courcot *et al.*, 2012).

Puis, pour mimer au mieux le tissu pulmonaire, il est intéressant d’obtenir une différenciation des cellules épithéliales basales des cultures primaires en cellules ciliées et en cellules caliciformes. Pour cela, les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines peuvent être faites en interface air-liquide. De nombreux systèmes d’exposition en interface air-liquide des cellules épithéliales bronchiques ont été décrits dans la littérature (Paur *et al.*, 2011). Selon les différents auteurs (Guggino et Guggino, 2000 ; Lin *et al.*, 2007 ; Lopez-Souza *et al.*, 2009 ; Chan *et al.*, 2010 ; Namkung *et al.*, 2010 ; Pezzulo *et al.*, 2010 ; Cooney et Hickey, 2011), cette méthode de culture permet d’obtenir un épithélium de cellules bronchiques différenciées (figure 17).

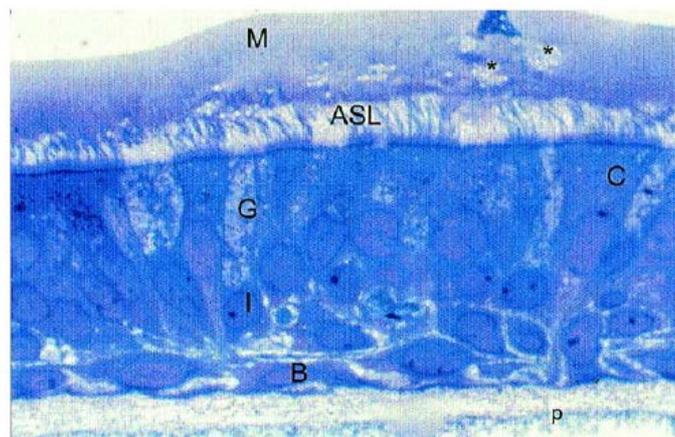


Fig. 17 : Culture primaire d’un épithélium bronchique. Représentation d’une section de culture en interface air-liquide avec la présence de mucus (M), du liquide de surface (ASL), de cellules sécrétoires (G), de cellules ciliées (C), de cellules basales (B), de cellules intermédiaires (I) et la membrane du support de culture (p). Photo de Scott H. Randell. (Guggino et Guggino, 2000)

3.2. Comportement et impacts des nanoparticules chez l'Homme après inhalation

3.2.1. Le dépôt des particules ultra-fines et des nanoparticules dans les voies respiratoires

Les particules et nanoparticules inhalées vont pénétrer dans le corps via les voies respiratoires par le nez et/ou la bouche, puis elles vont se déposer dans les différentes régions pulmonaires : les voies aériennes supérieures, la trachée, les bronches, les bronchioles, les alvéoles.

La probabilité de dépôt se réfère à la probabilité moyenne qu'à une particule inhalée d'un diamètre donné de se déposer à un endroit quelconque le long des voies respiratoires. Le dépôt total est la somme des probabilités de dépôt dans les différentes régions des voies respiratoires (Witschger et Fabriès, 2005). Trois compartiments ont été définis :

- ❖ la région extra-thoracique composée de la bouche, des fosses nasales, du larynx et du pharynx ;
- ❖ l'arbre trachéo-bronchique qui est la zone où le mécanisme d'épuration par le système muco-ciliaire est prépondérant ;
- ❖ et, la région alvéolaire qui comprend les bronchioles terminales et les alvéoles.

Cinq mécanismes de dépôt sont habituellement distingués (Witschger et Fabriès, 2005 ; Andujar *et al.*, 2011):

- ❖ la sédimentation qui est liée à la gravité agissant sur les particules ;
- ❖ l'impaction inertielle, qui caractérise le comportement des particules massives ;
- ❖ l'interception, qui se produit lorsqu'une particule entre en contact avec une surface ;
- ❖ la diffusion, liée au mouvement aléatoire des particules très fines ;
- ❖ et, l'attraction électrostatique lorsque les particules sont chargées.

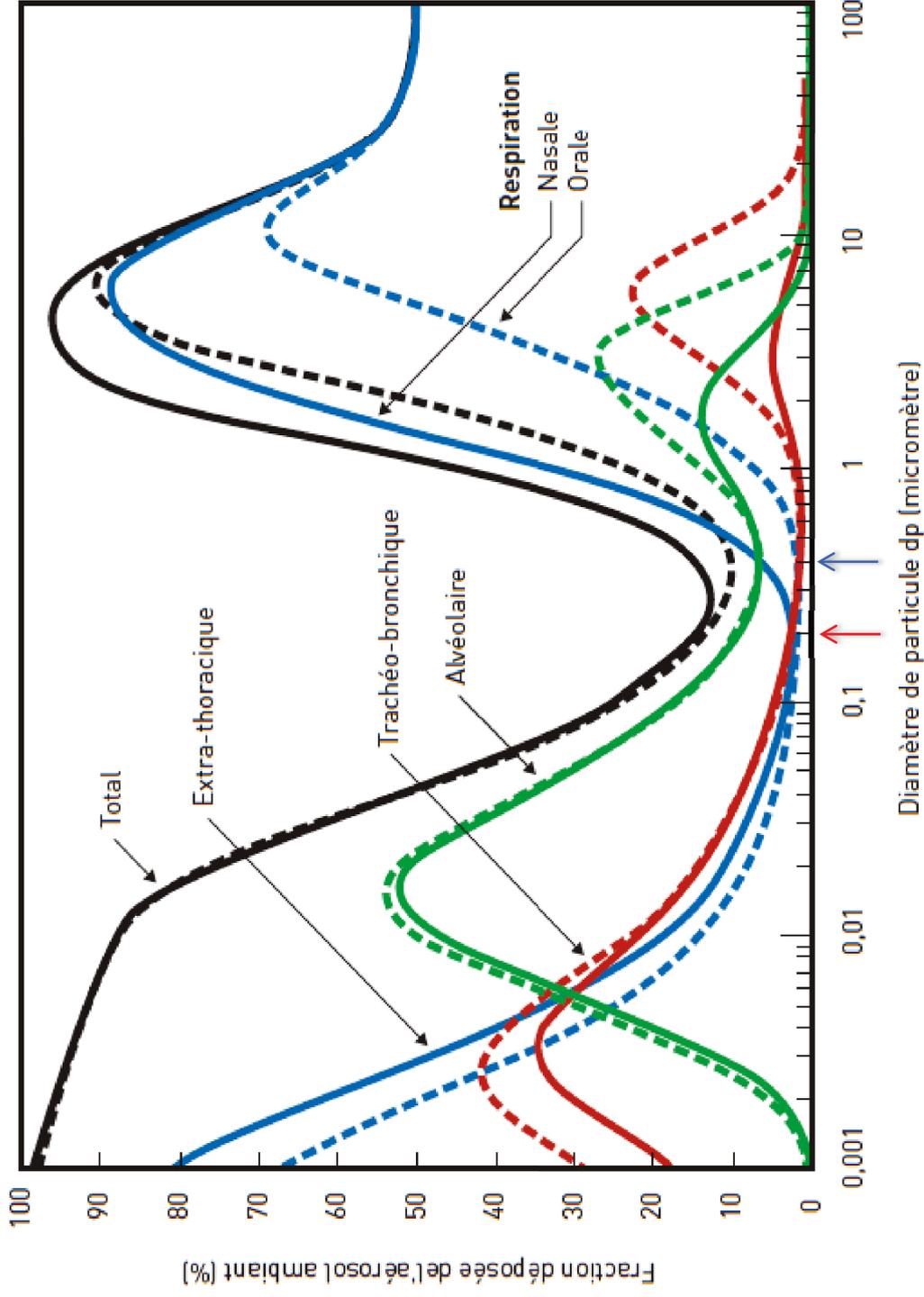
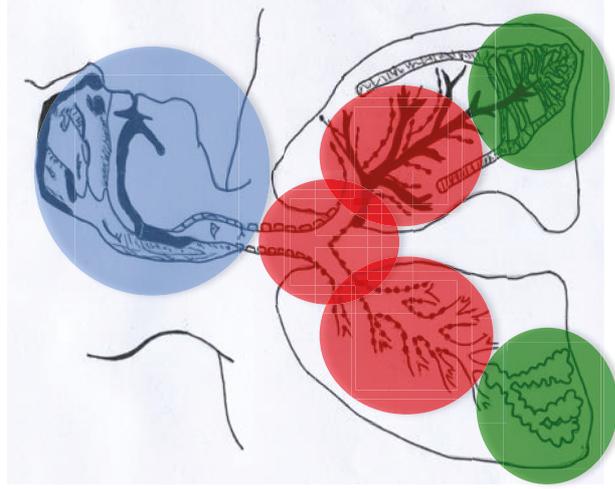


Fig. 18 : Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires chez l'Homme en fonction de leur taille - Flèche rouge : 200 nm - Flèche bleue : 400 nm (CIPR, 1994, Witschger et Fabriès, 2005)

Les caractéristiques des nanoparticules, en particulier leur taille, vont influencer leur dépôt dans les voies respiratoires. La figure 18 présente le dépôt total et régional des particules en fonction de leur taille, calculé selon le modèle de la Commission Internationale de Protection Radioprotection (CIPR). Ces courbes correspondent à un sujet de référence respirant majoritairement par la bouche ou le nez et passant 1/3 de son temps assis et 2/3 de son temps dans une activité « légère » ou un travail « standard » selon les critères de la CIPR. Ces courbes montrent, tout d’abord, que le dépôt est minimal pour les particules de **200 nm** (figure 19 ; flèche rouge) à **400 nm** (figure 19 ; flèche bleue). Il est de l’ordre de 20%, ce qui signifie que 80 % des particules inhalées seront rejetées dans l’air expiré. En effet, ces particules de **300 nm** de moyenne sont trop grosses pour que le mécanisme de diffusion soit important et trop petites pour que l’impaction et la sédimentation aient un effet. En deçà de cette taille, le dépôt croît par le mécanisme de diffusion. Ainsi, les particules comprises entre **10 nm** et **200 nm** se déposent principalement dans la région alvéolaire avec un dépôt bronchique non négligeable. Les particules de **5 nm** se déposent de manière uniforme dans les trois régions des voies aériennes supérieures. En deçà de ces **5 nm**, les particules se déposent essentiellement dans les voies aériennes supérieures et dans une moindre mesure dans la région trachéo-bronchique par diffusion (Witschger et Fabriès, 2005 ; AFSSET, 2006).

Le dépôt des particules peut aussi être influencé par la morphologie de l’arbre respiratoire, le rythme respiratoire et les paramètres physiologiques qui varient de façon importante en fonction des individus et de leur activité physique. Différents facteurs comme l’âge, le sexe et les syndrômes de types obstructifs et restrictifs (asthme, BPCO...) peuvent altérer la structure « normale » et le fonctionnement des voies respiratoires (Witschger et Fabriès, 2005 ; Andujar *et al.*, 2011).

3.2.2. Distribution, métabolisation et excrétion des nanoparticules dans le corps humain

3.2.2.1 Rétention des nanoparticules dans les poumons

La rétention des nanoparticules au niveau des poumons dépend évidemment de la taille des particules mais aussi de la capacité de clairance pulmonaire. Comparées aux particules micrométriques de même composition chimique, les nanoparticules inhalées montrent une rétention pulmonaire plus importante. Cette rétention est aussi influencée par des pathologies obstructives sous-jacentes comme l’asthme et la BPCO (Kim et Kang, 1997 ; Pietropaoli *et al.*, 2004).

3.2.2.2 Clairance des nanoparticules au niveau du tissu pulmonaire

Les particules et nanoparticules déposées au niveau des voies aériennes peuvent en être éliminées via deux mécanismes. Le premier est un mécanisme physique qui correspond à la clairance mucociliaire qui élimine les particules jusqu’au pharynx où elles peuvent être avalées, phagocytées par les macrophages où transférées à travers

l'épithélium. L'escalator mucociliaire est prépondérant pour les particules provenant des régions trachéo-bronchiques et naso-pharyngées. La phagocytose par les macrophages se produit surtout pour les particules insolubles provenant des régions trachéo-bronchiques et alvéolaires. Ces macrophages sont ensuite éliminés via la clairance mucociliaire et éliminés par le tractus gastro-intestinal (Martinet *et al.*, 1999 ; Andujar *et al.*, 2011). Mais ce mécanisme semble moins efficace pour les nanoparticules non agglomérées comparées aux particules de taille micrométrique, une accumulation de ces nanoparticules ayant pu être observée (Tabata et Ikada, 1988 ; Green *et al.*, 1998). Certaines études *in vitro* ont mis en évidence que la présence de nanoparticules en grand nombre avait un effet délétère sur la phagocytose (Lundborg *et al.*, 2001 ; Renwick *et al.*, 2001) qui pouvait être dû au stress oxydant induit par les particules (Donaldson *et al.*, 2000). L'efficacité de ces mécanismes dépend des caractéristiques des nanoparticules avec la taille et la forme comme principaux critères. Le second mécanisme est un mécanisme chimique qui inclut la dissolution des particules solubles, la lixiviation et le couplage aux protéines. L'élimination se fait ensuite par la circulation sanguine et le système lymphatique (Andujar *et al.*, 2011).

3.2.2.3 Translocation et distribution des nanoparticules dans l'organisme

Comme le montre la figure 19, les particules ultrafines peuvent se déposer de manière non négligeable au niveau de la région extra-thoracique et notamment dans la région rhino-pharyngée en respiration nasale. Face à ce constat, des auteurs se sont intéressés à la translocation de ces nanoparticules au niveau de l'encéphale (Oberdorster *et al.*, 2004 ; Witschger et Fabriès, 2005 ; Landsiedel *et al.*, 2012 ; Sharma et Sharma, 2012 ; Petitot *et al.*, 2013). Certaines études *in vivo* mettent en évidence une translocation de différentes nanoparticules (Au, C¹³, TiO₂) vers le cerveau, notamment par le nerf olfactif (Oberdorster *et al.*, 2004). Cette hypothèse a aussi été émise par Oberdörster *et al.* en 2004 suite à une exposition de rats à des nanoparticules de C¹³. Dans leur étude, Oberdörster *et al.* (2004) ont émis une seconde hypothèse selon laquelle une translocation des nanoparticules pourrait se produire via la circulation sanguine et traverser la barrière hémato-encéphalique. Parallèlement, Sharma et Sharma (2012) ont mis en évidence le passage de la barrière hémato-encéphalique de différents types de nanoparticules selon différents mécanismes. Ces derniers peuvent être directs ou indirects en agissant sur les fonctions de la membrane des capillaires composées de cellules endothéliales possédant des jonctions serrées, entraînant la rupture de ces jonctions ou augmentant la perméabilité de cette membrane (Lanone et Boczkowski, 2006 ; Sharma *et al.*, 2009). De plus, selon ces mêmes auteurs, les nanoparticules pourraient également stimuler le transport vésiculaire pour accéder au micro-environnement du système nerveux central, mais aussi produire des radicaux libres pouvant entraîner la rupture de cette barrière hémato-encéphalique, et induire une neurotoxicité.

En plus de ce passage de la barrière hémato-encéphalique, plusieurs auteurs ont étudié le passage de nanoparticules dans la circulation sanguine et le système lymphatique (Kreyling *et al.*, 2002 ; Oberdörster *et al.*, 2002 ; Oberdörster *et al.*, 2005 ; Möller *et al.*, 2008). Ainsi, certaines études ont mis en évidence une rapide translocation des différentes nanoparticules des poumons à l’ensemble de l’organisme via la circulation sanguine (Kreyling *et al.*, 2002 ; Oberdörster *et al.*, 2002 ; Oberdörster *et al.*, 2005). Similairement, en 2013, Kreyling *et al.* ont précisé que la fraction des nanoparticules transférées était plutôt faible et dépendait beaucoup de leurs caractéristiques. Certains travaux ont indiqué que la liaison avec des protéines pouvait jouer un rôle essentiel dans cette translocation à travers les membranes cellulaires et les barrières des organes. Nemmar *et al.* (2002) ont étudié la translocation de nanoparticules de carbone radio-marquées inhalées par les volontaires sains. Ces nanoparticules ont été retrouvées dans le sang, le foie, la vessie et dans d’autres zones du corps.

A l’inverse, Möller *et al.* (2008) n’ont pas mis en évidence de translocation systémique significative lors de leur étude du dépôt, de la rétention et de la translocation de nanoparticules de carbone radio-marquées inhalées par les patients en bonne santé non-fumeurs, des fumeurs asymptomatiques et des patients atteints de BPCO. Les nanoparticules inhalées sont longtemps retenues au niveau des poumons et s’y accumulent. La clairance mucociliaire n’a pas permis d’éliminer toutes les parties déposées dans les voies aériennes et elle est diminuée chez les fumeurs et les patients atteints de BPCO.

Malgré tout, il est raisonnable de s’attendre à ce que les nanomatériaux inhalés puissent atteindre différents organes du corps (Andujar *et al.*, 2011).

3.2.2.4 Métabolisation des nanoparticules

Il existe peu d’études sur la métabolisation des nanoparticules. Selon Landsiedel *et al.* (2012), la plupart des nanoparticules ne sont pas métabolisées. En revanche, certaines d’entre-elles peuvent avoir adsorbé des substances à leur surface. Ces dernières peuvent être métabolisées séparément après leur clivage.

Ainsi, ces auteurs affirment qu’il n’existe pas d’indication d’une dégradation claire de nanoparticules de fullerènes et de silice (Landsiedel *et al.*, 2012) ; et des nanotubes de carbone (observés en MET) semblent rester intacts dans les urines de souris (Singh *et al.*, 2006). De même, plusieurs auteurs ne semblent pas avoir mis en évidence de métabolisation des nanotubes de carbone marqués (taurine C-14) et de nanosphères de polystyrène marquées (isothiocyanate de fluorescéine) (respectivement Deng *et al.*, 2007 ; Ogawara *et al.*, 1999).

A l'inverse, quelques études ont reporté un métabolisme des nanoparticules. En 1994, Okon *et al.* ont reporté que chez les rats exposés à des oxydes de fer supraparamagnétiques contenant des nanoparticules de magnétite dextran, du fer nonsupraparamagnétique a été relâché. De même, en 2010, Liu *et al.* ont mis en évidence que des SWCNT (nanotube de carbone à simple paroi) avec leur surface carbonylée subissent une dégradation (sous 90 jours) dans un milieu simulant l'action phagolysosomique conduisant à une réduction de la longueur et de l'accumulation de ces nanoparticules. Ces nanotubes non-traités, traités avec de l'ozone ou encore modifiés par des composés aryl-sulfonés ne se dégradent pas sous l'action phagolysosomique. Suite à cela, les auteurs attribuent la dégradation à la chimie unique de l'acide carboxylique introduisant des groupes COOH de surface mais provoque aussi des dommages collatéraux à l'ossature tubulaire des nanotubes fournissant des points d'attaque pour une nouvelle dégradation oxydative.

3.2.2.5 Excrétion des nanoparticules

Certaines études se sont intéressées à l'excrétion des nanoparticules via la bile, les fèces ou encore l'urine (Sung *et al.*, 2011 ; Landsiedel *et al.*, 2012 ; Balasubramanian *et al.*, 2013). Cependant, les études via une exposition par inhalation ne sont pas nombreuses. En revanche, certaines traitent de cette étape d'excrétion suite à une exposition par voie intraveineuse ou orale (Baek *et al.*, 2012 ; Sakurai *et al.*, 2012 ; Tseng *et al.*, 2012).

En 2013, Balasubramanian *et al.* ont étudié la biodistribution de nanoparticules d'or chez le rat exposé par inhalation. Dans cette étude, après avoir mis en évidence la distribution des nanoparticules à différents organes (cœur, reins, etc.), ils ont observé une élimination via les macrophages et l'excrétion fécale comme la principale voie d'excrétion des nanoparticules.

En 2012, dans leur étude des effets de nanoparticules de Fe₃O₄ sur les rats, Tseng *et al.* ont montré que ces nanoparticules administrées par voies intraveineuses sont transférées au cœur et à d'autres organes. Après avoir atteint des organes riches en macrophages, les nanoparticules sont phagocytées et biodégradées. Les métabolites issus de ces nanoparticules sont transportés par le sang des organes aux reins pour être éliminées par l'urine. Une augmentation de la charge en fer dans le foie et la rate a aussi été observée. Des augmentations des taux de fer sérique après l'injection des nanoparticules ont été accompagnées de l'augmentation du niveau de la transferrine dans le sérum et le nombre de globules rouges dans le sang.

Sakurai *et al.* (2012) se sont intéressés à la biodistribution de nanoparticules d'iodure d'argent enrobées de silice injectées chez le rat. Ils ont mis en évidence la présence de ces nanoparticules au niveau du foie et de la rate mais pas au niveau de la vessie, suggérant ainsi une élimination par la bile et non par l'urine. Ils ont aussi conclu

que l’enrobage des nanoparticules joue un rôle essentiel dans leur distribution et leur excrétion permettant une excrétion biliaire.

Enfin, en 2012, Baek *et al.* ont étudié la distribution aux organes et l’excrétion de nanoparticules d’oxyde de zinc (ZnO) chez le rat exposé par voie orale. Ils ont mis en évidence une augmentation de la concentration plasmatique en nanoparticules de ZnO de manière dose-dépendante. Ces nanoparticules sont ensuite distribuées à différents organes comme le foie, les poumons et les reins. La cinétique d’élimination montre qu’une petite partie des nanoparticules de ZnO est éliminée via l’urine mais que la plus grande part est éliminée via les fèces.

Finalement, nous pouvons dire que la translocation et la cinétique d’élimination des nanoparticules restent des questions complexes qu’il est difficile d’étudier expérimentalement. Cela explique l’obtention de résultats contradictoires. Cependant, il semble évident que des mécanismes particuliers sont mis en place dans le cas de la toxico-cinétique des nanoparticules (Witschger et Fabriès, 2005).

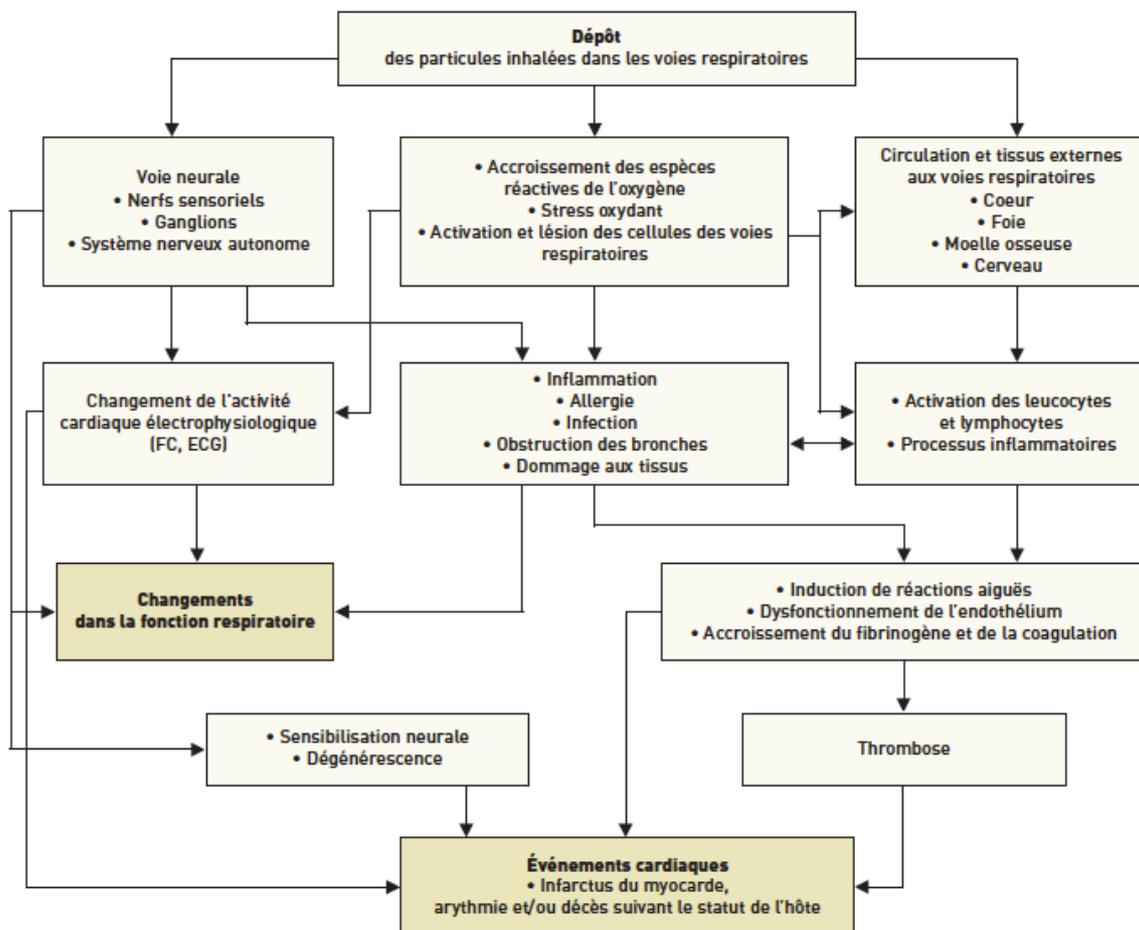


Fig. 19 : Hypothèse concernant les effets sur la santé des particules fines et nanoparticules de l’aérosol ambiant d’après Kreyling *et al.* (2004) (Witschger et Fabriès, 2005)

3.2.3. Les effets potentiels des nanoparticules sur l'organisme humain

Des études récentes ont montré que l'exposition aux polluants atmosphériques particulaires est associée à un risque accru de morbidité et de mortalité lié à des maladies respiratoires et cardiovasculaires (Corbo *et al.*, 1993 ; Ostro *et al.*, 1993 ; Schwartz, 1994 ; Gamble *et al.*, 1996 ; Spuny, 1998 ; Abbey *et al.*, 1999 ; Künzli *et al.*, 2000 ; Brunekreef et Holgate, 2002 ; Hoek *et al.*, 2002 ; Aga *et al.*, 2003 ; Jerrett *et al.*, 2005 ; Gutiérrez *et al.*, 2006 ; Viegi *et al.*, 2006 ; Dominici *et al.*, 2007 ; Pui *et al.*, 2008 ; Pope *et al.*, 2009). Afin d'étudier les effets potentiels des nanoparticules sur l'organisme humain, des études toxicologiques et épidémiologiques ont été menées.

Afin de pouvoir évaluer les effets des nanoparticules sur l'organisme humain, des études de toxicité sont nécessaires. Les travaux de ces dernières décennies ont permis de mettre en évidence des effets sur différentes fonctions et différents organes. La figure 19 résume les conséquences possibles liées aux particules fines et ultra-fines (ou nanoparticules) déposées sur l'épithélium des voies respiratoires et montre bien la complexité de ce domaine de recherche.

Les études épidémiologiques ne permettent pas d'élucider les mécanismes biologiques qui entrent en jeu dans l'apparition des effets des particules et nanoparticules chez l'Homme mais elles permettent de clarifier la relation existante entre l'exposition aux nanoparticules, leurs doses et leurs effets. Certains travaux ont permis de mettre en évidence des effets délétères de ces polluants, notamment sur la fonction respiratoire et le système cardio-vasculaire. Il existe de nombreuses études épidémiologiques liées aux effets des particules mais elles s'intéressent principalement à la pollution particulaire atmosphérique urbaine ou péri-urbaine pour laquelle le spectre granulométrique des particules en suspension est large (Witschger et Fabriès, 2005). Cependant, toutes ces études ne sont pas concluantes quant aux effets des particules ultra-fines (Englert, 2004). En effet, l'utilisation de données d'exposition agrégées et non individuelles expliquerait en grande partie la difficulté pour conclure les études. Les plus anciennes analyses se sont focalisées sur les effets des particules PM₁₀ (fines particules) mais depuis ces dernières décennies, l'intérêt s'est aussi porté sur la fraction PM_{2,5} avant de s'attarder sur les effets des particules ultra-fines ou nanoparticules. Cependant, les informations, relatives aux expositions nanoparticulaires et leurs effets sur la santé sont limités (Englert, 2004). Avec la complexité de l'arbre trachéo-bronchique, les particules et nanoparticules inhalées sont en contact régulier avec les cellules de l'épithélium bronchique et donc susceptibles, à terme, de favoriser l'émergence de pathologies inflammatoires chroniques (asthme, BPCO, etc.).

L'ensemble des études de toxicité relatives aux nanoparticules a mis en évidence des effets et des mécanismes particuliers non connus pour les particules de tailles supérieures (Witschger et Fabriès, 2005). C'est dans ce contexte qu'une nouvelle catégorie de la toxicologie : la nanotoxicologie (Oberdörster *et al.*, 1990) a été proposé

au niveau international, Il est donc important d’adapter les recherches concernant la toxicité des nanoparticules, notamment par leur caractérisation pour mieux comprendre la relation entre taille, réactivité de surface et translocation. Ainsi, les différents résultats épidémiologiques et toxicologiques remettent en cause la pratique courante d’évaluation de l’exposition habituellement retenue en santé environnementale puisqu’ils suggèrent que la métrique « surface » et, dans une moindre mesure la métrique « nombre » devraient constituer de bien meilleurs indicateurs d’exposition que la métrique « masse » (Witschger et Fabriès, 2005).

Suite à ces différentes études toxicologiques, certaines hypothèses ressortent quant aux effets toxicologiques des nanoparticules (Witschger et Fabriès, 2005) :

- ❖ comme nous l’avons dit précédemment, leur surface, leur composition et leur structure sont les caractéristiques qui jouent un rôle essentiel dans les interactions avec les différentes cellules cibles, fluides et tissus de l’organisme (Monteiller *et al.*, 2007 ; Andujar *et al.*, 2011 ; Ferreira *et al.*, 2013) ;
- ❖ elles sont à l’origine de la formation d’espèces radicalaires (Bhattacharya *et al.*, 2009 ; Watanabe *et al.*, 2013) qui ont un rôle essentiel dans les processus inflammatoires (Monteiller *et al.*, 2007 ; Mühlfeld *et al.*, 2008 ; Brandenberger *et al.*, 2010 ; Suliman *et al.*, 2013) ;
- ❖ elles ont une activité oxydante plus forte et sont la cause d’effets inflammatoires plus importants que les particules de taille supérieure (Patil *et al.*, 2012) ;
- ❖ elles sont probablement impliquées dans des dommages de l’ADN cellulaire (Kim *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012 ; Watanabe *et al.*, 2013) ;
- ❖ elles affectent les fonctions cardiaques, l’homéostasie vasculaire et l’immunité (Ferreira *et al.*, 2013).

Ainsi, différentes études ont permis de mettre en évidence que les caractéristiques physico-chimiques qui leurs sont propres et leurs comportements dans l’atmosphère les différencient des autres polluants particulaires et influencent leur toxico-cinétique, jouant sur leurs dépôts au niveau des voies aériennes, leurs translocations et leur devenir au sein de l’organisme.

3.3. Les effets des nanoparticules sur les cellules pulmonaires

3.3.1. La pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires

L’étude concernant la pénétration cellulaire des nanoparticules est une étape importante avant l’analyse de leurs effets. Des auteurs ont analysé et visualisé leur internalisation au sein de différents types de cellules pulmonaires (A549, BEAS-2B, NHBE) (Konczol *et al.*, 2011; Paur *et al.*, 2011 ; Bhattacharya *et al.*, 2012 ; Ekstrand-Hammarstrom *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Watanabe *et al.*, 2013).

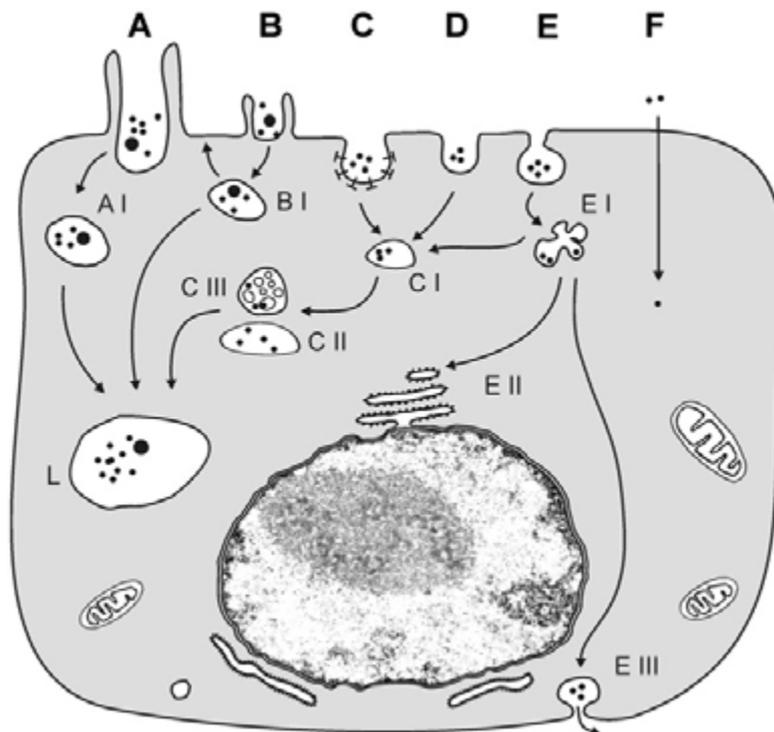


Fig. 20 : Mécanismes d'absorption cellulaire des nanoparticules et translocation intracellulaire liés: (A) La phagocytose, un mécanisme utilisant l'actine se produisant principalement dans les phagocytes, conduisant à des phagosomes (AI) et phago-lysosomes (L). (B) La macropinocytose, également une voie utilisant l'actine, englobant les nanoparticules, conduisant à des macropinosomes (BI) qui pourraient être exocytés ou fusionnés avec les lysosomes (L). (C) L'endocytose avec la clathrine, associée à la formation d'un réseau de clathrine et en fonction de la GTPase, formant des endosomes primaires (CI) et endosomes tardifs (CII), y compris des corps multivesiculaires (CIII). (D) Les clathrines et cavéoles indépendantes des voies d'endocytose. (E) Cavéoles et endocytose, formant des caveosomes (EI), qui fusionnent avec le réticulum endoplasmique (EII) ou passent à travers la membrane cellulaire (EIII). (F) La diffusion des particules/transport à travers la membrane plasmique apicale, conduisant à des particules situées librement dans le cytosol. D'après Brandenberger *et al.* (2010) (Paur *et al.*, 2011).

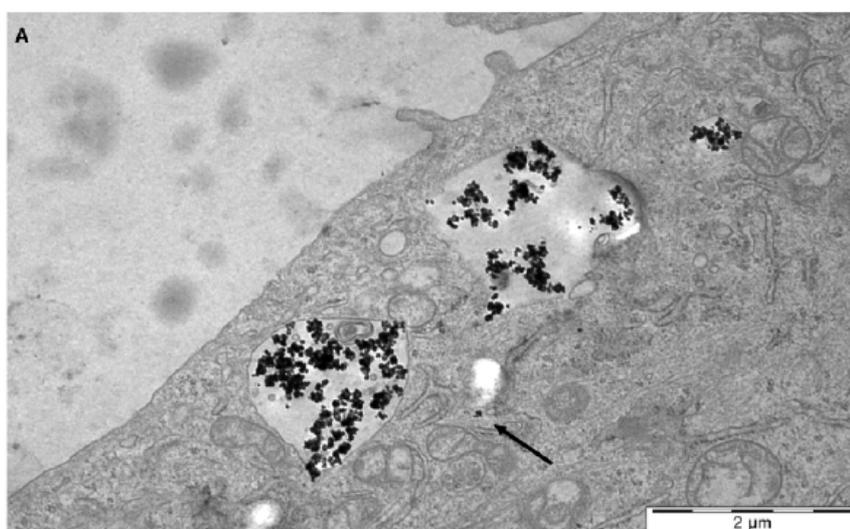


Fig. 21 : Cellules A549 observées au MET après 24h d'exposition à des nanoparticules de magnétite ($10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Konczol *et al.*, 2011).

Certaines études ont permis de décrire les mécanismes d'internalisation cellulaire de ces nanoparticules. Premièrement, il convient de rappeler que la membrane plasmique des cellules est une structure dynamique qui sépare le milieu intracellulaire de l'environnement extracellulaire, en coordonnant l'entrée et la sortie des petites et des grosses molécules. Les petites molécules sont capables de traverser la membrane plasmique pulmonaire par l'action de protéines membranaires intégrées à des pompes ou canaux, les macromolécules pénètrent, quant à elles, dans la cellule grâce à des vésicules d'endocytose. Ce processus est appelé endocytose et deux types d'endocytose sont distingués sur la base de la taille des vésicules formées : la pinocytose qui implique l'ingestion de liquide et de molécules par l'intermédiaire de petites vésicules (< 0,15 µm de diamètre) alors que la phagocytose implique l'ingestion de particules de grande taille tels que les microorganismes et les débris cellulaires, par la formation de grandes vésicules appelées phagosomes (généralement > 0,25 µm de diamètre) (Paur *et al.*, 2011). Les différents mécanismes d'internalisation des nanoparticules au niveau cellulaire ont été discutés en détail par diverses reviews (Mühlfeld *et al.*, 2008 ; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2009a, 2009b; Unfried *et al.*, 2007). Les différents mécanismes sont présentés dans la figure 20. La cinétique de tous les procédés dépend en grande partie des propriétés de surface des nanoparticules ainsi que des modifications de surface produites *in vivo*, par exemple Oberdorster *et al.* (2005) cite des interactions avec les protéines endogènes (Paur *et al.*, 2011).

Plus particulièrement, la pénétration de nanoparticules de fer a pu être vérifiée par différents auteurs au niveau de différents types cellulaires A549 (Berg *et al.*, 2010 ; Konczol *et al.*, 2011 (figure 21) ; Watanabe *et al.*, 2013), BEAS-2B (Bhattacharya *et al.*, 2012). Mais à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la pénétration de nanoparticules de fer au sein de NHBE.

Certains auteurs se sont également intéressés à la pénétration cellulaire des nanoparticules en travaillant avec des co-cultures (figure 22) (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2008 ; Brandenberger *et al.*, 2010 ; Muller *et al.*, 2010).

En effet, Rothen-Rutishauser *et al.* (2008) ont étudié la pénétration de nanoparticules de TiO₂ au niveau de co-cultures composées de cellules épithéliales (A549), de macrophages et de cellules dendritiques (dérivés de monocytes) (figure 23). Ils ont mis en évidence la présence de nanoparticules au niveau de ces trois types cellulaires.

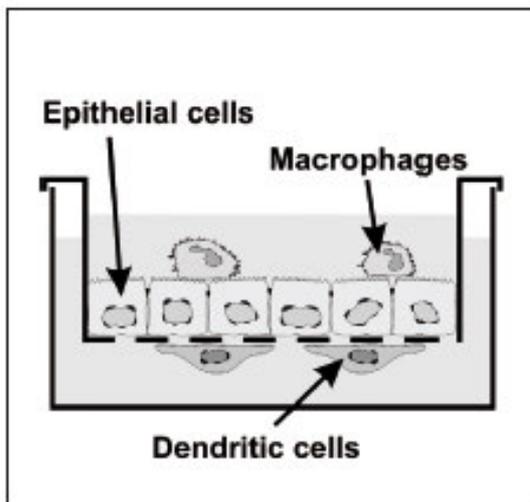


Fig. 22 : Exemple de modèle de co-culture d'une barrière de l'épithélium pulmonaire humain composée de cellules épithéliales (A549), de macrophages et de cellules dendritiques (dérivés de monocytes humain) (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2008)

De même, Brandenberger *et al.* (2010) ont travaillé avec un modèle *in vitro* mimant l'épithélium alvéolaire exposé en interface air-liquide, utilisant des cellules A549, des macrophages et des cellules dendritiques (dérivés de monocytes humain) et ont visualisé la pénétration des nanoparticules d'or (Au) au sein de ces trois types cellulaires. La même année, Muller *et al.* (2010) ont aussi utilisé ce modèle de co-culture afin d'évaluer les effets de nanoparticules provenant d'une combustion (particules d'échappement de diesel) et de nanoparticules manufacturées de TiO₂ et de nanotubes de carbone (SWCNTs). Suite à cette étude, ils ont pu, en outre, démontrer la pénétration de chaque type de nanoparticules dans chaque type cellulaire.

Enfin, en 2013, Ramos-Godínez *et al.* ont été plus loin en étudiant les effets de nanoparticules de TiO₂ sur un modèle *in vitro* de co-culture mimant l'interface alvéolo-capillaires en utilisant des monocytes (U937), des cellules pulmonaires (A549) et des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVECs). Leurs résultats ont montré une activation indirecte des cellules endothéliales suite à une exposition des pneumocytes aux nanoparticules de TiO₂. Ainsi, même si les mécanismes moléculaires ne sont pas encore définis, ces résultats ont mis en évidence une communication entre les pneumocytes et les cellules endothéliales suite à une exposition des pneumocytes à des nanoparticules.

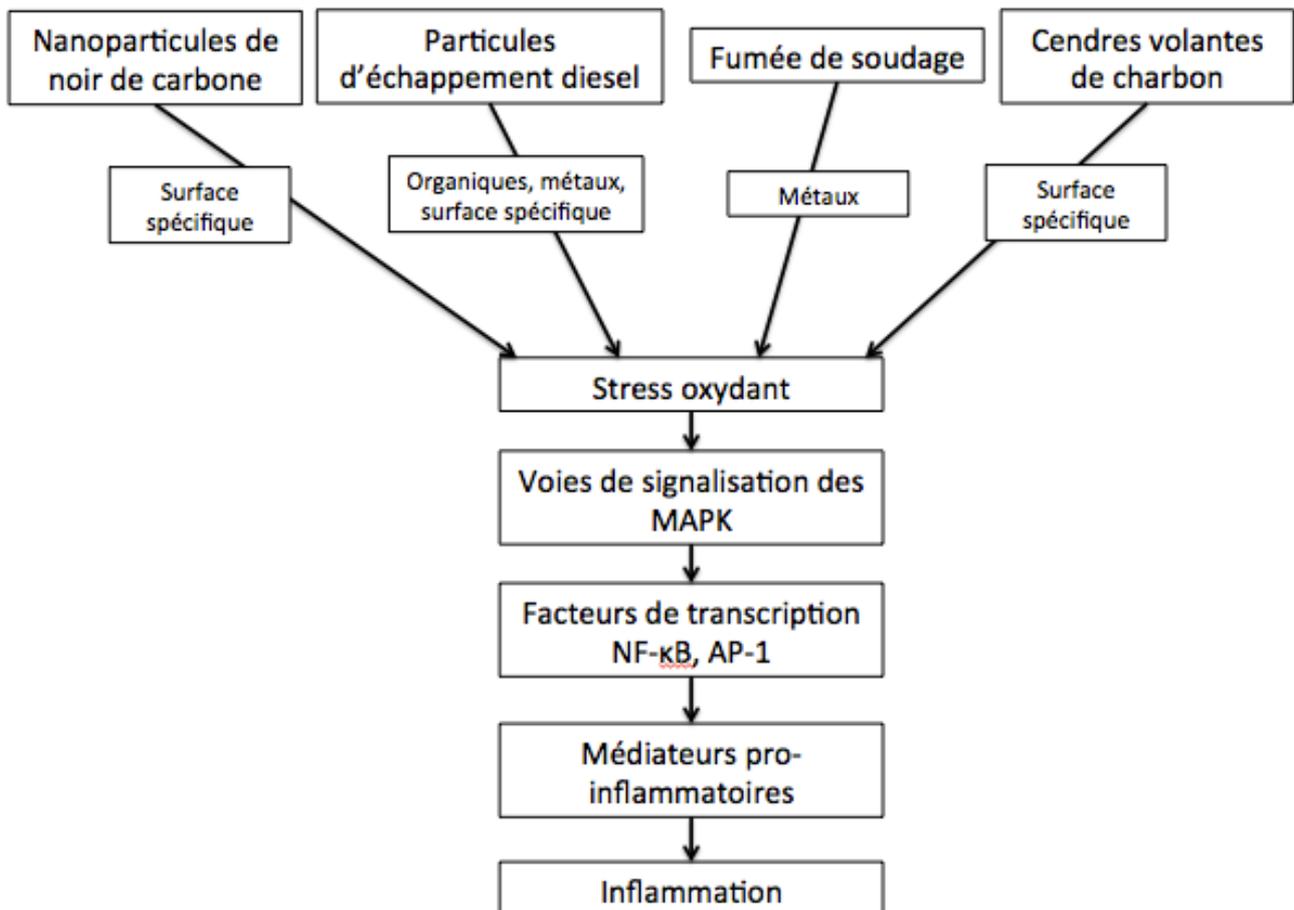


Fig. 23 : Schéma montrant la voie conduisant à l'inflammation suite à une exposition de particules et nanoparticules induisant une inflammation provoquée dans un premier temps par un stress oxydant. Schéma repris d'après Donalson *et al.* (2005).

3.3.2. La « nanotoxicité » sur les cellules pulmonaires

Les études sur la toxicité des nanoparticules ou « nanotoxicité » (Oberdörster *et al.*, 2005) sont nombreuses et s'intéressent à différents effets : viabilité cellulaire, inflammation, stress oxydant avec notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), génotoxicité et/ou modulation de l'expression génique (annexe 3).

La viabilité cellulaire est un des paramètres souvent utilisés pour évaluer la toxicité des nanoparticules. Suite à une exposition, un effet cytotoxique a été constaté (dosage de l'ATP, dosage de la lactate déshydrogénase, test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)) sur différents modèles de cellules pulmonaires (Monteiller *et al.*, 2007 ; Foldberg *et al.*, 2011 ; Horev-Azaria *et al.*, 2013 ; Sahu *et al.*, 2013) et notamment suite à une exposition à des nanoparticules de fer (Bhattacharya *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2012). Cependant, Sayes *et al.* (2007) ont observé des résultats plus mitigés concernant cette cytotoxicité sur cellules épithéliales pulmonaires de rats. En effet, certaines nanoparticules semblent ne pas induire de cytotoxicité sauf à fortes doses. De même, Watanabe (2013) n'a montré qu'une cytotoxicité suite à une exposition de cellules A549 à des nanoparticules de Fe₃O₄ concentrées à 100 µg.ml⁻¹ mais pas à des concentrations inférieures. Enfin, Lenz *et al.* (2013) n'ont pas mis en évidence de cytotoxicité de nanoparticules de ZnO sur des cellules A549 exposées en culture classique et en interface air-liquide.

Un des principaux effets observé suite à une exposition nanoparticulaire est l'activation de facteurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) ou le TNFα (Monteiller *et al.*, 2007 ; Baktur *et al.*, 2011 ; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012 ; Patil *et al.*, 2012) mettant ainsi en évidence que les nanoparticules ne sont pas inertes pour l'organisme humain.

Ensuite, la majorité des auteurs sont unanimes sur le fait qu'une exposition à des nanoparticules entraîne une production de ROS au niveau des cellules pulmonaires (Eom and Choi, 2011 ; Kim *et al.*, 2011 ; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012 ; Suliman *et al.*, 2013). Il y a un consensus que l'induction de ROS et de RNS est un événement clé dans les réponses cellulaires suivant une exposition nanoparticulaire (Donaldson *et al.*, 2005 (figure 23) ; Keenan *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2011 ; Bhattacharya *et al.*, 2012). Ce phénomène est également observable suite à une exposition à des nanoparticules de fer (Keenan *et al.*, 2009 ; Konczol *et al.*, 2011 ; Bhattacharya *et al.*, 2012 ; Watanabe *et al.*, 2013). En revanche, certains auteurs ont mis en évidence que cette induction de ROS peut être plus ou moins rapidement contrôlée (Wang *et al.*, 2012).

Parallèlement à l’évaluation de la production de ROS, certains auteurs se sont aussi intéressés à d’autres marqueurs témoignant d’un stress oxydant. Parmi ces marqueurs, nous pouvons citer ceux appartenant aux systèmes antioxydants enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase, etc.) (Park *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2011 ; Ahamed *et al.*, 2010 ; Lenz *et al.*, 2013) et non enzymatiques (glutathion réduit ou GSH) (Monteiller *et al.*, 2007 ; Ahamed *et al.*, 2011 ; Ahamed *et al.*, 2011 ; Patil *et al.*, 2012 ; Watanabe *et al.*, 2013) mais aussi des marqueurs témoignant d’une peroxydation lipidique (malondialdéhyde ou MDA) (Ahamed *et al.*, 2010 ; Patil *et al.*, 2012).

Un des domaines de recherche également investigué en nanotoxicologie concerne la génotoxicité. Divers effets génotoxiques ont été mis en évidence après une exposition à diverses nanoparticules : la production d’adduit à l’ADN comme la 8-OHdG (Bhattacharya *et al.*, 2009 ; Watanabe *et al.*, 2013) ; l’augmentation de la dégradation de la molécule d’ADN, mis en évidence par le test des comètes (Kim *et al.*, 2011 ; Konczol *et al.*, 2011 ; Bhattacharya *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012) ou celle des chromosomes mis en évidence par le test micronoyaux (Kim *et al.*, 2011 ; Patil *et al.*, 2012). Certains auteurs ont même mis en évidence que les effets génotoxiques peuvent être différents en fonction du type de nanoparticules. Par exemple, Bhattacharya *et al.* (2009) ont observé que les nanoparticules d’hématite étaient génotoxiques pour les BEAS-2B et les IMR90 en utilisant le test des comètes mais qu’il n’y avait pas de formation d’adduit à l’ADN (8-OHdG). Par contre, les nanoparticules de TiO₂ induisent des résultats inverses.

Enfin, certains auteurs se sont focalisés sur l’impact de nanoparticules sur la modulation de l’expression de gènes de cellules pulmonaires. A notre connaissance, il existe peu de publications sur le sujet et aucune étude impliquant des nanoparticules de fer n’a pu être mise en évidence. Cependant, certaines publications ont montré une modulation d’un ensemble de gènes impliqués notamment dans les processus inflammatoires ou du stress oxydant (Arenz *et al.*, 2006 ; Monteiller *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2008 ; Foldbjerg *et al.*, 2012 ; Sahu *et al.*, 2013). A l’inverse, d’autres auteurs n’ont pas observé d’effets sur la modulation de l’expression de gènes suite à une exposition nanoparticulaire (Brandenberger *et al.*, 2010).

Dans tous les cas, des contradictions dans la littérature peuvent être observées concernant les effets d’un même type de nanoparticules, mettant bien en évidence l’importance de la prise en compte des caractéristiques des nanoparticules mais aussi les conditions d’exposition et le type cellulaire étudié.

4. Bilan du chapitre 1

Ce premier chapitre a permis de situer la thèse dans le contexte actuel du développement des nanotechnologies mais aussi dans celui de la pollution atmosphérique liée aux nanoparticules. En effet, ces dernières se retrouvent de plus en plus disséminées dans l'environnement intentionnellement ou non intentionnellement. Face à ce constat, les problématiques de recherche liées aux impacts des nanoparticules et des particules ultra-fines sur les écosystèmes et la santé humaine sont en plein essor.

Dans ce contexte de nouvelles disciplines sont apparues :

- ❖ la « *Plant nanotoxicology* », qui a pour objectif d'étudier les effets et les mécanismes de toxicité des nanoparticules chez les plantes ;
- ❖ la « nanotoxicologie », branche de la toxicologie appliquée aux nanoparticules.

Ces dernières années, les recherches liées à ces disciplines se sont multipliées.

Concernant la « *Plant nanotoxicology* » :

- ❖ Les études se sont surtout focalisées sur des expositions racinaires de végétaux supérieurs, les expositions foliaires sont plus limitées.
- ❖ A notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur des végétaux inférieurs que sont les bryophytes.
- ❖ La pénétration inter- et intracellulaire de différentes nanoparticules au sein des végétaux a été démontrée par plusieurs auteurs mais les mécanismes sont encore méconnus.
- ❖ Parmi, les mécanismes à l'origine de la phytotoxicité des nanoparticules, le stress oxydant est un candidat majeur.
- ❖ Différentes études ont aussi pu mettre en évidence des effets délétères aux niveaux de la croissance et du métabolisme des plantes, des effets liés au stress oxydant ainsi que des effets cytotoxiques et/ou génotoxiques.

Dans le domaine de la nanotoxicologie :

- ❖ Les études ont mis en évidence des mécanismes de pénétration, d'adsorption, de métabolisation et d'élimination spécifiques aux nanoparticules.
- ❖ De nombreuses études se sont focalisées sur les effets des contaminants au niveau de cellules pulmonaires, l'inhalation étant la principale voie d'exposition.
- ❖ Même si la plupart des scientifiques travaillent sur des cellules tumorales A549, il est important d'étudier leurs effets sur des types cellulaires permettant de mimer les mécanismes présents au niveau du tissu pulmonaire.

- ❖ Ces études ont montré des effets liés à viabilité cellulaire, à l'inflammation, à la mise en place d'un stress oxydant avec notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à des effets génotoxicité et/ou à une modulation de l'expression génique.

Ces disciplines sont des domaines de recherches complexes de par les propriétés particulières des nanoparticules et nanomatériaux. Ces dernières années les études se sont multipliées démontrant ou non la toxicité de ces nouveaux contaminants. Des résultats discordants ont alors mis en évidence l'importance de la caractérisation des nanoparticules mais aussi d'autres paramètres expérimentaux.

Notre analyse bibliographique a permis de mettre en évidence que chaque expérimentation peut être considérée comme unique au vu de l'importance des différents paramètres à prendre en compte pour mener des études correctes dans ces domaines de recherches :

- ❖ la caractérisation des nanoparticules à leur état brut mais aussi dans leur milieu de dispersion, ce dernier pouvant modifier les caractéristiques et donc la réactivité des nanoparticules ;
- ❖ les conditions d'expositions (temps, doses, voies d'exposition, etc.) ;
- ❖ les modèles biologiques (espèces, caractéristiques et stade de développement).

C'est en prenant en prenant en compte les différentes spécificités et problématiques liées aux nanoparticules que nous avons mené ces travaux de recherche sur les effets de nanoparticules manufacturées de fer sur des modèles biologiques, végétal et humain.

5. Références bibliographiques

- Abbey, D.E., Nishino, N., McDonnell, W.F., Burchette, R.J., Knutsen, S.F., Lawrence Beeson, W. & Yang, J.X.** 1999. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(2): 373-382.
- Aga, E., Samoli, E., Touloumi, G., Anderson, H.R., Cadum, E., Forsbergz, B., Goodman, P., Goren, A., Kotesovec, F., Kriz, B., Macarol-Hiti, M., Medina, S., Paldy, A., Schindler, C., Sunyer, J., Tittanen, P., Wojtyniak B., Zmirou, D., Schwartz, J. & Katsouyanni, K.** 2003. Short-term effects of ambient, particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur Respir J Suppl*, 40: 28-33.
- Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, AlSalhi MS, Alrokayan SA.** 2011. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*, 283(2-3): 101-108.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B. & Alhadlaq, H.A.** 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2): 578-583.
- Alagic, S.C., Serbula, S.S., Tosic, S.B., Pavlovic, A.N. & Petrovic, J.V.** 2013. Bioaccumulation of Arsenic and Cadmium in Birch and Lime from the Bor Region. *Arch Environ Contam Toxicol*, DOI 10.1007/s00244-013-9948-7
- Alguacil, M.M., Torrecillas, E., Caravaca, F., Fernandez, D. A., Azcon, R. & Roldan, A.** 2011. The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy-metal-polluted soil. *Soil Biol. Biochem*, 43(7): 1498–1508.
- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F. & Domingos, M.** 2011. The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histo-cytochemical techniques. *Environmental Pollution*, 159: 3309-3315.
- AFSSET, 2006.** Les nanomatériaux : Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Maisons-Alfort, AFSSET, 253p.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P. & Boczkowski, J.** 2009. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Revue Maladies Respiratoires*. 26: 625-637.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P. & Boczkowski, J.** 2011. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Revue des Maladies Respiratoires*, 28: e66-e75.
- Arenz, A., Hellweg, C.E., Stojicic, N., Baumstark-Khan, C. & Grotheer, H.H.** 2006. Gene Expression Modulation in A549 Human Lung Cells in Response to Combustion-Generated Nano-Sized Particles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1091: 170–183, doi: 10.1196/annals.1378.064.

- Auffan, M.** 2007. Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. PhD. thesis, Université Paul Cézanne, Faculté des Sciences et Techniques.
- Auffan, M., Shipley, H.J., Yean, S., Kan, A.T., Tomson, M., Rose, J. & Bottero, J-Y.** 2007, Nanomaterials as adsorbents, *In Environmental nanotechnology – applications and impacts of nanomaterials* ed. M.R. Wiesner and J-Y. Bottero, pp 371-392.
- Baek, M., Chung, H.E., Yu, J., Lee, J.A., Kim, T.H., Oh, J.M., Lee, W.J., Paek, S.M., Lee, J.K., Jeong, J., Choy, J.H. & Choi, S.J.** 2012. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7: 3081-3097.
- Balasubramanian, S.K., Poh, K.W., Ong, C.N., Kreyling, W.G., Ong, W.Y. & Yu, L.E.** 2013. The effect of primary particle size on biodistribution of inhaled gold nano-agglomerates. *Biomaterials*, 34(22):5439-5452.
- Baktur, R., Patel, H. & Kwon, S.** 2011. Effect of exposure conditions on SWCNT-induced inflammatory response in human alveolar epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 1153-1160
- Barandovski, L., Cekova, M., Frontasyeva, M.V., Pavlov, S.S., Stafilov, T., Steinnes, E. & Urumov, V.** 2008. Atmospheric deposition of trace element pollutants in Macedonia studied by the moss biomonitoring technique. *Environ Monit Assess*, 138: 107-118.
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sanchez, A. & Puentes, V.** 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75: 850-857.
- Battke, F., Leopold, K., Maier, M., Schidhalter, U. & Schuster, M.** 2008. Palladium exposure of barley uptake and effects. *Plant biology*, 10: 272-276.
- Belade, E., Armand, L., Martinon, L., Kheuang, L., Fleury-Feith, J., Baeza-Squiban, A., Lanone, S., Billon-Galland, M.A., Pairon, J.C. & Boczkowski, J.** 2012. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol In Vitro*, 26(1): 57-66.
- Berg, J.M., Ho, S., Hwang, W., Zebda, R., Cummins, K., Soriaga, M.P., Taylor, R., Guo, B., Sayes, C.M.** 2010. Internalization of carbon black and maghemite iron oxide nanoparticle mixtures leads to oxidant production. *Chem Res Toxicol*, 23(12): 1874-82.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P.F., Hoffmann, E. & Dopp, E.** 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(17): doi:10.1186/1743-8977-6-17.

- Bhattacharya, K., Hoffmann, E., Schins, R.F., Boertz, J., Prantl, E.M., Alink, G.M., Byrne, H.J., Kuhlbusch, T.A., Rahman, Q., Wiggers, H., Schulz, C. & Dopp, E.** 2012. Comparison of micro- and nanoscale Fe⁺³-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicol Sci*, 126(1): 173-82.
- Boers, J.E., Ambergen, A.W. & Thunnissen, F.B.** 1998. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 157 (6 Pt 1): 2000-2006.
- Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank ; F., Gehr P. & Muhlfeld, C.** 2009. Particles induce apical plasma membrane enlargement in epithelial lung cell line depending on particle surface area dose. *Respir. Res.*, 10: 22.
- Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Muhlfeld, C., Schmid, O., Ferron, G.A., Maier, K.L., Gehr, P. & Lenz, A.G.** 2010. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1): 56-65.
- Brunekreef, B. & Holgate, S.T.** 2002. Air pollution and health. *Lancet*, 360(9341):1233-1242.
- Burklew, C.E., Ashlock, J., Winfrey, W.B. & Zhang, B.** 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PLOS One*, 7(5): e34783.
- Card, J.W. & Magnuson, B.A.** 2010. A Method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology*, 29(4): 402-410.
- CITEPA**, 2012. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz a effet de serre en France – Series sectorielles et analyses étendues. CITEPA, Paris, 336 p.
- Chai, L., Wang, Y., Zhai, N., Yang, W. & You, X.** 2013. Sulfate-doped Fe₃O₄/Al₂O₃ nanoparticles as a novel adsorbent for fluoride removal from drinking water. *Water research*, 47: 4040-4049.
- Chan, R.W.Y., Yuen, K.M., Yu, W.C.L., Ho, C.C.C., Nicholls, J.M., Peiris, J. S. M. & Chan, M.C.W.**, 2010. Influenza H5N1 and H1N1 Virus Replication and Innate Immune Responses in Bronchial Epithelial Cells Are Influenced by the State of Differentiation. *PLoS ONE*, 5(1): e8713. doi:10.1371/journal.pone.0008713.
- Chen, J., Shao, R., Zhang X.D. & Chen C.** 2013. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2677-2688.
- Cheng, W., Ping, Y., Zhang, Y., Chuang, K.H. & Liu, Y.** 2013. Magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for tumor diagnosis. *J Healthc Eng*, 4(1):23-45.

- Cho, W.S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J.** 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 16–24.
- Choel, M.** 2005. Analyse quantitative des particules atmosphériques par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie d'émission X. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en Chimie analytique de l'Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, 209p.
- Choi, S.J., Oh, J.M. & Choy, J.H.** 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 463-471.
- Commisariat de l'Energie Atomique**, Du monde macroscopique au nanomonde, ou l'inverse...[2005] [accessed Aout 2013]. Available at: [www.cea.fr/content/download/3168/15109/file/tableau-A.pdf](http://www cea.fr/content/download/3168/15109/file/tableau-A.pdf)
- Commission Internationale pour la Protection Radiologique (CIPR)**, 1994. Publication 66: Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford, Pergamon, 24(1-3), 482 p.
- Comité de la Prévention et de la Précaution**, 2006. Nanotechnologies, nanoparticules - Quels dangers, quels risques ?. Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris, 64p.
- Cooney D.J. & Hickey A.J.** 2011. Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction. *Toxicology in vitro*, 25: 1953-1965.
- Corbo, G.M., Forastiere, F., Dell'Orco, V., Pistelli, R., Agabiti, N., De Stefanis, B., Ciappi, G. & Perucci, C.A.** 1993. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol* 92(4): 616-23.
- Corredor, E., Testillano, P.S., Coronado, M.J., Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Marquina, C., Ibarra, M.R., M De La Fuente, J., Rubiales, D., Perezde- Luque, A. & Risueño, M.C.**, 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *BMC Plant Biology*, 9(45): doi:10.1186/1471-2229-9-45.
- Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F. & Lo-Guidice, J.M.** 2012. Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(10), 1953-1965
- Denayer, F.O.** 2000. Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes, Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. PhD thesis, Université de Metz.

- Deng, X., Jia, G., Wang, H., Sun, H., Wang, X., Yang, S., Wang, T. & Liu, Y.** 2007. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon*, 45: 1419–1424.
- Dhar, S., Reddy, E.M., Shiras, A., Pokharkar, V. & Prasad B.L.** 2008. Natural gum reduced/stabilized gold nanoparticles for drug delivery formulations. *Chemistry*, 14: 10244–10250.
- Dietz, K.J. & Herth, S.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11): 582-589.
- Dominici, F., Peng, R.D., Zeger, S.L., White, R.H. & Samet, J.M.** 2007. Particulate air pollution and mortality in the United States: did the risks change from 1987 to 2000? *Am J Epidemiology*, 166(8): 880- 888.
- Donaldson, K., Stone, V., Gilmour, P.S. Brown, D.M. & Macnee, W.** 2000. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Phil. Trans. R. Soc. London. A.358*: 2741-2749.
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W. & Stone, V.** 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 2(10): doi:10.1186/1743-8977-2-10
- Doshi, R., Braida, W., Christodoulatos, C., Wazne, M. & O'Connor, G.** 2008. Nano-aluminum: transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environ Res*, 106: 296–303.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. & Goldbach, H.E.** 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiology Plant*, 134: 151-160.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C.M., Andersson, P.O., Lejon, C., Österlund, L. & Bucht, A.** 2012. Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*, 6(6): 623–634.
- Ellefsen, P. & Tos, M.** 1972. Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae. *Anatomischer Anzeiger*, 130(5): 501-520.
- Englert, N.** 2004. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters* 149: 235–242.
- Eom, H.J. & Choi, J.** 2011. SiO₂ Nanoparticles Induced Cytotoxicity by Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cell, Beas-2B. *Environmental Health and Toxicology*, 26: e2011013.

- Faburé, J.**, 2009. Etude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 301p.
- Faburé, J., Meyer, C., Denayer, F., Gaudry, A., Gilbert, D. & Bernard, N.** 2010. Accumulation capacities of particulate matter in an acrocarpous and a pleurocarpous moss exposed at three differently polluted sites (industrial, urban and rural). *Water Air Soil Pollution*, 212: 205-217.
- Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A.A., Al-Khedhairi, A.A., Hegazy, A.K. & Musarrat J.** 2013. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. *Journal of Hazardous Materials*, 250– 251: 318– 332
- Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J. & Lin, X.** 2013. The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environmental Science and Technology*, 47: 9496-9504.
- Fernandez, V. & Eichert, T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews Plant Sciences*, 28: 36–68.
- Ferreira, A.J., Cemlyn-Jones, J. & Robalo-cordero, C.** 2013. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. *Rev Port Pneumol*, 19(1): 28-37.
- Foldbjerg, R., Dang, D.A. & Autrup, H.** 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*, 85(7): 743-50.
- Foldbjerg, R., Irving, E.S., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Thorsen, K., Autrup, H. & Beer, C.**, 2012. Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicological sciences*, 130(1): 145–157.
- Fontan, J., Masclat, P., Montagne, X., Quisefit, J-P., Tymen, G. & Weill, A.** 2005. Les particules : caractérisation pour les problèmes de santé. *Pollution atmosphérique*, 188: 469-474.
- Fowler, R., Vllasaliu, D., Falcone, F.H., Garnett, M., Smith, B., Horsley, H., Alexander, C. & Stolnik, S.** 2013. Uptake and transport of B12-conjugated nanoparticles in airway epithelium. *J Control Release*, 172(1):374-381.
- Gamble, J.F. & Lewis, R.J.** 1996. Health and respirable particulate (PM10) air pollution: a causal or statistical association? *Environ Health Perspect*, 104(8): 838-850.
- Gao, F.Q., Hong, F.H., Liu, C., Zheng, L., Su, M.Y., Wu, X., Yang, F., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Mechanism of nano-anatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach - Inducing complex of Rubisco-Rubisco activase. *Biological Trace Element Research*, 111(1-3): 239-253.

- Gao, F.Q., Liu, C., Qu, C.X., Zheng, L., Yang, F., Su, M.G. & Hong, F.H.** 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO₂ treatment related to the changes of Rubisco activase? *Biometals*, 21(2): 211-217.
- Gao, Y.Q., Gao, N.Y., Deng, Y., Gu, J.S., Shen, Y.C. & Wang, S.X.** 2012. Adsorption of microcystin-LR from water with iron oxide nanoparticles. *Water Environ Res*, 84(7): 562-8.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E. & Shirali, P.** 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology in vitro*, 20: 519-528.
- Garrec, J.P. & Van Haluwyn, C.** 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air*. Tech&Doc., Lavoisier.
- Ghafariyan, M.H., Malakouti, F.J., Dadpour, M., Stroeve, P. & Mahmoudi, M.** 2013. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. *Environ. Sci. Technol*, DOI: 10.1021/es402249b.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10): 1253-1262.
- Ghosh, M., J, M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research*, 749: 60-69.
- Gilbert, B., Fakra, S.C., Xia, T., Pokhrel, S., Mädler, L., Nel, A.E.** 2012. The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 6(6): 4921-30.
- Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Coronado, M.J., Corredor, E., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D. & Perezde-Luque, A.,** 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101: 187-195.
- Goodman, C.M., Mccusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M.** 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.*, 15: 897-900.
- Green, T.R., Fisher, J., Stone, M.H., Wroblewski, B.M. & Ingham, E.** 1998. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages *in vitro*. *Biomaterials*, 19: 2297-2302.

- Guggino, W.B. & Guggino, S.E.** 2000. Amiloride-sensitive sodium channels contribute to the woes of the flu. *PNAS*, 97(18): 9827–9829.
- Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrián-García, M.E., De Vizcaya-Ruiz, A., Sordo-Cedeño, M. & Ostrosky-Wegman, P.** 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen*, 47: 199–211.
- Hajj, R., Lesimple, P., Nawrocki-Raby, B., Birembaut, P., Puchelle, E. & Coraux, C.** 2007. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *The Journal of Pathology*, 211(3): 340-350.
- Handy, R.D., Owen, R. & Valsami-Jones, E.** 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315-325.
- Hassan, S.E.D., Boon, E., St-Arnaud, M. & Hijri, M.** 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol. Ecol*, 20(16): 3469–3483.
- Hervé-Bazin, B.** 2007. Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?. EDP Sciences.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Casey, A., Davoren, M., Lenz, A.G., Maier, K.L., Duschl, A. & Oostingh, G.J.** 2009a. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 234(3): 378-90.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A., Oostingh, G.J.** 2009b. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 276–281.
- Hilger, I. & Kaiser, W.A.** 2012. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine*, 7(9): 1443-1459.
- Hoek, G, Brunekreef, B, Goldbohm, S, Fischer, P. & Van den Brandt, P.** 2002. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*, 360 (9341): 1203-1209.
- Horev-Azaria, L., Baldi, G., Beno, D., Bonacchi, D., Golla-Schindler, U., Kirkpatrick, J.C., Kolle, S., Landsiedel, R., Maimon, O., Marche, P.N., Ponti, J., Romano, R., Rossi, F., Sommer, D., Uboldi, C., Unger, R.E., Villiers, C. & Korenstein, R.** 2013. Predictive toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative in-vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Part Fibre Toxicol*, 10: 32.

- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J.** 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19: 975–983.
- INERIS**, 2007. Nanotechnologies, Nanomatériaux, Nanoparticules, Quels impacts ? sur l'homme et l'environnement. INERIS, Verneuil en Halatte, 20p.
- INRS**, 2012. Les nanomatériaux. INRS, 52P.
- Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A.** 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc. Chem. Res.*, 41: 1578–1586.
- Jeffery, P.K. & Li, D.**, 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology.*, 10(7): 1655-1662.
- Jerrett, M., Buzzelli, M., Burnett, R.T. & DeLuca, P.F.** 2005. Particulate air pollution, social confounders, and mortality in small areas of an industrial city. *Soc Sci Med*, 60 (12): 2845-2863.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P.** 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res*, 11: 77-89. DOI: 10.1007/s11051-008-9446-4.
- Jiang, W., Chen, X., Niu, Y. & Pan, B.** 2012. Spherical polystyrene-supported nano-Fe₃O₄ of high capacity and low-field separation for arsenate removal from water. *Journal of Hazardous Materials*, 243: 319– 325.
- Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V. & Sastry, M.** 2006. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir*, 22: 300–305.
- Kaveh, R., Li, Y.S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L. & Van Aken, B.** 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, DOI: 10.1021/es402209w.
- Keenan, C.R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. & Sedlak, D.L.** 2009. Oxidative Stress Induced By Zero-Valent Iron Nanoparticles And Fe(II) In Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Sciences And Technology*, 43: 4555-4560.
- Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A.H., Chauhan, L.K.S. & Ahmad, I.** 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33: 1477-1488.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z.R., Watanabe, F. & Biris, A.S.** 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10): 3221-3227.

- Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Nedosekin, D.A., Dervishi, E., Biris, A.S., Shashkov, E.V., Galanzha, E.I. & Zharov, V.P.** 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3): 1028-1033.
- Kim, C.S. & Kang, T.C.** 1997. Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 55: 899-905.
- Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M. & Chung, K.H.** 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat Res*, 726(2): 129-135.
- Klancnik, K., Drobne, D., Valant, J. & Dolenc Koce, J.** 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 85-92.
- Konczol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski R., Giere, R., Grobety, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. & Mersch-Sundermann, V.** 2011. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 1460-1475.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Moller, W.** 2006. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J. Aerosol Med.*, 19: 74-83.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S. & Moller, W.** 2013. differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Accounts of Chemical Research*, 46(3): 714-722.
- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., Ziesenis, A.** 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health*, 65: 1513-30.
- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V. & Yadav, S.K.** 2013. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environment*, 461-462: 462-468.
- Kumari, M., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N.** 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of Total Environment*, 407 : 5243-5246.
- Künzli, N., Kaiser, R., Medina, S., Studnicka, M., Chanel, O., Filliger, P., Herry, M., Horak, F. Jr., Puybonnieux-Textier, V., Quénel, P., Schneider, J., Seethaler, R., Vergnaud, J.C., Sommer, H.** 2000. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*, 356 (9232): 795-801.

- Kwon, Y.M., Xia, Z., Glyn-Jones, S., Beard, D., Gill, H.S., Murray, D.W.** 2009. Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages *in vitro*. *Biomed. Mater.*, 4.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C.** 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, *In* : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux, Masson, Paris, 1-9.
- Lamaison, L.** 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
- Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., White, J. C. & Vanek, T.** 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of Hazardous Materials*, 241–242: 55–62.
- Landsiedel, R., Fabian, E., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Wohlleben, W., Wiench, K. & Oesch, F.** 2012. Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol*, 86: 1021-1060.
- Lanone, S. & Boczkowski, J.** 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials, molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.*, 6(6): 651-663.
- Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., Jorgensen, T.J.** 2010. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics*. 4: 873–886.
- Larue, C.** 2011. Impact de nanoparticules de TiO₂ et de nanotubes de carbone sur les végétaux. Thèse pour l'obtention de grade de docteur d'AgroParisTech, Paris, 296p.
- Larue, C., Khodja, H., Herlin-Boime, N., Brisset, F., Flank, A.M., Fayard, B., Chaillou, S. & Carrière, M.** 2011. Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. *Journal of Physics: Conference Series*, 304: 1-7.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard B., Flank, A.M., Brisset, F. & Carrière, M.** 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*, 431: 197–208.
- Ledoux F.** 2003. Les aérosols particuliers atmosphériques sur le Dunkerquois: caractérisations chimiques, physiques, spectroscopiques et évaluation de leur toxicité. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque.

- Lee, B., Sarin, L., Johnson, N.C. & Hurt, R.H.** 2009. A Nano-Selenium Reactive Barrier Approach for Managing Mercury over the Life-Cycle of Compact Fluor. *Environ Sci Technol*, 43(15): 5915–5920.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J. & Alvarez P.J.** 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem*, 29(3): 669–675.
- Lenz, A.G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K.L., Eickelberg, O., Stoeger, T. & Schmid, O.** 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Res Int*, 2013: 652632.
- Lin, D. & Xing, B.** 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243–250.
- Lin, D. & Xing, B.** 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 42: 5580-5585.
- Lin, H., Li, H., Cho, H.J., Bian, S., Roh, H.J., Lee, M.K., Kim, J.S., Chung, S.J., Shim, C.K. & Kim D.D.** 2007. Air-Liquid Interface (ALI) Culture of Human Bronchial Epithelial Cell Monolayers as an *In Vitro* Model for Airway Drug Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(2): 341-350.
- Lin, K.S., Dehvari, K., Liu, Y.J., Kuo, H. & Hsu, P.J.** 2013. Synthesis and characterization of porous zero-valent iron nanoparticles for remediation of chromium-contaminated wastewater. *J Nanosci Nanotechnol*, 13(4): 2675-2681.
- Liu, X., Hurt, R.H. & Kane, A.B.** 2010. Biodurability of single-walled carbon nanotubes depends on surface functionalization. *Carbon*, 48: 1961–1969.
- Lodenus, M.** 2013. Use of plants for biomonitoring of airborne mercury in contaminated areas. *Environmental Research*, 125: 113–123.
- López-Moreno, M.L., De la Rosa, G., Hernández-Viezcás, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ Sci Technol.*, 44(19): 7315–7320.
- Lopez-Souza, N., Favoreto, S., Wong, H., Ward, T., Yagi, S., Schnurr, D., Finkbeiner, W.E., Dolganov, G.M., Widdicombe, J.H., Boushey, H.A. & Avila P.C.** 2009. *In vitro* susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin. Immunol.*, 123 (6): 1384-1390.
- Lovern, S.B. & Klaper, R.** 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25: 1132–1137.

- Lundborg, M., Johard, U., Lastrm, L., Gerde, P. & Camner, P.** 2001. Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environmental Research Section A*, 86: 244-253.
- Lv, L.Z., Tong, C.Q., Yu, J., Han, M. & Gao, J.Q.** 2013. Mechanism of enhanced oral absorption of hydrophilic drug incorporated in hydrophobic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2709-2717.
- Ma, H., Phillip, L. Williams, P.L., Stephen, A. & Diamond, S.A.** 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. & Kolmakov, A.** 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408: 3053–3061.
- Machado, S., Stawinski, W., Slonina, P., Pinto, A.R., Grosso, J.P., Nouws, H.P.A., Albergaria, J.T. & Delerue-Matos, C.** 2013. Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen *Science of the Total Environment*, 461–462: 323–329.
- Manier N.** 2008. Etude d'un nouveau modèle biologique végétal (*Trifolium repens*) en écotoxicologie, applicable aux sols contaminés par les métaux lourds. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 313p.
- Martinet, Y., Anthoine, D. & Petiet, G.** 1999. Les maladies respiratoires d'origines professionnelles. 2^{ème} édition. Paris, Masson, Collection médecine du travail, 288 p.
- Maouche, K., Polette, M., Jolly, T., Medjber, K., Cloëz-Tayarani, I., Changeux, J.P., Burlet, H., Terryn, C., Coraux, C., Zahm, J.M., Birembaut, P. & Tournier, J.M.** 2009. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *American Journal of Pathology.*, 175(5): 1868-1882.
- Marusenko, Y., Shipp, J., Hamilton, J.A., Morgan, J.L.L., Keebaugh, M., Hill, H., Dutta, A., Zhuo, X., Upadhyay, N., Hutchings, J., Herckes, P., Anbar, A.D., Shock, E. & Hartnett H.E.** 2013. Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*, 174: 150-156.
- Mengel, K.,** 2002 Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition *In Proceedings of the International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants.* Tagliavini M., Toselli M., Bertschinger L., Neilsen D. Thalheimer M., Eds.; *International Society Horticultural Science: Leuven, Belgium*, pp 33-47.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., Crapo, J.D.** 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(6): 613-624.

- Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure, J. & Bernard, N.** 2010. Relationship of atmospheric pollution characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to microbial communities living in bryophytes at three differently polluted sites (rural, urban, and industrial). *Microbial Ecology*, 59: 324–334; DOI 10.1007/s00248-009-9580-2.
- Mody, V.V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H.R.** 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci*, 2(4): 282-289. DOI: 10.4103/0975-7406.72127.
- Möller, W., Felten, K., Sommerer, K., Scheuch, G., Meyer, G., Meyer, P., Häussinger, K. & Kreyling, W.G.** 2008. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med*, 177: 426-32.
- Monica, R.C. & Cremonini, R.** 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62: 161–165.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B. & Donaldson, K.** 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med*, 64(9): 609-615.
- Muhlfeld, C., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** 2008. Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss Medical Weekly*, 138: 387–391.
- Mueller, N.C., Braun, J., Bruns, J., Cernik, M., Rissin, P., Rickerby, D. & Nowack, B.** 2012. Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environ Sci Pollut Res*, 19:550–558.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D.** 2007. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.
- Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface*, 7(Suppl 1): 27-40.
- Nali, C., Balducci, E., Frati, L., Paoli, L., Loppi, S. & Lorenzini, G.** 2007. Integrated biomonitoring of air quality with plants and lichens: A case study on ambient ozone from central Italy. *Chemosphere*, 67: 2169–2176.

- Namkung, W., Finkbeiner, W.E. & Verkman, A. S.** 2010. CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 2639–2648.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N.** 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B.** 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105(4): 411-414
- Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Bear, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. & Driessen, M.** 2005. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry and kinetics. *Environ Sci Technol*, 39: 1221–1230.
- Oberdörster, G., Ferin, J., Finkelstein, G., Wade, P. & Corson, N.** 1990. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles ? II Lung lavage studies. *J Aerosol Sci*, 21: 384-387.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, 113: 823–839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C.** 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following wholebody inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health*, 65: 1531-1543.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W. & Cox, C.** 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16(6-7): 437-45.
- Oberdorster, G., Stone V., Donaldson, K.** 2007. Toxicology of NPs: a historical perspective. *Nanotoxicology*, 1: 2–25
- OCDE**, 2009. Report on preliminary review of OECD test guidelines for their applicability to manufactured nanomaterials. OCDE, 207p.
- OCDE**, 2013. Le Screening Moléculaire et la Toxicogénomique. OCDE (accessed octobre 2013). Disponible at : <http://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/lescreeningmoleculaireetlatoxicogenomique.htm>
- Ogawara, K., Yoshida, M., Furumoto, K., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K. & Kimura T.** 1999. Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats. *J Drug Target*, 7: 213–221.

- Ohno, K., Mori, C., Akashi, T., Yoshida, S., Tago, Y., Tsujii, Y. & Tabata Y.** 2013. Fabrication of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging from Polymer-Brush-Afforded Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Biomacromolecules*, 14(10):3453-3462.
- Okon, E., Pouliquen, D., Okon, P., Kovaleva, Z.V., Stepanova, T.P., Lavit, S.G., Kudryavtsev, B.N. & Jallet, P.** 1994. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Invest*, 71: 895–903.
- Olofsson, L., Rindzevicius, T., Pfeiffer, I., Kall, M. & Hook, F.** 2003. Surface-based goldnanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection. *Langmuir*. 19: 10414–10419.
- Ostro, B.D., Lipsett, M.J., Mann, J.K., Krupnick, A. & Harrington, W.** 1993. Air pollution and respiratory morbidity among adults in southern California. *Am J Epidemiol*, 137(7): 691-700.
- Otero-González, L., Sierra-Alvarez, R., Boitano, S. & Field, J. A.** 2012. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*, 46(18):10271-8.
- Panda, K.K., Acharya, V. M.M., Krishnaveni, R., Padhi, B.K., Sarangi, S.N., Sahu, S.N. & Panda, B.B.** 2011. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 25(5): 1097-1105.
- Park, E.J., Choi, J., Park, Y.K. & Park, K.** 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1-2): 90-100.
- Patil, G., Khan, M.I., Patel, D.K., Sultana, S., Prasad, R. & Ahmad, I.** 2012. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells A(549). *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(2): 436-45.
- Patlolla, A.K., Berry, A., May, L. & Tchounwou, P.B.** 2012. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9: 1649-1662.
- Paur, H.R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hanninen, O., Kasper, G., Riediker, M., Rothen-Rutishauser, B. & Schmid, O.** 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science*, 42: 668-692.

- Petala, E., Dimosa, K., Douvalisc, A., Bakasc, T., Tucekb, J., Zborilb, R. & Karakassidesa, M.A.** 2013. Nanoscale zero-valent iron supported on mesoporous silica: Characterization and reactivity for Cr(VI) removal from aqueous solution. *Journal of hazardous materials*, 261: 295-306.
- Petitot, F., Lestaevel, P., Turlonias, E., Mazzucco, C., Jacquinet, S., Dhieux, B., Delissen, O., Tournier, B.B., Gensdarmes, F., Beaunier, P. & Dublineau, I.** 2013. Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats. *Toxicol Lett*, 217(3): 217-25.
- Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., Mccray, P.B. & Zabner, J.** 2010. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300: L25-L31.
- Pietropaoli, A.P., Frampton, M.W., Hyde, R.W., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Cox, C., Speers, D.M., Frasier, L.M., Chalupa, D.C., Huang, L.S., Utell, M.J.** 2004. Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol*, 16: 59-72.
- Pope, C.A. 3rd, Ezzati, M. & Dockery, D.W.** 2009. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*, 360 (4): 376-386.
- Pui, D.Y., Qi, C., Stanley, N., Oberdörster, G. & Maynard, A.** 2008. Recirculating air filtration significantly reduces exposure to airborne nanoparticles. *Environ Health Perspect*, 116: 863-866.
- Ramos-Godínez, M. del P., González-Gómez, B.E., Montiel-Dávalos, A., López-Marure, R. & Alfaro-Moreno, E.** 2013. TiO₂ nanoparticles induce endothelial cell activation in a pneumocyte-endothelial co-culture model. *Toxicol In Vitro*, 27(2): 774-81.
- Ren, H.X., Liu, L., Liu, C., He, S. Y., Huang, J., Li, J. L., Zhang, Y., Huang, X.J. & Gu, N.** 2011. Physiological investigation of magnetic iron oxide nanoparticles towards Chinese Mung Bean. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7(5): 677-684.
- Renwick, L.C., Donaldson, K. & Clouter, A.** 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172: 119-127.
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., & Gardea-Torresdey, J.L.** 2013. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environmental Science & Technology*, 47: 5635-5642.
- Rimetz, J.** 2007. Les aérosols de pollution en zone urbaine et industrielle sous influence marine. Physico-chimie des particules. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 284p.

- Rinaudo, V., Barberi, P., Giovannetti, M. & Van der Heijden, M.G.A.** 2010. Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant Soil*, 333(1-2): 7-20.
- Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell S.H. & Hogan, B.L.M.** 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31): 12771-12775.
- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Muhlfeld, Ch. & Gehr, P.** 2009a. Nanoparticle-cell membrane interactions. In P. Gehr, Ch. Muhlfeld, B. Rothen-Rutishauser & F. Blank (Eds.), Particle-Lung Interactions. *Informa Healthcare: New York*, pp. 226-242.
- Rothen-Rutishauser, B., Grass, R.N., Blank, F., Limbach, L.K., Muhlfeld, C., Brandenberger, C., Raemy, D.O., Gehr, P. & Stark, W.J.** 2009b. Direct combination of nanoparticle fabrication and exposure to lung cell cultures in a closed setup as a method to simulate accidental nanoparticle exposure of humans. *Environmental Science and Technology*, 43(7): 2634-2640.
- Roux J.**, 2010. Régénération et remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidose. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Champagne-Ardenne, 212p.
- Ruffini Castiglione, M. & Cremonini, R.**, 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2): 161-165.
- Rzepka, M.A. & Cuny, D.** 2008. Biosurveillance végétale et fongique des ETM atmosphériques. *Air Pur*, 75: 66-79.
- Sahu, D., Kannan, G.M., Vijayaraghavan, R., Anand, T. & Khanum, F.** 2013. Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. *ISRN Toxicol.* 2013: 316075.
- Sakurai, Y., Tada, H., Gonda, K., Takeda, M., Cong, L., Amari, M., Kobayashi, Y., Watanabe, M., Ishida, T. & Ohuchi, N.** 2012. Development of silica-coated silver iodide nanoparticles and their biodistribution. *Tohoku J Exp Med*, 228(4): 317-23.
- San Roman, I., Alonso, M.L., Bartolomé, L., Galdames, A., Goiti, E., Ocejó, M., Moragues, M., Alonso, R.M. & Vilas, J.L.** 2013. Relevance study of bare and coated zero valent iron nanoparticles for lindane degradation from its by-product monitorization. *Chemosphere*, 93(7): 1324-1332.
- Santhosh, P.B. & Ulrich, N.P.** 2013. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*, 336 8-17.
- Sayed El-Temsah, Y. & Joner, E.J.** 2010. Impact of Fe and Ag Nanoparticles on Seed Germination and Differences in Bioavailability During Exposure in Aqueous Suspension and Soil. *Environmental Toxicology*, 42-49, DOI 10.1002/tox.

- Sayes, C.M., Reed, K.L. & Warheit, D.B.** 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97(1): 163-180.
- Schönherr, J.** 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*, 212: 112–118.
- Schönherr, J.** 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2471– 2491.
- Schönherr, J. & Luber, M.** 2001. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant Soil*, 236: 117–122.
- Schützendübel, A. & Polle, A.** 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351–1365
- Schwartz, J.** 1994. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ Res*, 64(1): 36-52.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks**, 2010. Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”. SCENIHR, 46p.
- Seeger, E.M., Baun, A., Kästner, M. & Trapp, S.** 2009. Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *J Soils Sediments*, 9:46–53.
- Sharma, H.S., Patnaik, R., Sharma, A., Sjöquist, P.O. & Lafuente, J.V.** 2009. Silicon dioxide nanoparticles (SiO₂, 40-50 nm) exacerbate pathophysiology of traumatic spinal cord injury and deteriorate functional outcome in the rat. An experimental study using pharmacological and morphological approaches. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 9(8): 4970-4980.
- Sharma, H.S. & Sharma A.** 2012. Neurotoxicity of Engineered Nanoparticles from Metals. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11: 65-80.
- Sharma, S.S. & Dietz, K.J.** 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14: 43–50
- Shaw, A.K. & Hossain, Z.** 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, in press.
- Shebani, E., Shahana, S., Janson, C. & Roomans, G.M.,** 2005. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue Cell*, 37(2): 145-152.
- Singh, P.K., Singh, M. & Vyas, D.** 2010. Biocontrol of fusarium wilt of chickpea using arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium leguminosorum biovar. *Caryologia*, 63(4): 349–353.

- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., Kostarelos, K.** 2006. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3357–3362.
- Spurny, K.R.** 1998. On the physics, chemistry and toxicology of ultrafine anthropogenic, atmospheric aerosols (UAAA): new advances. *Toxicol Let*, 96-97: 253-261.
- Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroepel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J. & Schulz, H.** 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ. Health Perspect.*, 114: 328–333.
- Suliman, Y.A.O., Ali, D., Alarifi, S., Harrath, A.H., Mansour, L. & Alwasel, S.H.** 2013. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells. *Environ Toxicol.*, doi: 10.1002/tox.21880.
- Sun, S.Q., He, M., Wang, G.X. & Cao, T.** 2010. Heavy Metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss brachythecium piligerum chad. *Inc. Environ Toxicol*, 26: 453–458.
- Sung, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Song, M.Y., Song, K.S., Ryu, H.R., Yoon, J.U., Jeon, K.S., Jeong, J., Han, B.S., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Kim, D.W., Kelman, B.J. & Yu, I.J.** 2011. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 8: 16.
- Tabata, Y. & Ikada, Y.** 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. *Biomaterials*, 9: 356-362.
- Tagliari de Brito, K.C., Torres de Lemos, C., Vaz Rocha, J.A., Mielli, A.C., Matzenbacher, C. & Ferrão Vargas, V.M.** 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 14-20.
- Tang, W., Li, Q., Gao, S. & Shang, J.K.** 2011. Arsenic (III,V) removal from aqueous solution by ultrafine α -Fe₂O₃ nanoparticles synthesized from solvent thermal method. *Journal of Hazardous Materials*, 192: 131– 138.
- Tripathi, S.T.S., Sonkar, S.K. & Sarkar, S.** 2011. Growth stimulation of gram (Cicer arietinum) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3): 1176-1181.
- Tseng, W.K., Chieh, J.J., Yang, Y.F., Chiang, C.K., Chen, Y.L., Yang, S.Y., Horng, H.E., Yang, H.C. & Wu, C.C.** 2012. A noninvasive method to determine the fate of Fe₃O₄ nanoparticles following intravenous injection using scanning SQUID biosusceptometry. *PLoS One*, 7(11): e48510.

- Tuutijärvi T, Vahala R, Sillanpää M, Chen G.** 2012. Maghemite nanoparticles for As(V) removal: desorption characteristics and adsorbent recovery. *Environ Technol*, 33(16-18): 1927-36.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. & Schins, R.P.** 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1: 1-20.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M. & Dumat, C.** 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science and Technology*, 44: 1036-1042.
- Valanne N.** 1984. Photosynthesis and photosynthetic products in mosses. *The experimental Biology of Bryophytes*, 257-273.
- Van Haluwyn, C., Cuny, D. & Garrec, J.P.** 2011. Introduction générale - Définitions, concepts et enjeux généraux de la biosurveillance de la qualité de l'air. *Pollution Atmosphérique*, 7-12.
- Viegi, G., Maio, S., Pistelli, F., Baldacci, S. & Carrozzi, L.** 2006. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology*, 11(5): 523-532.
- Wahajuddin & Arora, S.** 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, 7: 3445-3471.
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J.C., Qu, P. & Xing, B.** 2012. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 25(7): 1512-21.
- Wanner, A., Salathe, M. & O'riordan, T.G.,** 1996. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 154(6 Pt 1): 1868-1902.
- Watanabe, M., Yoneda, M., Morohashi, A., Hori, Y., Okamoto, D., Sato, A., Kurioka, D., Nittami, T., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., Kawai, K., Kasai, H. & Totsuka, Y.** 2013. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci*, 14(8): 15546-60.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V. & Alvarez, P.J.J.,** 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40(14): 4337-4445.
- Witschger, O. & Fabriès, J.F.** 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *INRS, hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires*, 21-35.
- Xu, C. & Sun, S.** 2013. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 732-743.

- Yan, S., Zhao, L., Li, H., Zhang, Q., Tan, J., Huang, M., He, S. & Li, L.** 2013. Single-walled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. *Journal of Hazardous Materials*, 246– 247: 110– 118.
- Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., Liu, C., Gao, F.Q., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Influences of nanoanatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110(2): 179-190.
- Yang, F., Liu, C., Gao, F.Q., Su, M.Y., Wu, X., Zheng, L., Hong, F.S. & Yang, P.** 2007. The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂ treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research*, 119(1): 77-88.
- Zechmeister, H.G., Grodzinska, K. & Szarek-Lukaszewska, G.,** 2003. Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts ADN applications. Elsevier science, Oxford. Chap. 10: 329-376. 997p.
- Zhang, H., Xia, T., Meng, H., Xue, M., George, S., Ji, Z., Wang, X., Liu, R., Wang, M., France, B., Rallo, R., Damoiseaux, R., Cohen, Y., Bradley, K.A., Zink, J.I., Nel, A.E.** 2011. Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 5(4): 2756-2769.
- Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela-Ramirez, A., Zhang, J.Y. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2012b. Stress Response and Tolerance of Zea mays to CeO₂ Nanoparticles: Cross Talk among H₂O₂, Heat Shock Protein, and Lipid Peroxidation. *ACS NANO*, 6(11): 9615-9622.
- Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P. & Liu, C.** 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally and growth aged seeds of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104(1): 83-91.
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J.Q. & Jin, Y.,** 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 713-717.

CHAPITRE 2 - MATERIELS ET METHODES

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Notre étude a porté, principalement, sur un type de nanoparticules de fer fabriquées par une équipe du CNRS : « Métaux et Céramiques à Microstructures Contrôlées » (MCMC) de l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est (UMR 7182). Afin de caractériser le plus finement possible ces nanoparticules ainsi que les modifications de leurs propriétés de surface dans différents milieux biologiques mais aussi lors de leur contact avec la macromolécule d'ADN, plusieurs techniques ont été utilisées.

La recherche des effets des nanoparticules manufacturées de fer sur des cibles potentielles, environnementales et humaines, contribuerait à la caractérisation des dangers et des risques. Pour tenter de développer nos connaissances dans ce domaine de recherche, nous avons menées des études *in vivo* sur plantes et *in vitro* au niveau de cellules humaines. Pour cela, deux modèles biologiques ont été choisis, pouvant permettre de développer des modèles utilisables en biosurveillance de la qualité de l'air. Dans le cadre d'études d'écotoxicité, nous avons choisi *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp. Les bryophytes sont d'excellentes sentinelles de la qualité de l'air et contribuent de façon importante à la colonisation des sols nus ou dégradés et permettent donc l'installation et le maintien pérenne d'une végétation secondaire indispensable à une bonne dynamique végétale des sols et au développement d'écosystèmes durables. De plus, cette espèce a vu son génome totalement séquencé, ce qui facilite notre première approche en toxicogénomique. Dans le cadre d'études de toxicité, nous avons choisi de travailler avec des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de différents patients. C'est ce modèle cellulaire qui a le plus de similarités (en terme de transcriptome) avec le tissu bronchique (Courcot *et al.*, 2012). Les études de pénétration cellulaire des nanoparticules et les analyses de leurs effets sur la cytotoxicité, le stress oxydant, la modulation de l'expression génique ont été menées en parallèle sur nos deux modèles biologiques.

Ce chapitre se compose de trois parties. La première détaille les techniques utilisées pour caractériser au mieux les nanoparticules manufacturées de fer utilisées dans cette étude. Dans les seconde et troisième parties, seront présentées les différentes méthodes d'analyses des effets des nanoparticules de fer, respectivement, sur *Physcomitrella patens* et au niveau de cellules épithéliales bronchiques humaines. Ces méthodes ont permis de vérifier l'internalisation des nanoparticules au niveau cellulaire, d'analyser leur cytotoxicité, leur impact sur le stress oxydant, l'inflammation et la modulation de l'expression de gènes.

1. La caractérisation physico-chimique et surfacique des nanoparticules

1.1. Provenance

Les nanoparticules de fer, appelées Fe-NP, ont été synthétisées par le laboratoire Métaux et Céramiques à Microstructures Contrôlées (MCMC, Institut de Chimie et des Matériaux, Paris-Est, UMR 7182). Ces nanopoudres ont été produites par le procédé de la fusion cryogénique (Champion et Bigot, 1996) suivant le principe de l'évaporation-condensation. Elles sont formées de nanoparticules agglomérées, avec des caractéristiques mécaniques élevées en raison de leur taille (50 nm). Après passivation des poudres, ces nanoparticules se sont recouvertes d'une couche d'oxyde.

1.2. Forme, taille des nanoparticules et de leurs agglomérats et potentiel zeta

La taille et la forme des nanoparticules ont été déterminées par l'utilisation d'un microscope électronique à balayage (MEB), LEO 1530 (Zeiss, Germany). Les échantillons ont été préparés en pulvérisant une solution de Fe-NP, préalablement homogénéisée par sonication (Neyo, 50-60 Hz), sur une mince plaque de verre coatée à l'or.

La taille des agglomérats des nanoparticules a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en utilisant un Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments). Pour cette mesure, l'indice de réfraction ou *refractive index* est choisi en fonction du type de nanoparticule, soit 2,32 pour le FeO qui est en surface des Fe-NP, soit 2,42 pour le Fe₃O₄, soit 3,011 pour le Fe₂O₃. Le potentiel zêta (ζ) a été défini par électrophorèse laser Doppler (Zetasizer II, Malvern Instruments). Pour la détermination de ces paramètres, les nanoparticules de fer ont été dispersées dans les différents milieux d'exposition de nos modèles biologiques (*Volvic* pour les bryophytes, milieux de culture (HBSS, BEGM ou B-Ali) pour les cellules pulmonaires) et du NaCl (15 mM) pour les nanoparticules brutes. Une étape de sonication (Neyo, 50-60 Hz) a permis d'homogénéiser la solution avant d'effectuer les mesures.

1.3. Surface et composition

La photoémission X ou XPS (figure 24) permet d'analyser la composition chimique élémentaire de la surface des (nano)poudres déposées sur un substrat métallique par photoionisation des niveaux de cœur atomique. Les mesures ont été effectuées en utilisant un K-alpha spectromètre de photoélectrons ThermoElectron (fig. 24 et 25) avec une excitation monochromatique Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV). La composition de la surface du film d'oxyde de surface et le métal sous-jacent ont été déterminés par la mesure de photopics d'intensités intégrées après une soustraction de fond de *Shirley*. La zone des pics a été corrigée à partir de facteurs de sensibilité (Briggs et Seah, 1990). Le déplacement chimique des pics de photoémission permet de connaître l'environnement chimique local de l'atome émetteur (oxyde, carbure, hydroxyde). Nous pouvons donc grâce à cette technique connaître la composition chimique de la surface des poudres (épaisseur de l'oxyde, présence d'hydroxyde), la distribution en profondeur des éléments lorsque l'analyse est couplée à une abrasion ionique (source d'argon), et la présence d'éléments polluants (ions ou molécules) et ceci à l'échelle sub-nanométrique (résolution en profondeur de l'ordre du dixième de nanomètre). Cette analyse peut être pratiquée sur des échantillons bruts d'élaboration ou bien sur des poudres ayant subi des traitements (séjour dans l'eau, dans le milieu de culture des cellules pulmonaire par exemple).



Fig. 24 : XPS _ K-ALPHA (Thermo Scientific)



Fig. 25 : Porte-échantillons de l'XPS_K-ALPHA placé dans la chambre d'insertion

Le diamètre du spot *X-ray* a été fixé à 0,1 mm. Pour analyser la composition en profondeur des nanoparticules et ainsi déterminer un profilage, un canon à ions (Ar^+) a été utilisé avec une énergie primaire fixée à 3,0 keV et avec une vitesse de pulvérisation cathodique circa de $0,1 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Les *survey* (spectre XPS global) ont été acquis avec un ΔE d'énergie de 1,0 eV, alors que le ΔE était de 0,1 eV pour les fenêtres spécifiques (O_{1s} ; Fe_{2p}). Le temps d'acquisition était de 100 ms par étape dans tous les cas. La pression de la chambre d'analyse était de $6,0 \cdot 10^{-10}$ torr, augmentée au cours de la pulvérisation d' Ar^+ . Les fenêtres de O_{1s} et de Fe_{2p} étaient respectivement de 525-537 eV et de 690-760 eV.

Les courbes obtenues ont été analysées avec le logiciel AVANTAGE 5.51 (Thermo Scientific) et le logiciel ORIGIN Data Analysis and Graphing Software.

1.4. Surface spécifique et « *volume specific surface area* »

La surface spécifique des nanoparticules a été définie par le Département Génie Civil et Environnemental de l'Ecole des Mines de Douai. Cette mesure a été faite par la méthode BET (Brunauer, Emmett and Teller) d'après Brunauer *et al.* (1938) par adsorption d'azote à l'aide d'un Micromeritics de type : ASAP 2010. Cette méthode est faite sur le matériau global (surface mesurée par rapport à la masse de l'échantillon introduit), il n'y a pas de préparation préalable.

Pour déterminer le *Volume Specific Surface Area* ou VSSA (Kreyling *et al.*, 2010), nous avons utilisé la surface spécifique des nanoparticules de fer. Le VSSA est un paramètre déterminé à partir du matériau en poudre, y compris pour les particules dont la distribution de taille peut être importante. Il permet de déterminer si un matériau entre dans la catégorie des matériaux nanostructurés. En effet, si un matériau se présente sous la forme de nanoparticules agglomérées et que le VSSA est supérieur à $60 \text{ m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$, il est alors considéré comme entrant dans la catégorie des nanoparticules. Le VSSA correspond au produit de la surface et de la densité du matériau. Dans notre cas, la densité du fer choisie est de $7,87 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

2. Notre modèle végétal : *Physcomitrella patens*

2.1. La culture de *Physcomitrella patens*

2.1.1. La culture des plants adultes de *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch et Schimp. ou *Aphanorrhagma patens* (Hedw.) Lindb. (figure 26) est l'organisme de référence pour les végétaux inférieurs dans les études biomoléculaires, son génome ayant été le premier à être entièrement décodé pour une bryophyte. En effet, *Physcomitrella patens* est la seule espèce de bryophyte employée comme modèle en génomique végétale (Rensing *et al.*, 2008).



Fig. 26 : *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp (Source : David Cove - <http://biology4.wustl.edu/moss/slideshow/pages/gametophores%20.htm>)

Les premiers plants de *Physcomitrella patens* ont été obtenus auprès de l'*International Moss Stock Center* de Fribourg (IMSC Freiburg, Allemagne). Cette espèce a ensuite été cultivée au laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques (LSVF) de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille 2. Les cultures de *Physcomitrella patens* ont été réalisées sur support gélosé. Le milieu de culture choisi pour la culture de *Physcomitrella patens* était le BCD Medium (Cove et Quatrano, 2006 ; Ashton et Cove, 1977) complété avec de l'agar (Agar #A9799, Sigma) (Cove, *comm. pers.*). L'utilisation de cet agar a permis d'obtenir une gélose avec un pH légèrement acide, idéal pour la culture de cette espèce (Cove, *comm. pers.*). La température de la chambre de culture était de 25°C (Ashton et Cove, 1977 ; Thornton *et al.*, 2005 ; Cove, *comm. pers.*). La lumière dispensée était une lumière blanche avec un flux compris entre 50 et 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Reski, 2010). La photopériode était de 16h/8h (jour/nuit) (Hohe et Reski, 2002 ; Franck *et al.*, 2005 ; Mittman *et al.*, 2009). L'inoculation a été faite avec des gamétophytes provenant de cultures précédentes (technique de clonage). Des plaques 6 puits (Fisher), des boîtes de pétri (Fisher) ou des Phytatrays (Sigma) utilisées pour la culture ont été fermées à l'aide de sparadrap

Micropore 3M (3M). Ce sparadrap a permis d'éviter toute contamination tout en laissant passer l'air (à la différence du parafilm).

2.1.2. La culture de protonéma

La méthode de culture présentée précédemment permet d'obtenir des gamétophytes (plants adultes). Il nous a également semblé intéressant de travailler avec du protonéma qui est le premier stade de développement des bryophytes. Le protonéma est une structure allongée, en forme de fil qui se développe à partir de la structure de la spore germée des bryophytes. Le protonéma est la partie la mieux étudiée du développement des bryophytes. Grâce à sa culture relativement facile et à sa structure à l'échelle de la cellule, il a été le sujet d'étude de nombreuses études physiologiques pour élucider les mécanismes de base des plantes.

Pour travailler sur le protonéma, nous avons besoin de bloquer le développement au stade protonématal, pour cela nous avons développé des cultures sur disques de cellophane (Type 325P, AA Packaging Ltd., Royaume Uni), précédemment stérilisés. Ces disques de cellophane stériles ont été placés dans une boîte de pétri 90 mm dans laquelle de la gélose a été coulée (BCD medium). Des gamétophytes ont ensuite été broyés dans un mortier au pilon (préalablement stérilisés par autoclavage) avec du milieu liquide de BCD medium. Ce broyat est ensuite déposé sur les disques de cellophane et mise en chambre de culture dans les mêmes conditions que les plants adultes de *Physcomitrella patens*.

2.2. Protocole de préparation des solutions de nanoparticules de fer

Au vu des faibles concentrations que nous avons choisies pour exposer nos plants de *Physcomitrella patens*, nous avons dû pratiquer des dilutions successives d'une solution mère. Nous avons choisis comme doses d'exposition : 5 ng, 50 ng, 500 ng, 5 000 ng et 50 000 ng par plant. Les concentrations des solutions d'exposition (tableau 8) ont été déterminées sachant que lors de l'exposition des plants de *Physcomitrella patens*, nous avons déposé un volume de 500 µl à l'aide d'une micropipette de précision en déposant de fines gouttelettes de manière homogène sur les plants.

Tab. 8 : Quantités et concentrations en Fe-NP choisies pour les expositions des plants de *Physcomitrella patens*

Quantités de Fe-NP	Concentrations des solutions d'exposition
5 ng	10 ng.ml ⁻¹
50 ng	100 ng.ml ⁻¹
500 ng	1 000 ng.ml ⁻¹
5 000 ng	10 000 ng.ml ⁻¹
50 000 ng	100 000 ng.ml ⁻¹

Une solution mère a été faite à partir d'un échantillon de Fe-NP pesé sur une balance de précision (Sartorius, précision 10^{-4}). Les Fe-NP ont été dispersées dans le milieu d'exposition (eau de Volvic). La solution mère a été vortexée et placée dans un bain à ultra-son (Neyo, 50-60 Hz) pendant 15 min afin d'homogénéiser et de désagglomérer les nanoparticules. Dès la fin de la sonication la solution mère a été diluée pour la préparation des solutions d'exposition aux concentrations voulues (tableau 8). Les solutions d'exposition ont subi une sonication de 5 min juste avant l'exposition des plants de *Physcomitrella patens*. Au vu des résultats sur l'action de la Volvic sur la composition de surface des Fe-NP (Chapitre 3), les solutions fille peuvent être préparées la veille et conservées à 4°C.

2.3. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules bryophytiques

2.3.1. La microscopie confocale

La microscopie confocale permet de faire des coupes optiques des échantillons. Nous avons utilisé cette technique pour étudier la pénétration de nanoparticules de fer au sein des cellules bryophytiques. En 2008, Gonzalez-Melendi *et al.* ont testé différentes techniques microscopiques pour visualiser la pénétration de nanoparticules métalliques au sein de cellules végétales, notamment en utilisant la microscopie confocale par la méthode DIC (*Differential Interference Contrast*) ou méthode de Nomarski. L'autofluorescence des végétaux a été utilisée pour visualiser les parois et membranes des cellules ainsi que les chloroplastes. Suite à l'exposition aux nanoparticules, les échantillons ont été fixés avec une solution de paraformaldéhyde à 2 % et glutaraldéhyde à 2 % pendant 12 h à température ambiante. Puis, les échantillons ont pu être conservés dans cette solution pendant plusieurs semaines à 4°C. Ils ont ensuite été lavés (Dombu *et al.*, 2010 ; Lira *et al.*, 2011) dans du PBS, 2 fois 30 minutes à température ambiante pour supprimer le fixateur et 1 fois avec du Triton X-100 à 1 %, dilué dans le PBS, pour perméabiliser le tissu (Padham *et al.*, 2007). Enfin, ils ont été incubés pendant 20 min avec une solution de DAPI concentrée à $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans de l'eau et les échantillons ont été mis dans une solution de PBS/glycérol (1:1) (Padham *et al.*, 2007). La lame et la lamelle ont été scellées avec du vernis. La microscopie confocale a été réalisée au niveau de la plate-forme technique de la Plate-forme d'Imagerie Cellulaire IMPRT IFR114 à l'aide d'un microscope confocal inversé LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) et d'un objectif EC PLAN Apochromat 63x/1.4 NA. Un laser DPSS et laser UV ont été utilisés pour visualiser l'autofluorescence des plantes et le DAPI, avec respectivement une excitation à 561 nm et à 405 nm. Nous avons utilisé l'auto-fluorescence des végétaux et le *differential interference contraste* (DIC) (Gonzalez-Melendi *et al.*, 2008). Une analyse tridimensionnelle a été réalisée par l'imagerie de l'axe Z avec des tranches optiques de $0,42 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Les acquisitions ont été effectuées en mode séquentiel, et analysées avec le logiciel confocal ZEN (Zeiss Efficient Navigation).

2.3.2. La microscopie électronique à transmission

Les étapes de préparation des échantillons de bryophytes ont été mises au point pour une observation optimale en microscopie électronique à transmission avec l'aide de Cécile Allet de la Plate-forme de microscopie électronique IMPRT IFR 114. Un protocole a été développé d'une part pour les gamétophytes et d'autre part pour les protonémas.

Tout d'abord, les gamétophytes échantillonnés ont été rincés 2 fois en tampon phosphate (PB) à 0,1M (pH 6,8) puis ils ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % et de glutaraldéhyde à 2 % pendant 1 heure à température ambiante, puis 12 h à 4°C. Les échantillons ont ensuite été rincés 3 fois pendant 20 minutes dans un tampon phosphate à 0,1M (pH 6,8). Ils ont, ensuite, subi une post-fixation au tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 1 % en PB (0,1 M) pendant 5 heures à 4°C avant d'être rincés 3 fois pendant 10 min en PB (0,1 M). Puis, ils ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (20 min en éthanol 30°, 30 min en éthanol 50°, 30 min en éthanol 70°, 30 min en éthanol 80°, 2 x 30 min en éthanol 95°, 3 x 30 min en éthanol absolu et 2 x 30 min en oxyde de propylène). Ils ont ensuite été inclus dans de l'epon (résine) en suivant les opérations ci-dessous :

- ❖ de 12 h à 24 h à 4°C dans un mélange oxyde de propylène et epon (2/3 - 1/3)
- ❖ de 24 h à 48 h à 4°C dans un mélange oxyde de propylène et epon (1/2 - 1/2)
- ❖ de 24 h à 48 h à 4°C dans un mélange oxyde de propylène et epon (1/3 - 2/3)
- ❖ et enfin, 48 h dans de l'epon (100 %) à 4°C.

Enfin, ils ont été inclus en galette d'epon fraîche et cette étape a été suivie d'une polymérisation à 56°C pendant 24 à 48 h. Les coupes réalisées à l'aide d'un ultramicrotome ont été récupérées sur des grilles de nickel 100 mesh membranées. Enfin, ces coupes ultrafines ont été contrastées par une coloration à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 10 minutes suivie d'une coloration au citrate de plomb de Reynolds pendant 8 minutes avant d'être observées au microscope électronique à transmission (Zeiss EM902) à 80 kV équipé d'une caméra Orius. Les images numériques ont été acquises avec le logiciel Digital Micrograph de Gatan.

Pour le protonéma, la méthode de préparation des échantillons a été adaptée pour ce tissu. Avant la fixation, les échantillons sont rincés 2 fois dans du tampon phosphate PB à 0,1 M (pH 6,8) puis ils sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % et de glutaraldéhyde à 2 % pendant 2 heures à température ambiante. Puis, les échantillons sont rincés 3 fois pendant 10 min dans du tampon phosphate à 0,1 M (pH 6,8). La post-fixation au tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 1 % en PB à 0,1 M se fait pendant 1 h à température ambiante avant que les échantillons ne soient rincés 3 fois pendant 5

min en PB à 0,1 M. Puis, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (5 min en éthanol 50°, 5 min en éthanol 70°, 10 min en éthanol 80°, 2 fois 15 min en éthanol 95°, 2 fois 20 min en éthanol absolu et 20 min en oxyde de propylène). Ils sont ensuite inclus dans l'epon par les opérations suivantes :

- ❖ 1h30 en mélange oxyde de propylène/ epon,
- ❖ 12 h en epon à 4°C.

Enfin, ils seront inclus en galette avec de l'Epon fraîche et cette étape sera suivie d'une polymérisation à 56°C pendant 24 h à 48 h. Les coupes réalisées à l'aide d'un ultra-microtome sont récupérées sur des grilles de nickel 100 mesh membranées. Enfin, ces coupes ultra-fines sont contrastées par une coloration à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 10 min suivie d'une coloration au citrate de plomb de Reynolds pendant 8 min avant d'être observées au microscope électronique à transmission.

2.4. Le stress oxydant et le dosage des biomarqueurs

2.4.1. La préparation des échantillons de *Physcomitrella patens*

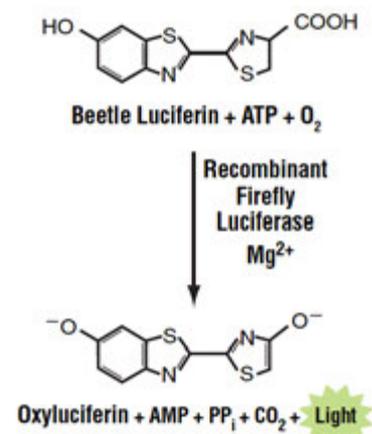
Suite à l'exposition aux nanoparticules, les plants récoltés ont été éponnés entre deux feuilles de papier whatman afin d'éliminer l'eau superficielle des gamétophytes. Les plants ont ensuite été pesés avec une balance de précision (Sartorius, précision 10^{-4}) avant d'être congelés dans l'azote liquide et broyés dans des tubes M (Miltenyi Biotec) à l'aide d'un gentleMacs™ Dissociator (Miltenyi Biotec) avec la fonction RNA_01_01. Pour cette étape de broyage, une solution (PBS, acide métaphosphorique, etc.) a été ajoutée dans le tube M en fonction du biomarqueur à doser. Le type de cette solution et son volume seront précisés dans les parties suivantes. Tout le matériel utilisé était en plastique ou en verre, à usage unique ou nettoyé et stérilisé, pour éviter l'éventuelle contamination par du matériel en métal.

2.4.2. La viabilité et le dosage de l'ATP

Afin d'étudier l'impact des nanoparticules sur l'état sanitaire (viabilité) de *Physcomitrella patens*, nous avons opté pour le dosage d'ATP. Cette molécule est rapidement dégradée après la mort de la cellule, elle témoigne donc de la vie ou de la mort des cellules.

Le dosage de l'ATP, réalisé à l'aide du kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (PROMEGA), est basé sur une réaction de luminescence se produisant avec la luciférase et luciférine en présence d'ATP (figure 27).

Fig. 27 : Schéma réactionnel entre luciférase et luciférine en présence d'ATP. La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de Mg^{2+} , d'ATP et d'oxygène (d'après le kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, PROMEGA)

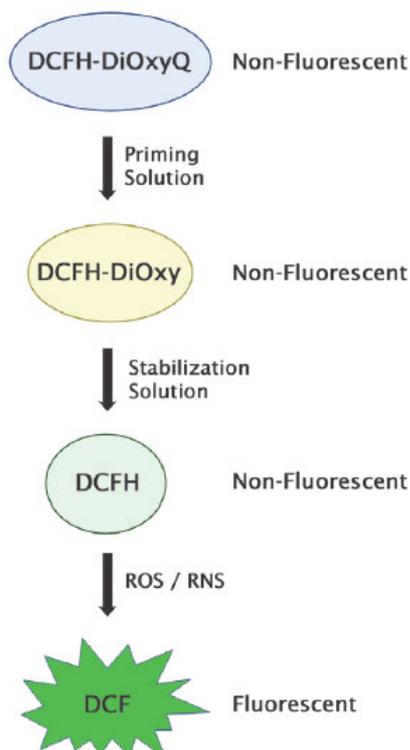


Les plants ont été broyés (maximum 200 mg) dans des tubes M (Miltenyi Biotec) à l'aide d'un glentleMacs™ Dissociator (Miltenyi Biotec) avec 700 µl de PBS avant d'être centrifugés à 340 g pendant 4 min (Sigma). Le broyat a été récupéré et mis dans des tubes 1,5 ml et centrifugés 5 min à 14 000 g (Thermo Fischer). 100µl de surnageant ont été mis dans une plaque blanche de 96 puits opaque compatible avec une lecture de la luminescence. La plaque a ensuite été incubée pendant 15 min à température ambiante. Puis, un volume équivalent de BacTiter-Glo™ Reagent a été ajouté au surnageant, soit 100µl. La plaque a été placée sur un agitateur orbital pendant 5 min et laissée incubée 5 min à température ambiante avant la lecture. La lecture de la luminescence a été réalisée avec un GloMax®-Multi Detection System (PROMEGA). Les résultats obtenus (Relative Light Unit ou RLU) ont été ainsi rapportés à la biomasse des plants (RLU.mg⁻¹).

2.4.3. Les espèces réactives de l'oxygène et des espèces nitrées

Pour le dosage des espèces réactives de l'oxygène et des espèces nitrées, le kit « OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence) » (Cell Biolabs) a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Dans la suite de ce mémoire, nous emploierons le terme « espèces réactives de l'oxygène » ou « ROS » pour désigner les espèces réactives de l'oxygène et les espèces nitrées.

Cette méthode de dosage utilise une sonde fluorescence spécifique des ROS : la dichlorodihydrofluoresceine DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ) (figure 28). Pour ce dosage, les plants de *Physcomitrella patens* ont été broyés avec 1,5 ml de PBS avant d'être centrifugés à 340 g pendant 4 min (Sigma 2.5). Le broyat a été récupéré et mis dans des tubes 1,5 ml et centrifugé 5 min à 14 000 g (Thermo Fischer). 50 µl du surnageant ont été déposés dans une plaque opaque noire de 96 puits compatible avec une lecture de la fluorescence. Puis, 50 µl d'une solution appelée « Catalyst » ont été ajoutés à tous les



puits et la plaque a été agitée avec un agitateur orbital pendant 2 min. Ensuite, 100 µl de la solution de non-fluorescent 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceine (DCFH) a été ajoutée. Une fois la plaque mise à l'abri de la lumière, elle a été incubée pendant 15 min avant d'être mise dans le lecteur GloMax®-Multi Detection System (PROMEGA). La plaque a été lue à 480 nm (excitation) et 530 nm (émission) pendant au minimum 30 min avec une lecture toutes les 10 min pour obtenir la conversion complète de la DCFH en 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (DCF).

Fig. 28 : Mécanisme de la méthode de dosage des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les bryophytes (d'après le OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit - Green Fluorescence, Cell Biolabs).

La teneur en radicaux libres dans les échantillons a été déterminée par comparaison avec une gamme de DCF prédéterminée. La gamme DCF permet d'obtenir la quantité totale de ROS et RNS. Les résultats ont ainsi été convertis en nanomoles de ROS/RNS par gramme de biomasse soit nmol.g^{-1} .

2.4.4. Le glutathion

Les concentrations de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG) ont été déterminées en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou *high-performance liquid chromatography* (HPLC) (Waters) en adaptant la méthode de Kandar *et al.* (2007).

Les plants ont été broyés dans des tubes M (Miltenyi Biotec) à l'aide d'un gentleMacs™ Dissociator (Miltenyi Biotec) avec 250 μl de PBS et 500 μl d'acide métaphosphorique (10%) froid avant d'être centrifugés à 450 g pendant 4 min (Eppendorf 5810R) à 4°C. Le broyat a été incubé à 4°C pendant 10 min et les échantillons ont été centrifugés pendant 15 min à 22 000 g à 4°C. Puis, deux aliquots ont été réalisés (50 μl pour le dosage du GSH, 100 μl pour le dosage du GSSG) avant d'être immédiatement stockés à -80°C.

Pour le dosage du GSH, aux 50 μl de surnageant ont été ajoutés 200 μl d'EDTA 0,1 % (hydrogénophosphate de sodium, 0,1 M, pH 8). Pour la dérivation, à 240 μl du mélange précédent, 720 μl d'EDTA 0,1 % (m/v hydrogénophosphate de sodium, 0,1M, pH 8) et 60 μl d'orthophtaldéhyde (OPA) à 0,1 % (m/v méthanol) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min.

Pour le dosage du GSSG, au 100 μl de surnageant ont été ajoutés 100 μl de N-éthylmaleimide (NEM; 40 mM) et ce mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 25 min. Le NEM va interagir avec le GSH présent dans les échantillons. A ce mélange, 75 μl de NaOH (0,1M) ont été ajoutés pour arrêter l'action du NEM. Puis, à 240 μl du mélange précédent, 720 μl d'EDTA 0,1 % (hydrogénophosphate de sodium, 0,1 M, pH 8) et 60 μl d'orthophtaldéhyde (OPA) à 0,1 % (m/v méthanol) ont été ajoutés. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité.

La détermination des concentrations des échantillons a été faite par une méthode de séparation et par détection fluorimétrique. Pour cela, 100 μl d'échantillons ont été injectée dans l'HPLC. La séparation a été réalisée avec une colonne analytique Symmetry Shield C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm, Waters) équipée d'une colonne de garde Symmetry Shield C18 (5 μm , 3,9 x 20 mm, WATERS) thermostatée à 37°C (Block bruyère SBM 130D STUART). La phase mobile était constituée de méthanol et de Na_2HPO_4 (25 mM) (25 :75, v/v ; pH 6). Le débit a été maintenu constant à 1 ml.min^{-1} pour une pression de 2 000 psi. La détection fluorimétrique a été effectuée avec une excitation à 350 nm et une émission à 420 nm. Les concentrations en GSH et GSSG ont été quantifiées à partir de la

hauteur du pic correspondant à l'aide du logiciel de chromatographie Empower. Un étalonnage extérieur des concentrations de GSH et de GSSG a été réalisé. On obtient ainsi les résultats en nanomoles de GSH ou de GSSG par gramme de biomasse fraîche (nmol.g⁻¹).

2.4.5. Le malondialdéhyde

Nous avons adapté une méthode de dosage du malondialdéhyde (MDA) au niveau des gamétophytes de *Physcomitrella patens* par une séparation de composés en HPLC et par détection fluométrique. Les plants ont été broyés dans des tubes M (Miltenyi Biotec) à l'aide d'un glentleMacs™ Dissociator (Miltenyi Biotec) avec 500 µl de PBS avant d'être centrifugés à 453 g pendant 4 min (Eppendorf 5810) à 4°C. Le broyat a été récupéré et centrifugé 5 min à 14 000 g (Eppendorf 5415R). A 200 µl de surnageant, 22 µl de butylated hydroxytoluène (BHT, 40mM) (Sigma) ont été ajoutés. Puis les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Afin de déterminer la quantité de MDA dans les échantillons, nous avons, dans un premier temps, extrait les aldéhydes totaux. Pour cela, 200 µl d'échantillon ont été mélangés à 1 ml d'HCL qualité HPLC (0,1 N) et agités pendant 1 min.

Puis, 2 extractions successives ont été faites par ajout de 3 ml d'acétate d'éthyle (Sigma) suivi par une agitation de 2 min et une centrifugation de 10 min à 1 740 g (Eppendorf). Les phases organiques des deux extractions sont récupérées et mélangées. Les tubes ont ensuite été placés sous un évaporateur à azote. Enfin, 250 µl de méthanol ont été utilisés pour récupérer le MDA et les échantillons ont été conservés à -20°C.

Pour déterminer les concentrations, à 100 µl d'échantillon extrait, nous avons ajouté 650 µl H₃PO₄ dilué au 100^{ème} et 250 µl d'acide thiobarbiturique à 0,6 % (TBA, Sigma). Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain marie à 100°C pendant 30 min à l'obscurité. Une fois les échantillons refroidis à 4°C, 100µl d'échantillon ont ensuite été injectés dans l'HPLC (Waters). La séparation a été réalisée avec une colonne analytique Symmetry Shield C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm, Waters) équipée d'une colonne de garde Symmetry Shield C18 (5 µm, 3,9 x 20 mm, WATERS). La phase mobile était constituée de méthanol et de KH₂PO₄ à 50 mM (pH 6,8) (40:60, v/v). Le débit a été maintenu constant à 1 ml.min⁻¹ pour une pression de 2 000 psi. La détection fluorimétrique a été effectuée avec une excitation à 527 nm et une émission à 551 nm. La concentration en MDA a été quantifiée à partir de la hauteur du pic correspondant à l'aide du logiciel de chromatographie Empower. Le pic de l'adduit MDA-TBA a été calibré avec une solution étalon de 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (TEP). On obtient ainsi les résultats en nanomoles de MDA par gramme de biomasse fraîche (nmol.g⁻¹).

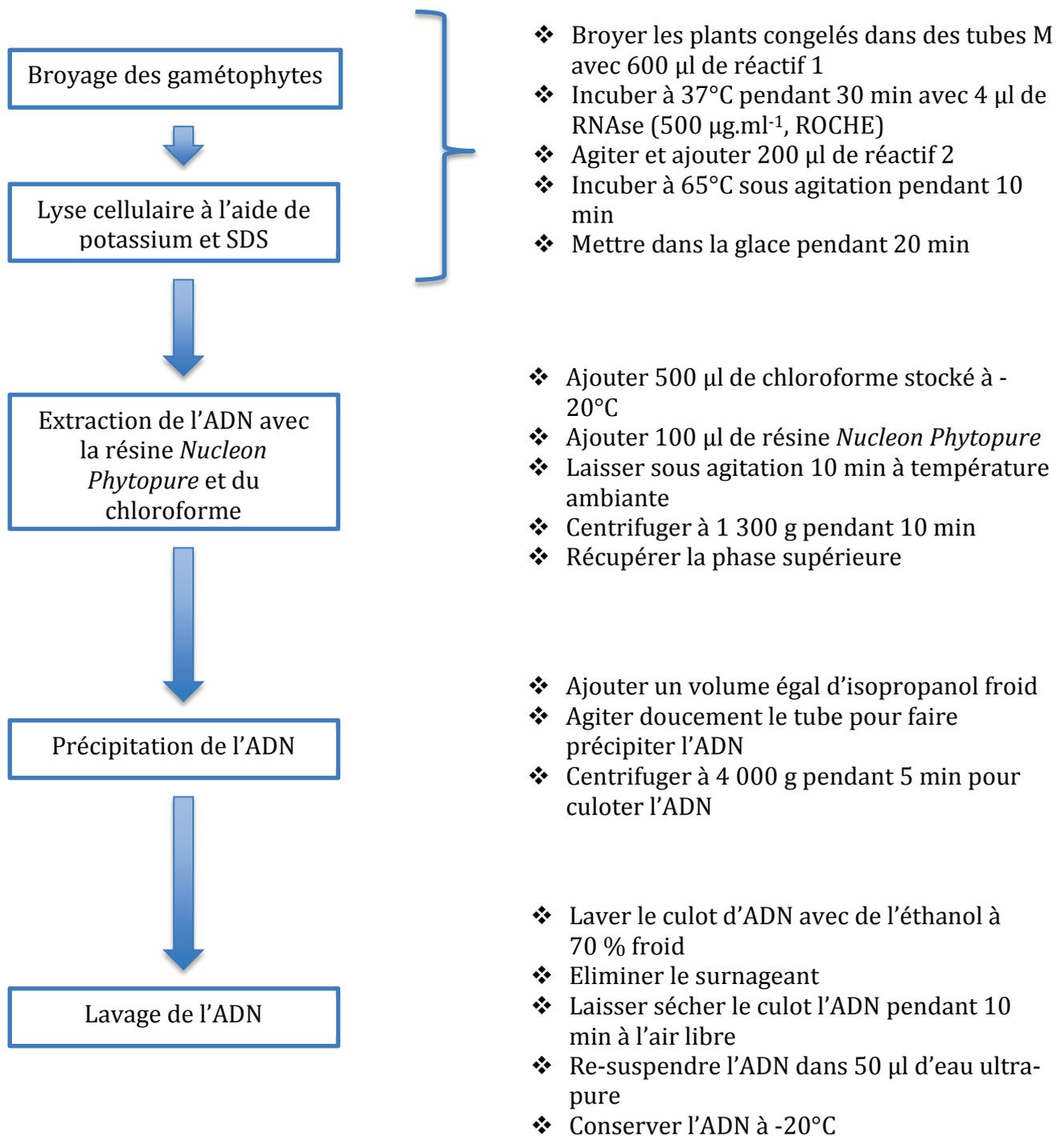


Fig. 29: Protocole d'extraction d'ADN chez *Physcomitrella patens* (d'après "Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit", GE HealthCare)

2.4.6. La 8-OHdG

Le dosage de la 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG) s'est déroulé en trois étapes :

- ❖ l'extraction de l'ADN des gamétophytes de *Physcomitrella patens*,
- ❖ la digestion de l'ADN par l'action de deux enzymes : une nucléase (nucléase P1, Sigma) et une phosphatase (phosphatase alcaline, Sigma),
- ❖ et la mesure de la quantité de l'adduits 8-OHdG.

Contrairement aux biomarqueurs précédents, les plants de *Physcomitrella patens*, destinés à l'extraction d'ADN et au dosage de la 8-OHdG, ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Le broyage a été fait le jour de l'extraction d'ADN.

L'extraction de l'ADN chez les gamétophytes de *Physcomitrella patens* a été réalisée à l'aide du kit « Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit » (GE Healthcare) en suivant les recommandations du fabricant (figure 29).

Une fois l'extraction d'ADN réalisée, la mesure de la concentration d'ADN a été faite à l'aide d'un NanoDrop ND 1000 (V3.7.1) (Thermo Scientific) à 260 nm et à 280 nm. La concentration est donnée en ng.µl⁻¹.

Préalablement au dosage de la 8-OHdG, il est nécessaire de digérer l'ADN par l'action de deux enzymes : une nucléase et une phosphatase. Cette étape de digestion de l'ADN a été faite la veille du dosage de la 8-OHdG. Premièrement, 38 µl d'échantillon d'ADN ont été incubés pendant 2 min à 100°C avant d'être placé sur de la glace. Puis, ont été ajoutés 3 µl d'acétate de potassium (250 mM, pH 5,4, Sigma), 3 µl de sulfate de zinc (10 mM, Sigma) et 2 µl de nucléase P1 (5 units/échantillon, Sigma). Ce mélange a été laissé incubé à 37°C pendant 12h. Le lendemain, 6 µl de Tris-HCL (0,5 M, pH 8,3) et 2 µl de phosphatase alcaline (0,31 U/µl, Sigma) ont été ajoutés et incubés pendant 2 h à 37°C.

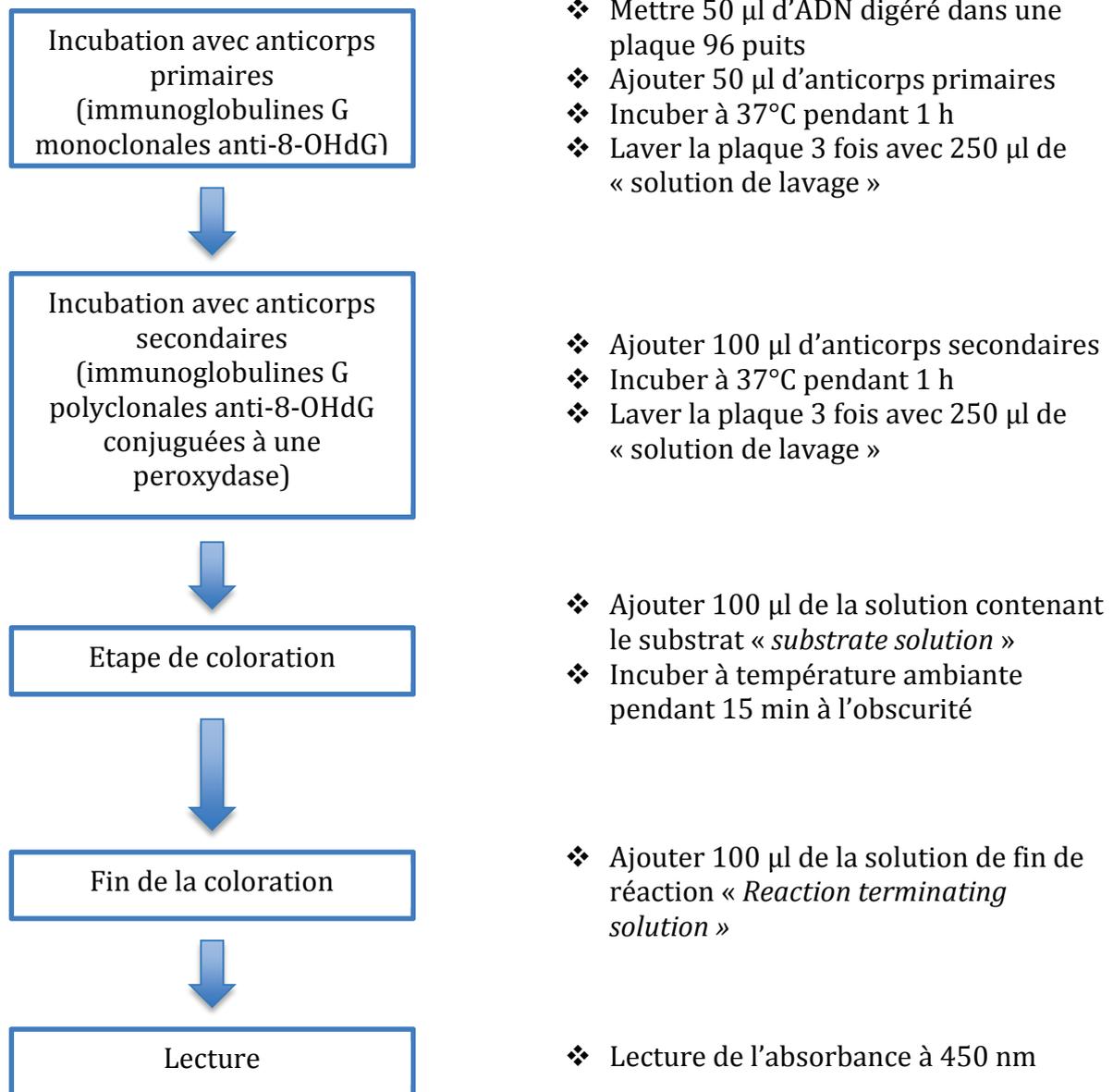


Fig. 30 : Protocole de dosage de la 8-OHdG (d'après New 8-OHdG Check ELISA, Gentaur)

Le dosage de la concentration de 8-OHdG (adduit à l'ADN) a été fait, quant à lui, au moyen du kit « New 8-OHdG Check ELISA » (New 8-OHdG check; Gentaur) en suivant les recommandations du fabricant (figure 30). Le principe de cette méthode immunoenzymatique par compétition est basé sur l'addition d'un standard ou d'un échantillon et d'immunoglobulines G monoclonales anti-8-OHdG, puis d'immunoglobulines G polyclonales anti-8-OHdG conjuguées à une peroxydase, et de tétraméthylbenzidine. L'intensité de la coloration mesurée par spectrométrie UV (450 nm) est inversement proportionnelle à la concentration en 8-OHdG présente dans les standards et les échantillons. Afin de déterminer la concentration en 8-OHdG dans les échantillons, une gamme de 8-OHdG a été préparée. Les résultats obtenus sont en nanogrammes de 8-OHdG par nanogramme d'ADN (ng/ng_{ADN})

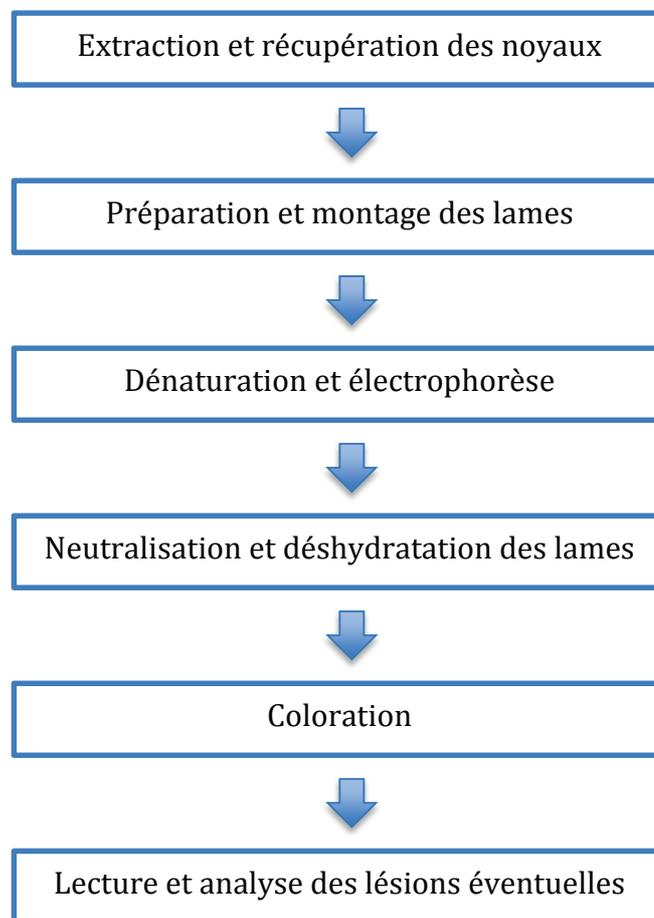


Fig. 31 : Protocole général adapté pour la réalisation d'un test des Comètes (version pH neutre ou version alcaline) chez *Physcomitrella patens*

2.4.7. Le Test des Comètes

Ce test a été développé en collaboration avec Smail Talahari et le Dr. Fabrice Nesslany, Directeur du Laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille.

2.4.7.1 Principe du test

Le test des comètes est une méthode électrophorétique sur gel de cellules uniques permettant la détection de dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation des cellules eucaryotes. A l'origine, Ostling et Johanson (1984) ont développé un test à pH neutre afin de pouvoir détecter les cassures doubles brins de l'ADN. En 1988, Singh *et al.* ont mis au point ce test à pH alcalin (pH>13) permettant de détecter les dommages multiples à l'ADN (eg: cassures simples brins, dommages alkali-labiles) comme les réparations incomplètes de l'ADN. Cette version à pH alcalin est la plus utilisée en toxicologie génétique. Ainsi, lors de nos travaux, nous nous sommes inspirés des travaux de Singh *et al.* (1988), Gichner *et al.* (2004) ainsi que de l'expérience du laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille et du Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille 2. Un protocole a ainsi été adapté pour une application sur notre modèle végétal (*Physcomitrella patens*). Ce test a été développé aussi bien pour les gamétophytes que pour le protonéma de *Physcomitrella patens*. Le schéma général de ce protocole est donné dans la figure 31.

2.4.7.1 Extraction et récupération des noyaux

Les végétaux possèdent une paroi cellulaire pecto-cellulosique en plus de leur membrane plasmique. Une simple lyse utilisant des détergents ou des sels en fortes concentrations ne suffit pas pour isoler les cellules et donc les noyaux. Gishner *et al.* (2004) préconise donc d'extraire les noyaux directement de manière mécanique. Cette étape a été déterminée pour les gamétophytes et le protonéma de *Physcomitrella patens*. Un demi-plant de *Physcomitrella patens* ou le protonéma équivalent à un quart d'une boîte de pétri (90 mm) ont été récoltés et broyés mécaniquement dans du PBS (Life Technologies) sur un lit de glace. Les différentes méthodes de broyage sont reprises dans le tableau 9. Le broyat ainsi obtenu a dû être préparé et déposé sur lames le jour de la récolte des plants et/ou du protonéma de *Physcomitrella patens*. Il peut être placé à 4°C en attendant d'être utilisé.

Tab. 9 : Méthodes de broyage adaptées aux différents tissus de *Physcomitrella patens*

Tissu végétal	Gamétophyte	Gamétophyte	Gamétophyte	Protonéma	Protonéma	Protonéma
Méthode de broyage	Médimachine (figure 32)	Lames de rasoir	Ciseaux en céramique (figure 33)	Médimachine	Lames de rasoir	Pilon-mortier
Volume de tampon d'extraction (PBS) en ml	1	0,3	0,3	1	0,3	0,3



Fig. 32 : BD™ Medimachine system

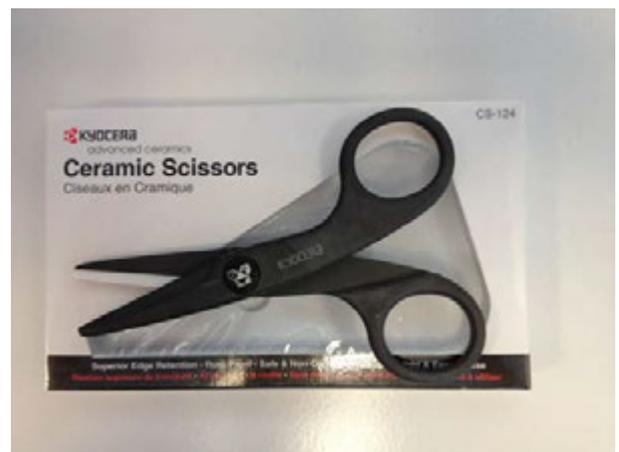


Fig. 33 : Ciseaux en céramique (Kyocera)

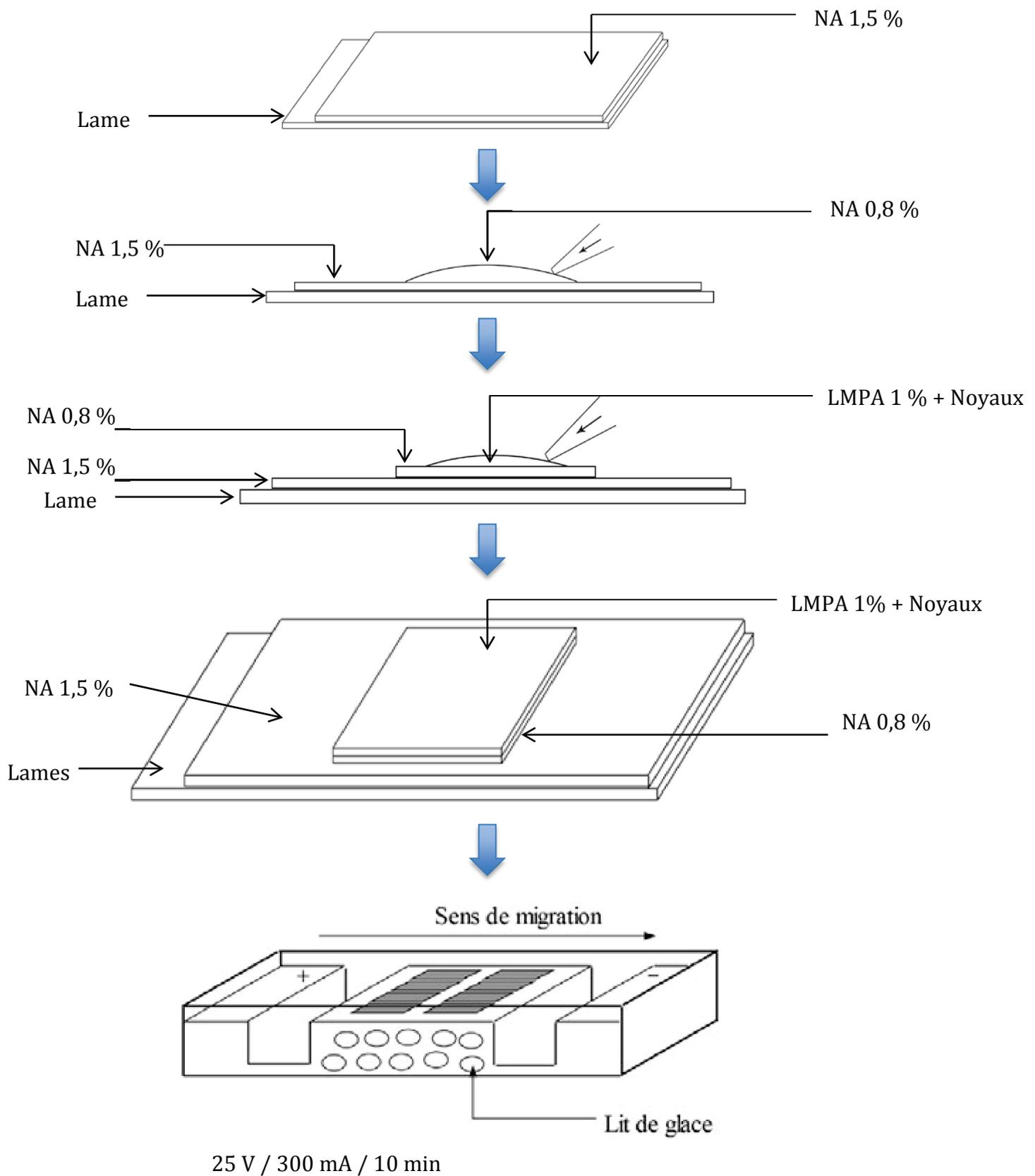


Fig. 34 : Protocole de montage des lames de microscopie pour le test des comètes adapté pour *Physcomitrella patens* (d'après Manier, 2008).

2.4.7.2 Préparation et montage des lames

Les gels utilisés pour la préparation des lames ont été préparés dans du PBS (Life Technologies). Les lames brutes de microscopes ont été préalablement numérotées puis immergées dans un gel d'agarose à point de fusion normal (NA) (Bio-Rad) préparé à 1,5 %. Le dessous des lames a ensuite été essuyé, puis les lames ont été séchées à l'air libre sur une surface plane pendant au minimum 12 h. Les lames ainsi préparées ont été stockées sur un support de lames, à température ambiante dans un endroit sec. Cette première couche d'agarose permet d'assurer l'adhérence de la totalité des autres couches à venir.

La figure 34 présente le protocole de préparation des lames. Le jour de l'essai, une nouvelle couche de NA à 0,8 % a été déposée sur la pré-couche de NA à 1,5 % et elle est recouverte immédiatement d'une lamelle (24 x 32 mm). Puis, les lames ont été laissées à plat jusqu'à solidification de la couche de NA à 0,8 %. La lamelle a ensuite été délicatement retirée. Au broyat cellulaire (200 µl) ont été ajoutés 200 µl de gel d'agarose à bas point de fusion (LMPA) (Bio-Rad) préparé à 1 %, et délicatement mélangé à l'aide d'une micropipette. Puis, 75 µl de ce mélange ont été déposés sur la couche de NA à 0,8% et directement recouvert d'une lamelle (24 x 32 mm). Les lames ont été, de nouveau, laissées à plat jusqu'à solidification de cette couche de LMPA mélangée aux noyaux. Toutes ces étapes sont réalisées à l'abri de la lumière afin d'éviter d'induire des lésions supplémentaires à l'ADN.

2.4.7.3 Dénaturation de l'ADN et électrophorèse

Une fois les lames sèches, les lamelles sont retirées délicatement et les lames sont placées dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie avec un tampon fortement alcalin (30 ml de NaOH (10 N) (Sigma) + 5 ml EDTA (200 mM) (Sigma), QSP 11 ; pH>13).

Les lames peuvent aussi être placées dans un tampon à pH 7 (TBE buffer) (Olive et Banath, 1993 ; Koppen *et al.*, 1999).

Les lames sont laissées 10 min ainsi pour permettre le déroulement de la molécule d'ADN suivi par la dénaturation de l'ADN double-brin, c'est-à-dire la séparation des deux brins. Cette étape s'est déroulée à 4°C et à l'obscurité.

Après cette étape de déroulement, un courant d'électrophorèse de 25 V et 300 mA a été appliqué pendant 10 min toujours à 4°C et à l'obscurité. Cette étape va permettre de séparer les éventuels fragments d'ADN endommagés de la double hélice d'ADN.

La durée de l'étape de déroulement et celle de l'électrophorèse ont été adaptées à *Physcomitrella patens*.

2.4.7.4 Neutralisation et déshydratation des lames

A la fin de la migration, les lames ont été placées dans un portoir et plongées dans deux bains successifs composés d'un tampon de neutralisation (Trizma base concentré à 0,4 M, pH 7,5, Sigma) pendant environ 5 min chacun. Ce tampon de neutralisation permet d'éliminer les sels et détergents qui pourraient gêner la lecture des lames. Enfin, les lames ont été plongées dans un bain d'éthanol absolu pendant 5 min afin de les déshydrater. Enfin, elles ont été séchées à l'air libre pendant 12 h. Les lames ont ensuite été stockées dans une boîte prévue à cet effet et conservées dans un endroit sec jusqu'à leur observation. Elles peuvent être ainsi conservées pendant 6 mois.

2.4.7.5 Coloration, lecture et analyse des lésions éventuelles

Afin de pouvoir lire les lames, 30 μ l d'iodure de propidium (20 μ g.ml⁻¹) ont été déposés sur les noyaux. Les observations ont été faites à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland) équipé d'un filtre d'excitation 515-560 nm et d'un filtre barrière de 590 nm avec un objectif x50. L'examen des comètes a été fait à l'aide d'une caméra CCD connectée au système d'analyse d'image COMET ASSAY IV™ (Perspective Instruments).

Afin de pouvoir juger de la fragmentation de l'ADN, nous nous sommes intéressés à l'*Olive Tail Moment* ou OTM. Ce paramètre se base sur la longueur de la queue de la comète et à la quantité d'ADN présent dans cette dernière. (Singh, 2006 ; Eunil *et al.*, 2004). La longueur de la queue correspond à la distance maximale parcourue par l'ADN qui migré à partir du noyau et la quantité d'ADN dans la queue de la comète est estimée par l'intensité lumineuse émise par cette dernière par rapport au bruit de fond (Manier, 2008). La formule permettant le calcul de l'OTM est la suivante :

$$\text{OTM} = \% \text{ d'ADN dans la queue } \times d$$

Avec d = la distance entre les centres de gravités de la queue et de la tête de la comète

Tab. 10 : Gènes d'intérêt impliqués dans le stress oxydant chez *Physcomitrella patens*. Amorce sens (5'-3') : R (reverse) – Amorce anti sens (3'-5') : F (forward)

Protéines	Isoformes	Amorces	Sonde	N° accession	Source
Protéines ribosomale L21	PR L21	F : CAGTAATCAAAGGAAGAAATTTACATTTCTCATCTT R : TCCATCTAAACAAATTTGAATCTACTACAAAATCGA	ACATCGACAAAAATTCA	GenBank : AP005672.1	Martin <i>et al.</i> , 2009
	MDHAR 1	F : CATGCTTGATGCCTCGTTTGTGTT R : GATGTTTACGCCCTTACCCCTCATAGT	ACACCCGAACTTGCC	GenBank : DQ159869.1	
	MDHAR 2	F : GCTTCATGCCTCGTTTGTGTTACAC R : CCCTTGATGATGTTTACACCCCTTAT	CCGAGCTTGCCCTCCTT	GenBank : DQ159870.1	Lunde <i>et al.</i> , 2006
Monodehydroascorbate réductase (MDHAR)	MDHAR 3	F : AGGCAAAAGGGTATCAACATCATCAA R : TGCCCTGATCATCTTTCTCAAACG	CAGTCACGGATGTTCC	GenBank : DQ159871.1	
	AP 80 A	F : CATTTTCGTATGCGGACCTTAATTTTCG R : TGGATGAACGTGCGCTTTACA	ATTGCTGCTCAATCTGC	Cosmoss : Pp1s43_80V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008
	AP 82 A	F : AAGCCCGCAGGAAGATAGG R : TGATCGGTGCGCAGTTCTT	CTCTGCTACCATCCCC	Cosmoss : Pp1s152_82V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008
Ascorbate peroxydase	AP 86 A	F : TCTGTGCGTGTTCATGTTGTGA R : AAGGATGATGGGTGCACAGTT	CTTATCGCCCGGAGCCCC	Cosmoss : Pp1s152_86V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008
	AP 255 A	F : CGCAATCTCAATCAGGAAGAAGGA R : CGACACTGCTGCCATAGCT	ACCACGAAAGGTTTCC	Cosmoss : Pp1s30_255V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008
	GR 56 A	F : AAGAAAACCTTGAGAAATCGAGGCATT R : CTTAATTCACCTGCCACCTTCT	CAGCTTCGTGAGATTTG	Cosmoss : Pp1s116_56V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008
Glutathion réductase	GR 127 A	F : GCAAAAACCTGCTTTCGGAAATGAG R : GTTGAGTGAACACCCGCTGAAG	CAAACTGATTACAGATTTAT	Cosmoss : Pp1s13_137V6	Rensing <i>et al.</i> , 2008

2.4.8. La modulation de l'expression génique

2.4.8.1 Le choix des gènes

Physcomitrella patens est l'organisme de référence pour les végétaux inférieurs dans les études biomoléculaires, son génome ayant été entièrement décodé (Rensing *et al.*, 2008). Cependant, il n'y a pas toujours de correspondance connue entre gène séquencé et protéine traduite. Afin de sélectionner nos gènes d'intérêt, nous avons donc décidé de pratiquer une analyse bibliographique et d'utiliser des sites spécialisés fournissant des ressources de biologie liés au génome et au transcriptome de différents modèles biologiques comme NCBI et spécifique à *Physcomitrella patens*, intitulé COSMOSS.org. Nous nous sommes intéressés à plusieurs gènes impliqués dans le stress oxydant. Le tableau 10 présente les gènes que nous avons choisis d'analyser ainsi que les séquences des primers et des sondes utilisées pour les RT-qPCR en temps réel. Les séquences des amorces et des sondes ont été choisies de manière à ce qu'elles chevauchent au moins deux exons. Cela permet d'être certain de ne pas amplifier de l'ADN résiduel.

Certains gènes possèdent des variants d'épissage (les gènes codant pour les isoformes de la glutathion réductase et de l'ascorbate peroxydase). Nous avons choisi de tenir compte de tous les variants d'épissage. Pour cela, les amorces et les sondes ont été déterminées au niveau des séquences communes entre les variants d'épissage.

2.4.8.2 L'extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux des échantillons de *Physcomitrella patens* a été réalisée à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen, Courtebouef, France). Cependant, il a fallu adapter le protocole décrit par le fournisseur afin d'optimiser le rendement d'extraction des ARN. En effet, un plant de *Physcomitrella patens* a été broyé dans 1 ml de tampon de lyse RLT complété avec du β -mercaptoéthanol (1 %) (Sigma) à l'aide d'un gentleMacs™ dissociator (Miltenyi Biotec). Puis le lysat est passé à travers une colonne *QIAshredder* pour éliminer les débris cellulaires. Le lysat récupéré a été mélangé avec 0,75x volume d'éthanol 100% (soit 750 μ l) au lieu de 0,5x volume comme préconisé par le fabricant. Puis, les étapes suivantes sont celles décrites dans le protocole du kit. Le mélange a ensuite été placé dans une colonne RNeasy spin et centrifugé pendant 15 s à 8 000 g. L'effluent a été jeté. La colonne a été rincée avec 700 μ l de Buffer RW1 et la colonne a été centrifugée 15 s à 8 000 g. Puis, successivement 500 μ l de tampon RPE ont été ajoutés deux fois et la colonne a été centrifugée une première fois 15 s à 8 000 g et la seconde fois 2 min à 8 000 g. La colonne RNeasy spin a été de nouveau centrifugée pour éliminer tous les résidus de RPE. Enfin, l'ARN a été élué à l'aide de 50 μ l d'eau RNase free. Le dosage de l'ARN a été fait par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectromètre BioSpec-nano Spectrophotometer for life Science (Shimadzu-Biotech).

2.4.8.3 L'intégrité des ARN extraits

L'intégrité des ARNs extraits a été vérifiée en adaptant la méthode de Masek *et al.* (2005). Brièvement, 1 µg d'ARN total a été dénaturé pendant 5 min à 65°C dans 50 % (v/v) formamide, 1X TAE, 5 % (v/v) glycérol and 0,025 % (m/v) bleu de bromophénol. Après l'incubation, les échantillons sont immédiatement placés dans de la glace avant d'être chargés dans un gel d'agarose à 1,5 % (m/v) avec du bromure d'éthidium (0.5 µg/mL final ; Sigma).

2.4.8.4 La RT-PCR en temps réel

La RT-PCR en temps réel est une technique qui associe une rétro-transcription des ARNm en ADNc suivie d'une étape de PCR.

2.4.8.5 La synthèse des ADN complémentaires

Les ADNc simples brins ont été synthétisés par rétro-transcription des ARNs totaux. Les échantillons d'ARNs extraits ont été dilués pour obtenir 1 µg d'ARN dans 10 µl d'eau RNase free. Ces 10 µl de solution contenant les ARN ont été mélangés avec 10 µl de « Master MIX » du kit « High capacity cDNA synthetis Kit » (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, le Master Mix se compose de :

- 2 µl de RT Buffer 10X,
- 0,8 µl de dNTP Mix 25X (100mM),
- 2 µl de Random Primers 10X,
- 1 µl de RTase,
- 1 µl de RNase Inhibitor,
- Et complété avec 3,2 µl d'eau RNase free.

Les échantillons ont été placés dans un thermocycleur : Veriti Thermal cyler (Applied Biosystems). Le programme a été le suivant : 10 min à 25°C, 120 min à 37°C et 5 min à 85°C. Les échantillons ont été conservés à 4°C.

2.4.8.6 La PCR quantitative en temps réel

La méthode de PCR en temps réel utilisée est basée sur le principe des sondes TaqMan™ (figure 35). Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome reporter, le 6-FAM (6-carboxyfluorescéine) et portent à leur extrémité 3' un quencher non fluorescent ainsi qu'une molécule MGB (minor groove binder). Le quencher induit l'extinction de la fluorescence émise par le reporter ; l'hydrolyse de la sonde par l'activité 5' exonucléase de la Taq polymérase provoque la séparation du fluorochrome et du quencher entraînant l'émission d'un signal fluorescent. La molécule MGB augmente le Tm de la sonde et stabilise le duplex formé entre la sonde et la matrice d'ADNc, ce qui permet l'utilisation de sondes plus petites de spécificité et de sensibilité augmentées.

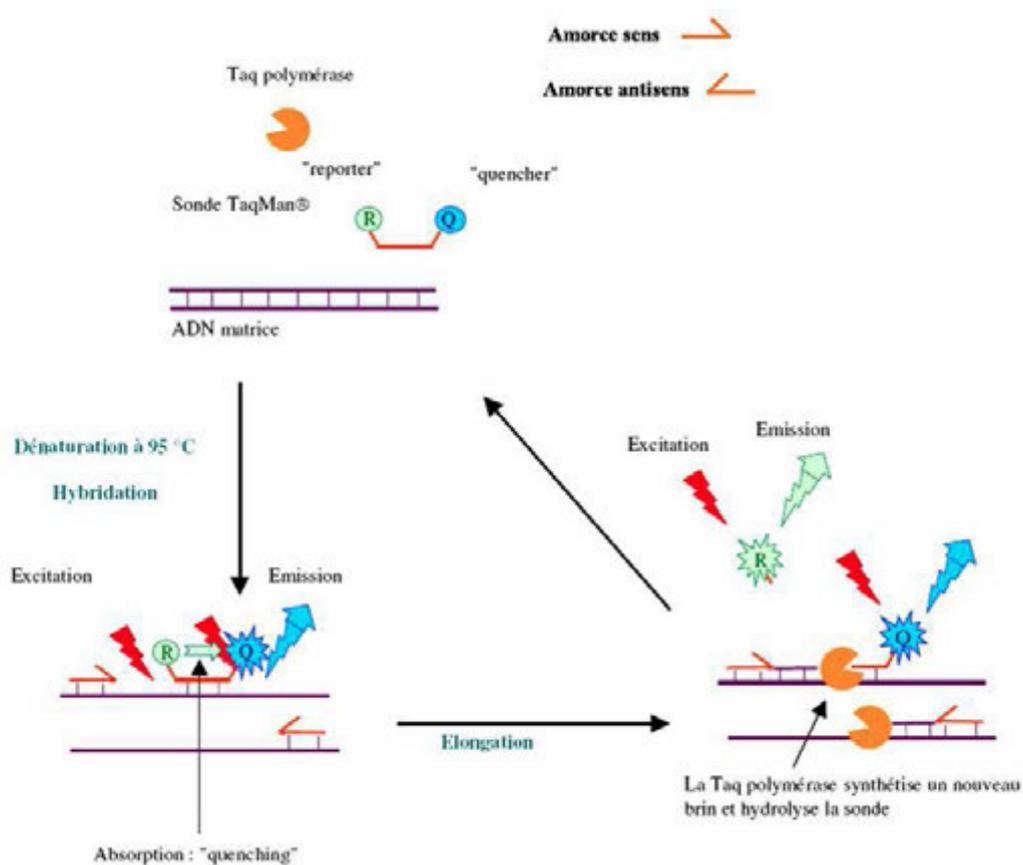


Fig. 35 : Principe des sondes TaqMan™ (D'après Céline Loriol, 2006)

Pour la PCR quantitative en temps réel, la mesure de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de TaqMan™ Assays (Applied Biosystems). Ces TaqMan™ Assays sont constitués d'amorces sens et anti-sens et d'une sonde TaqMan spécifique du gène cible. Le tableau 11 présente les produits de réaction à utiliser pour la réalisation de la PCR en temps réel.

Tab. 11 : Produits de réaction nécessaires à la réalisation d'une PCR en temps réel

	Volume pour une réaction de 20µl (en µl)
TaqMan Gene Expression Assay (20X) (Applied BioSystems)	1
TaqMan Gene Expression Master MIX (2X) (Applied BioSystems)	10
EAU nuclease free	8
<i>Volume du Mix</i>	18
Produit de RT (50 ng)	1
<i>Volume total</i>	20

Les échantillons ont ensuite été placés dans le thermocycleur Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Le tableau 12 présente le programme d'amplification pour la réalisation de la PCR en temps réel.

Tab. 12 : Cycles programmés pour la réalisation de la PCR en temps réel

Etape	Incubation de l'Uracyl N-glycosylase	Activation de la Taq polymérase	PCR	
			40 cycles	
			Dénaturation	Hybridation/Extension
Temps	2 min	10 min	15 sec	60 sec
T° C	50	95	95	60

2.4.8.7 La méthode de quantification

La quantification de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée par la méthode comparative des cycles seuil ou Ct (*threshold cycle*). L'intensité de la fluorescence émise par le fluorochrome augmente à chaque cycle de PCR, en fonction de l'augmentation de la quantité d'amplicons. Une valeur seuil de fluorescence (*threshold*) a été fixée dans une zone où le signal généré par chaque échantillon est significativement différent du bruit de fond (au moins 10 fois le signal de la ligne de base) et où la réaction de PCR est en phase exponentielle pour tous les échantillons. Le Ct, ou nombre de cycles de PCR nécessaire pour générer un signal qui atteint le seuil, a été déterminé avec le logiciel RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). Les résultats d'expression ont été mesurés de façon relative par rapport au gène de référence (ou gène de ménage). Le gène de référence choisi est le gène de la protéine ribosomale L21 (PR L21) (Martin *et al.*, 2009).

Les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec la valeur de Ct du gène de la PR L21. Nous avons obtenu ainsi une valeur de ΔCt ($Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{ARNr 18S}}$). Afin de mesurer les différentiels d'expression entre les différentes conditions expérimentales, nous avons calculé des valeurs de $\Delta\Delta Ct$. Ces valeurs correspondent à la différence entre le ΔCt du gène dans une condition donnée et le ΔCt de ce même gène dans une condition de référence. La quantité relative (RQ) de transcrits entre deux conditions a été déterminée avec la formule $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. Notre modèle humain : les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines

3.1. La culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC)

3.1.1. La culture classique

Les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (figure 36) ont été établies à partir d'explants de la muqueuse bronchique macroscopiquement sains prélevés sur des pièces opératoires provenant de patients ayant subi une lobectomie ou une pneumectomie. Ces explants ont été mis en culture en boîtes de pétri recouvertes de collagène de queue de rat (0,03 mg.ml⁻¹, Life Technologies), dans 7 ml d'un milieu de croissance sans sérum (BEGM, Lonza) complétés avec de la pénicilline à 100 IU.ml⁻¹ (Life Technologies), de la streptomycine à 10 µg.ml⁻¹ (Life Technologies) et de la fungizone à 2,5 µg.ml⁻¹ (Life Technologies). Après une période d'adhérence de 24 h, 7 ml de ce même milieu ont été ajoutés. Une fois confluentes, les cellules issues des différents explants sont dissociées par un traitement à la trypsine (1X) (Life Technologies), puis rassemblées, réparties dans des plaques 6 puits, coatées au collagène de queue de rat à 0,03 mg.ml⁻¹ (Life Technologies) et mises en culture jusqu'à confluence. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les explants peuvent être réensemencés pour produire de nouvelles cultures. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours.

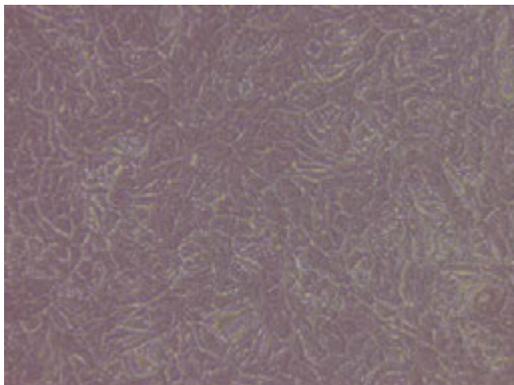


Fig. 36 : Culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (Photo L. Canivet)

3.1.2. Le développement de méthode : la culture en Interface Air-Liquide (IAL)

Pour les cultures en interface air-liquide (figure 37), les cellules ont étéensemencées sur des inserts poreux recouverts de collagène de queue de rat (0,03 mg.ml⁻¹) placés chacun dans un puits d'une plaque 6 puits spécifique pour la culture en interface air-liquide. La croissance des cellules a été faite en milieu liquide, B-ALI™ Croissance Medium (Lonza) ; 3 ml de milieu de culture de croissance ont été déposés dans le puits et 2 ml ont été déposés dans l'insert. Une fois les cellules arrivées à confluence, la mise en interface air-liquide a été effectuée en aspirant le milieu de croissance puis en lavant les cellules par voie apicale avec du D-PBS (Life Technologies). Le milieu de culture déposé au fond du puits est, quant à lui, au contact du pôle basal des inserts. Lors de la culture en interface air-liquide les cellules ont été cultivées dans un milieu de différenciation : B-ALI™ Differentiation Medium (Lonza). La culture en interface air-liquide permet la différenciation cellulaire des cellules épithéliales en cellules ciliées et en cellules caliciformes. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours.



Fig. 37 : Culture de cellules épithéliales bronchiques humaines en interface air liquide

3.2. La caractérisation des cellules épithéliales bronchiques humaines

Afin de caractériser nos cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, nous avons utilisé deux techniques : une coloration PAS (Périodique-Acid-Schiff) et une coloration immunocytochimique. Les cellules ont été cultivées dans des lames composées de huit chambres (labtech BD, Falcon™).

3.2.1. La fixation des cellules

Les cellules ont été rincées avec du PBS. Puis, pour fixer les cellules, elles ont été incubées dans une solution de formaldéhyde à 1 % chauffé à 37°C pendant 3 min et incubées dans du méthanol conservé à -20°C pendant 5 min. Après l'élimination du méthanol, du PBS a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été stockée à 4°C.

3.2.2. La coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)

Lors d'une coloration PAS, les échantillons sont traités à l'acide périodique et les 1,2-glycols sont oxydés en groupes aldéhydes. Les aldéhydes forment, avec le réactif de Schiff, une réaction de coloration rouge lumineuse. La coloration PAS produit une réaction de coloration spécifique avec des polysaccharides non substitués, des mucopolysaccharides neutres, des mucoprotéines et des glycoprotéines, des glycolipides et des phospholipides.

Pour ces colorations, nous avons utilisé le kit de coloration PAS pour la détermination d'aldéhydes et de mucosubstances (Merck). Après un rinçage à l'eau distillée des cellules fixées, de l'acide périodique a été déposé sur les coupes pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été incubées avec du réactif de Schiff pendant 15 min et enfin avec une solution d'hématoxyline selon Gill III pendant 2 min. Entre chaque étape, les coupes ont été rincées sous l'eau courante pendant 3 min puis à l'eau distillée. Enfin, les cellules sont montées entre lame et lamelle à l'aide de l'Eukitt® quick-hardening mounting medium (Sigma). Les coupes ainsi colorées sont observées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, France).

Cette coloration peut être aussi effectuée sur des cultures de cellules pulmonaires humaines cultivées en interface air-liquide (IAL). Pour cela, les membranes des inserts ont été découpées et les cellules ont été fixées en suivant le protocole décrit précédemment. Puis, elles ont été incluses dans de la paraffine en collaboration avec le laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Lille 2. Des coupes d'environ 5 µm sont faites à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2245). Ces coupes sont ensuite déparaffinées dans trois bains successifs de xylène de 3 min chacun et réhydratées par trois bains successifs d'alcool à 100 %, 95 % et 70 % de 3 min chacun. Puis, la coloration PAS fut réalisée en suivant le protocole décrit précédemment.

3.2.3. La coloration immunocytochimique

Les cellules pulmonaires cultivées en labteck (BD Falcon™) ont été fixées comme décrit précédemment. Puis, les cellules ont été perméabilisées pendant 3 min avec du triton X-100 dilué à 0,2 % dans du PBS et elles ont été rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS. Puis, elles ont été incubées 1 h à 37°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS/3 % BSA/0,05 % Tween/0,08 % NaN₃ à la concentration voulue. Après trois lavages au PBS de 5 min, les cellules ont été incubées pendant 30 min à 37°C avec une fluorochrome Alexa 488 (Life Technologies) ou Cy3 conjugués avec un anticorps secondaire dilués respectivement à 1:400^e et 1:200^e. Elles ont ensuite été rincées trois fois pendant 5 min avec du PBS et elles ont été montées avec *SlowFade Gold Antifade reagent with DAPI* (Molecular Probes). Les images ont été acquises sur un microscope optique LEICA DMIRE 2 (objectif x40) avec le logiciel Metamorph.

Pour nos colorations, nous avons utilisés deux anticorps primaires :

- ❖ MUC5AC : mouse monoclonal MAB2011 (millipore) dilué au 1:250^e,
- ❖ Pan Cytokératine : Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin Clone PCK-26 (Sigma) dilué au 1:100^e.

L'Anticorps MUC5AC nous a permis de mettre en évidence la présence de mucine sécrétée par les cellules épithéliales bronchiques humaines, Pan-cytokératine nous a permis de confirmer que nous étions en présence de cellules épithéliales.

Concernant, les anticorps secondaires, nous avons sélectionnés : l'anti-mouse Alexa488 A11029 et un anti-rabbit Cy3 AP132C.

3.3. Protocole de préparation des solutions de nanoparticules de fer

A la différence des études sur *Physcomitrella patens*, pour nos expositions des cellules pulmonaires humaines, la concentration en NP-Fe a été déterminée par un test de viabilité.

Une solution mère a été faite à partir d'un échantillon de Fe-NP pesé sur une balance de précision (Sartorius, précision 10⁻⁴). Les Fe-NP ont été dispersées dans un milieu équilibré en sel (HBSS, Life Technologies). La solution mère a été vortexée et placée dans un bain à ultra-son (Deltasonic; Somatherm; 28 kHz) pendant 15 min afin d'homogénéiser et de désagglomérer les nanoparticules. Dès la fin de la sonication la solution mère a été diluée pour la préparation de la solution d'exposition à une concentration voulue. Cette dernière étant connue, le volume à déposer dans les puits contenant les cellules a pu ainsi être calculé. Cette solution d'exposition a subi une sonication de 5 min juste avant d'être aliquotée pour les trois temps d'exposition (6, 24 et 48 h). L'aliquot servant à la première exposition (T48) a pu être utilisée le jour même et les autres ont été congelés.

L'exposition des cellules pulmonaires a été faite sur des cultures classiques et de manière à récolter toutes les cellules le même jour. La figure 38 présente le protocole d'exposition.

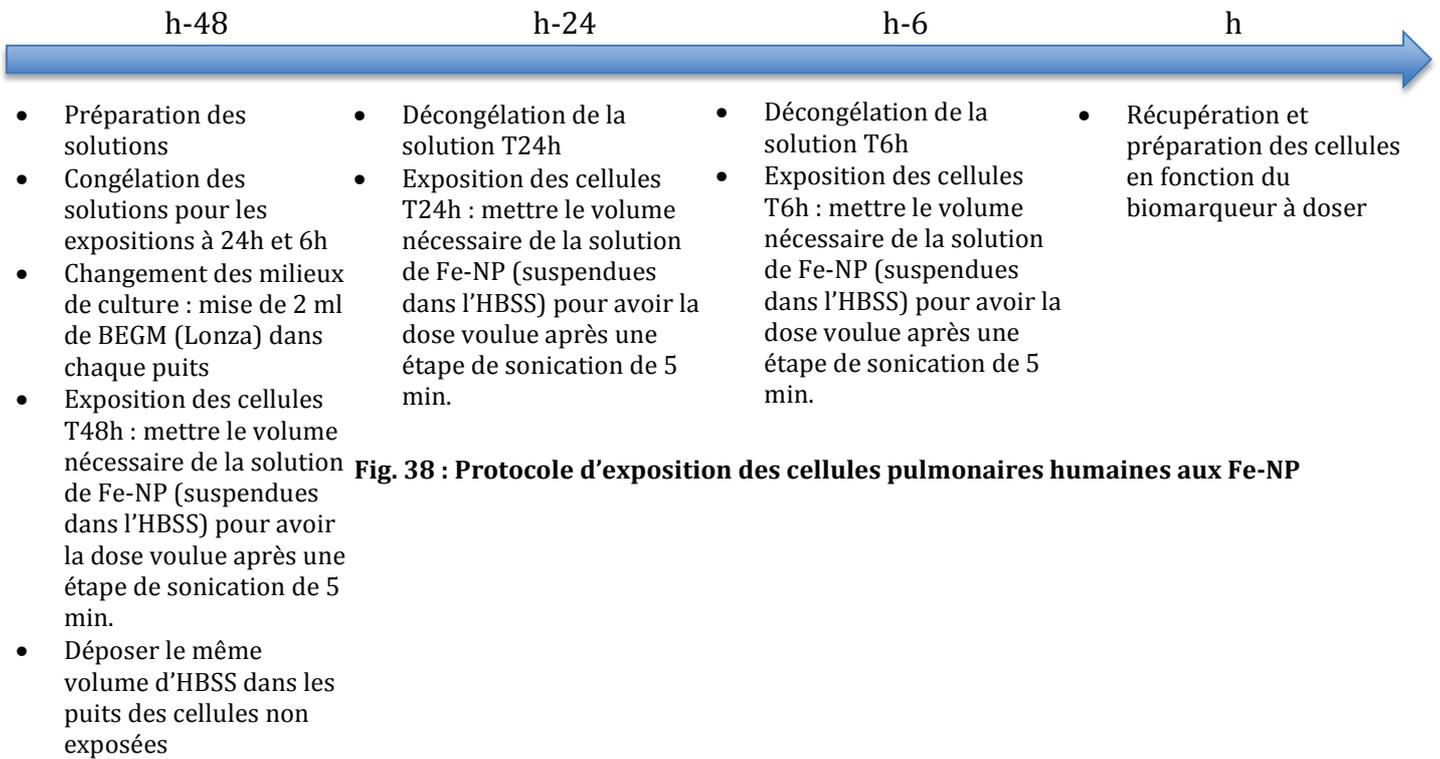


Fig. 38 : Protocole d'exposition des cellules pulmonaires humaines aux Fe-NP

3.4. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules pulmonaires humaines

Les cellules ont étéensemencées sur des filtres en polyéthylène téréphtalate qui composent les inserts que nous utilisons pour la culture des cellules pulmonaires en interface air-liquide.

Les échantillons ont été préalablement rincés 2 fois quelques minutes en tampon phosphate salin (PBS). Les cellules ont ensuite été fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 0,5 % et de glutaraldéhyde à 2 % pendant 20 min puis 40 min en renouvelant le fixateur. Puis, elles ont été rincées 3 fois 10 min en tampon phosphate à 0,1 M et sucrose 0,22 M. Une post-fixation a ensuite été réalisée dans un bain de tétroxyde d'osmium à 1% en PB 0,1 M à température ambiante pendant 1 à 2 h. Puis, les cellules ont été rincées 3 fois pendant 10 min dans de l'eau distillée. Les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (5 min en éthanol 50°, 5 min en éthanol 70°, 10 min en éthanol 80°, 2 x 10 min en éthanol 95°, 2 x 15 min en éthanol 100). Puis, les filtres ont été découpés avec un scalpel. Il a été important que les filtres ne sèchent pas; cette étape a donc pu être réalisée en résine. Puis les cellules sont mises deux fois 15 min en oxyde de propylène dans des cupules en verre. Elles sont ensuite incluses dans l'epon par les opérations suivantes :

- ❖ 3 x 15 min en mélange 50/50 (v/v) epon / oxyde de propylène ou éthanol 100°,
- ❖ 12 h en epon pour l'imprégnation.

Enfin, ces cellules ont été mises dans un bain d'epon fraîche pendant une heure puis de nouveau dans un bain d'epon pour une polymérisation à 56°C pendant 24 h à 48 h. Les coupes ultra-fines (50-90 nm) réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Reichert Ultracut E) ont été récupérées sur des grilles de nickel 100 mesh membranées. Enfin, ces coupes ultra-fines ont été contrastées par une coloration à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 10 minutes suivie d'une coloration au citrate de plomb de Reynolds pendant 8 min avant d'être observées au microscope électronique à transmission (Zeiss EM902) à 80 kV équipé d'une caméra Orius. Les images numériques ont été acquises avec le logiciel Digital Micrograph de Gatan.

3.5. Le stress oxydant et le dosage des biomarqueurs

3.5.1. La viabilité et le dosage de l'ATP

Afin d'étudier l'impact des Fe-NP sur la viabilité des cellules épithéliales bronchiques humaines, un test de viabilité a été réalisé à l'aide du kit CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (PROMEGA) en suivant les recommandations du fabricant. Après avoir exposées les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines aux nanoparticules en plaque blanche de 96 puits compatible

avec une lecture de luminescence, la plaque a été incubée à température ambiante pendant 30 min. Puis, un volume de CellTiter-Glo® Reagent égal au volume du milieu de culture cellulaire a été ajouté dans chaque puits (100 µl). La plaque a ensuite été mise sur agitateur orbital pendant 2 min à l'abri de la lumière. Enfin, la plaque a été incubée à température ambiante pendant 10 min pour stabiliser le signal de luminescence avant d'être lue avec un GloMax®-Multi Detection System (PROMEGA).

3.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques ont été réalisées dans des plaques 96 puits noires à fond transparent. Le même nombre de cellule a été ensemencé dans chaque puits. Toutes les solutions ont été préparées avec de l'HBSS (Life Technologies). Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, les cellules ont été rincées avec du PBS. Les cellules de tous les puits ont été incubées avec 100 µl d'une solution de carboxyH₂-DCFDA (20 µM ; Life Technologies). Certains puits additionnés de 50 µl de N-acétylcystéine (NAC) (40 mM) (Sigma) ont servi de contrôles négatifs. Tous les puits ont été complétés avec de l'HBSS pour obtenir un volume final de 200 µl.

Après une heure d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés et les suspensions de Fe-NP préparées pour obtenir une concentration finale de 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 µg.cm⁻² ont été déposées (50 µl). D'autres puits additionnés de 50 µl de phorbol ester myristate (PMA) (20 µM) (Sigma) ont servi de témoins positifs. Les puits servant de témoins négatifs ont été complétés aussi avec de la NAC (40 nM ; 50 µl). Tous les puits ont été complétés avec de l'HBSS pour obtenir un volume final de 200 µl. La fluorescence émise par le réactif oxydé a été mesurée à 37°C dans un lecteur microplaques GloMax®-Multi Detection System (PROMEGA) avec un filtre spécifique (excitation 492-495 nm – émission 517-527 nm) toutes les 10 min pendant 5 h.

3.5.3. Le glutathion

Les concentrations de glutathion réduit (GSH) et le glutathion oxydé (GSSG) ont été déterminées en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou *high-performance liquid chromatography* (HPLC) (Waters) en adaptant la méthode de Kandar *et al.* (2007). Après l'élimination du milieu de culture, 400 µl d'acide métaphosphorique à 10 % froid (Sigma) ont été déposés sur les cellules. Après une incubation de 10 min à 4°C, les cellules ont été récupérées à l'aide d'un râteau et déposées dans un tube. Elles ont ensuite été centrifugées 15 min à 4°C à 22 000 g. Puis, deux aliquots ont été réalisés (50 µl pour le dosage du GSH, 100 µl pour le dosage du GSSG) avant d'être immédiatement stockés à -80°C.

Pour le dosage du GSH, aux 50 µl de surnageant ont été ajoutés 200 µl d'EDTA 0,1% (hydrogénophosphate de sodium, 0,1M, pH 8). Pour la dérivation, à 240 µl du mélange précédent, 720 µl d'EDTA 0,1 % (hydrogénophosphate de sodium, 0,1M, pH 8) et 60 µl d'orthophtaldéhyde (OPA) à 0,1 % (m/v méthanol) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min.

Pour le dosage du GSSG, au 100 µl de surnageant ont été ajoutés 100 µl de N-ethylmaleimide (NEM; à 40 mM) et ce mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 25 min. Le NEM va interagir avec le GSH présent dans les échantillons. A ce mélange, 75 µl de NaOH (0,1M) ont été ajoutés pour arrêter l'action du NEM. Puis, à 120 µl du mélange précédent, 840 µl d'EDTA 0,1% (hydrogénophosphate de sodium, 0,1 M, pH 8) et 60 µl d'OPA à 0,1 % (m/v méthanol) ont été ajoutés. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité.

La détermination de la concentration des échantillons a été faite par une méthode de séparation et par détection fluorimétrique. Pour cela, 100 µl d'échantillon ont ensuite été injectés dans l'HPLC. La séparation a été réalisée avec une colonne analytique Symmetry Shield C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm, Waters) équipée d'une colonne de garde Symmetry Shield C18 (5 µm, 3,9 x 20 mm, WATERS) thermostatée à 37°C (Block broyeur SBM 130D STUART). La phase mobile était constituée de méthanol et de Na₂HPO₄ (25 mM) (25 :75, v/v; pH 6). Le débit a été maintenu constant à 1 ml.min⁻¹ pour une pression de 2 000 psi. La détection fluorimétrique a été effectuée avec une excitation à 350 nm et une émission à 420 nm. Les concentrations en GSH et GSSG ont été quantifiées à partir de la hauteur du pic correspondant à l'aide du logiciel de chromatographie Empower. Un étalonnage extérieur des concentrations de GSH et de GSSG a été réalisé. On obtient ainsi les résultats en nanomoles de GSH et de GSSG. Le ratio GSSG/GSH a ainsi pu être étudié.

3.5.4. Le malondialdéhyde et les protéines

Après l'exposition et l'élimination du milieu de culture, 500 µl de trypsine 1X (Life Technologies) ont été mis dans chaque puits et incubés entre 2 et 5 min à 37°C jusqu'à décollement des cellules. Pour inhiber la trypsine, 500 µl de RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) ont été ajoutés. Les cellules ont été récupérées et centrifugées pendant 4 min à 340 g (Sigma 2.5). Le surnageant a été éliminé et 250 µl de PBS ont été ajoutés sur le culot cellulaire et la solution cellulaire a été homogénéisée. 50 µl de cette suspension cellulaire ont été aliquotés pour le dosage des protéines et aux 200 µl restant ont été ajoutés 20 µl de butylated hydroxytoluène (BHT; 40 mM; Sigma). Les tubes ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

3.5.4.1 Les protéines

Le dosage des protéines au sein des cellules pulmonaires a été réalisé à l'aide du kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma) en suivant les recommandations du fabricant. Le principe de ce dosage est basé sur la réduction des ions cuivriques Cu²⁺ par les protéines présentes dans les échantillons et forment des ions Cu⁺ qui, en présence d'acide bicinchoninique (BCA), forment des complexes pourpres stables qui absorbent à

562 nm. L'intensité de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en protéines présentes dans l'échantillon.

Préalablement au dosage, les extraits ont été dilués au ½ avec de l'eau ultra-pure et vortexés pour homogénéiser les échantillons. Le tampon de réaction a ensuite été préparé en mélangeant 19 ml de la solution A et 0,38 ml de solution B. La solution A correspond à la solution d'acide bicinchoninique contenant de l'acide bicinchoninique, du carbonate de sodium, du tartrate de sodium et du bicarbonate de sodium dans du NaOH à 0.1 N (pH final 11,25). La solution B contient du sulfate de cuivre (II) pentahydrate

à 4 % (m/v). Dans une plaque de 96 puits, 25 µl d'échantillon ou 25 µl de standard ont été mélangés à 200 µl du tampon de réaction. La plaque a été incubée 30 min à 37°C avant d'être placée dans un lecteur UV (Multiskan® Spectrum, Thermo-Scientific) pour une lecture à 562 nm. Afin de déterminer la concentration en protéines dans les échantillons, une gamme a été faite chaque jour de mesure avec des standards de BSA (Sigma). Les résultats ont été exprimés µg.ml⁻¹.

3.5.4.2 Le malondialdéhyde

Afin de déterminer la quantité de MDA dans les échantillons, nous avons, dans un premier temps, extrait les aldéhydes totaux. Pour cela, 100 µl d'échantillon ont été mélangés à 1 ml d'HCL qualité HPLC (0,1 N) et agités pendant 1 min.

Puis, 2 extractions successives ont été faites par ajout de 3 ml d'acétate d'éthyle (Sigma) suivi par une agitation de 2 min et une centrifugation de 10 min à 1800 g (Eppendorf 5810R). Les phases organiques des deux extractions sont récupérées et mélangées. Les tubes ont ensuite été placés sous un évaporateur à azote. Enfin, 250 µl de méthanol ont été utilisés pour récupérer le MDA et les échantillons ont été conservés à -20°C.

Pour déterminer les concentrations, à 100 µl d'échantillon extrait, nous avons ajouté 650 µl H₃PO₄ dilué au 100^{ème} et 250 µl d'acide thiobarbiturique à 0,6 % (TBA, Sigma). Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain marie à 100°C pendant 30 min à l'obscurité. Une fois les échantillons refroidis à 4°C, 100 µl d'échantillon ont ensuite été injectés dans l'HPLC (Waters). La séparation a été réalisée avec une colonne analytique Symmetry Shield C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm, Waters) équipée d'une colonne de garde Symmetry Shield C18 (5 µm, 3,9 x 20 mm, WATERS). La phase mobile était constituée de méthanol et de KH₂PO₄ à 50 mM (pH 6,8) (40:60, v/v). Le débit a été maintenu constant à 1 ml.min⁻¹ pour une pression de 2 000 psi. La détection fluorimétrique a été effectuée avec une excitation à 527 nm et une émission à 551 nm. La concentration en MDA a été quantifiée à partir de la hauteur du pic correspondant à l'aide du logiciel de chromatographie Empower. Le pic de l'adduit MDA-TBA a été calibré avec une solution étalon de 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (TEP). Parallèlement, nous

avons effectué le dosage des protéines. Nous avons donc obtenu les résultats en micromoles de MDA par gramme de protéines ($\mu\text{mol.g}^{-1}$).

3.6. La modulation de l'expression génique

A la différence de *Physcomitrella patens*, la correspondance entre gène et protéine traduite est parfaitement connue chez l'Homme. Notre stratégie d'analyse a donc été légèrement différente. En effet, la sélection des gènes d'intérêt a été faite par l'utilisation de plaques *TaqMan™ Gene Expression Assay* ou TLDA configurées pour quantifier simultanément le niveau d'expression de 380 gènes différents. Puis, le niveau d'expression des gènes ainsi sélectionnés a été étudié chez les cellules issues de différents patients en PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).

3.6.1. L'extraction d'ARN

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit miRNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Courteboeuf, France) en suivant les instructions du fournisseur. Après l'exposition et le retrait du milieu de culture, les cellules ont été lysées par l'ajout de 700 μl de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Le lysat cellulaire a ainsi pu être congelé à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN. Le jour de l'extraction, les échantillons ont été décongelés et laissés 5 min à température ambiante. Puis, 140 μl de chloroforme ont été ajoutés et le tout a été mélangé pendant 15 s avant d'être laissé reposer 3 min à température ambiante. Puis, les échantillons ont été centrifugés à 4°C à 12 000 g pendant 15 min pour faire apparaître 3 phases. La phase aqueuse d'environ 350 à 400 μl a été transférée dans un nouveau tube à laquelle nous avons ajouté 1,5 fois un volume d'éthanol à 100%. Le tout a été bien mélangé avant d'être déposé dans une colonne RNeasy mini spin et centrifugé à 8 000 g minimum pendant 15 s. L'éluât a ainsi été éliminé.

Nous avons ensuite réalisé une étape de digestion à la DNase (solution stock à 1500 KU/550 μl d'eau RNase free). Pour cette étape, nous avons ajouté 350 μl de tampon RWT dans la colonne, elle a été centrifugée à 8 000 g (Thermo Scientific) pendant 15 s et l'éluât a été éliminé. Puis, 80 μl de DNase (solution d'incubation : 10 μl de solution stock + 70 μl de Buffer RDD) a été ajouté dans chaque colonne RNeasy mini spin et la colonne a été incubée 15 min à température ambiante. Puis, nous avons ajouté 350 μl de tampon RWT dans chaque colonne, puis elle a été centrifugée à 8 000 g pendant 15 s et l'éluât a été jeté.

Puis, 500 μl de tampon RPE ont été déposés dans chaque colonne qui a été centrifugée à 8 000 g pendant 15 s et l'éluât a été jeté. Cette étape a été répétée. Enfin, la colonne est centrifugée à sec à vitesse maximale (17 000 g) pendant 1 min pour sécher la membrane avant d'éluer l'ARN avec 50 μl d'eau RNase free par une centrifugation à 8 000 g pendant 1 min. Après le dosage de l'ARN, les échantillons ont été conservés à -80°C . Ce dosage a été fait par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectromètre BioSpec-nano Spectrophotometer for life Science (Shimadzu-Biotech).

3.6.2. La synthèse des ADN complémentaires

Le principe et le protocole de la rétro-transcription des ARN totaux en ADNc sont identiques à ceux détaillés pour *Physcomitrella patens*.

3.6.3. Le choix des gènes

Afin de sélectionner les gènes d'intérêt pour nos travaux de recherche, nous avons choisi d'étudier l'expression de 380 gènes par PCR quantitative en temps réel à haut débit grâce à l'utilisation de *TaqMan™ Gene Expression Assay* ou TLDA et de l'automate 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems). Les TLDA permettent de déterminer simultanément le profil d'expression de plusieurs centaines de gènes d'un même échantillon d'ARN. Il s'agit de plaques prêtes à l'emploi de 384 puits chaque puits contenant sous forme lyophilisée un *TaqMan™ Gene Expression Assay* composé d'un couple d'amorces et d'une sonde MGB *TaqMan™* spécifiques d'un gène cible. Les *TaqMan™ Gene Expression Assay* ont été créés grâce à un processus automatisé de conception qui prend en compte les homologies de séquences entre gènes, les différents ARNm résultant d'un épissage alternatif et l'existence potentielle de pseudo-gènes transcrits. Ils sont donc spécifiques d'un gène donné, sauf dans de rares cas où l'homologie de séquence nucléotidique est trop importante. L'efficacité d'amplification avec les *assays TaqMan™* est garantie comme étant comprise entre 90 et 100 %.

Pour notre étude, nous avons choisi une plaque TLDA se composant de 380 gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant, l'inflammation ou dans la régulation des processus apoptotique. Les gènes choisis se composent de :

- ❖ 223 gènes codant pour des protéines jouant un rôle dans les processus inflammatoires (cytokines et leurs récepteurs, enzymes impliquées dans la biosynthèse des éicosanoïdes, protéases, etc.),
- ❖ 43 gènes codant pour des protéines régulatrices du stress oxydant,
- ❖ 72 gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou de la régulation de l'apoptose,
- ❖ et 48 autres gènes (dont 15 gènes codant pour des mucines).

Les 4 derniers puits sont réservés au gène de référence. L'inclusion d'un gène de référence est indispensable pour normaliser les résultats obtenus pour les gènes cibles ; cela permet de corriger les variations liées à des différences quantitatives ou qualitatives des échantillons d'ADNc (variations liées au pipetage, variations de l'efficacité de la réaction de rétro-transcription, etc.). Par définition, le gène de référence doit présenter des niveaux semblables d'ARNm dans tous les échantillons analysés. Le gène codant pour l'ARN ribosomal 18S (ARN 18S) ayant été rapporté comme une des gènes de référence les mieux adaptés pour l'étude du profil d'expression des cellules pulmonaires, a été choisi.

Au vu de nos contraintes au cours de nos travaux de recherche, l'utilisation d'assays *TaqMan*TM a été faite sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues d'un seul patient, exposées à une dose de Fe-NP sur trois temps d'exposition : 6h, 24h et 48h. Les cellules ont été exposées en triplicats pour chaque condition : non exposé (NE), 6 h d'exposition (T6), 24 h d'exposition (T24) et 48 h d'exposition (T48). Une plaque TLDA a été utilisée par condition, de ce fait, nous avons poolé les triplicats d'ARNm. Les résultats obtenus ont donc été directement moyennés pour chaque condition (figure 39). Suite aux résultats obtenus, 12 gènes ont été sélectionnés et ont été étudiés en PCR quantitative en temps réel au niveau de cellules pulmonaires humaines issues de trois patients différents (dont celui qui a servi pour l'analyse en plaque TLDA).

3.6.1. La PCR en temps réel et la méthode de quantification

Les qPCR en temps réel ont donc été réalisées au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de trois patients différents (PCL 566, PCL569 et PCL614). Le principe et le protocole de la qPCR en temps réel ont été les mêmes que pour *Physcomitrella patens*.

4. Analyses statistiques

Dans le but de comparer les données avec celles de la littérature, elles ont été présentées sous forme de moyenne et écart type. Chaque valeur expérimentale a été comparée au contrôle (témoin négatif) correspondant pour chaque temps. Chaque exposition a été faite en triplicat ou en quadruplicat (pour l'étude de l'évaluation des ROS chez l'Homme). Quand la normalité et l'égalité des variances ont été vérifiées, une série d'analyse de variance (ANOVA) à une voie a été utilisée pour examiner les différences entre les cultures de plantes ou de cellules non exposées et celles exposées au Fe-NP. Ensuite, un test *post hoc* de Dunnett a été réalisé pour étudier les différences par paire en utilisant les échantillons non exposés (NE) comme référence. Quand la normalité n'est vérifiée, un test de Kruskal Wallis a été fait (suivi par un test *post hoc* de Dunnett). Le niveau de significativité statistique a été fixé à $p < 0,05$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SigmaStat[®] 2.03 (SPSS Inc., USA).

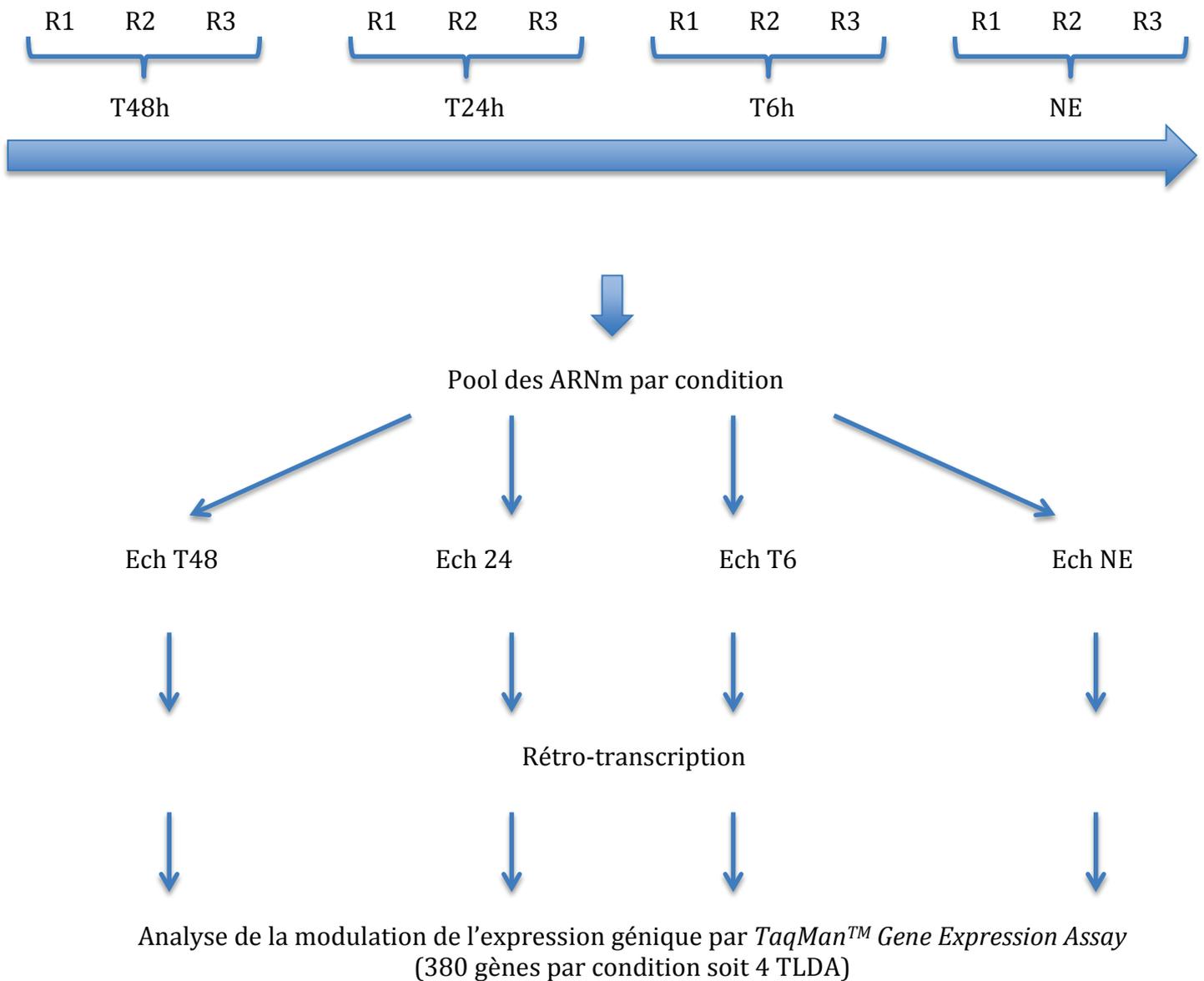


Fig. 39 : Schéma du protocole défini pour réaliser une analyse de la modulation de l'expression génique au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues d'un patient en utilisant des *TaqMan™ Gene Expression Assay* (TLDA) – R : réplicat ; Ech : échantillon

5. Bilan du chapitre 2

Ce deuxième chapitre a présenté les différentes techniques utilisées au cours de nos recherches pour caractériser nos nanoparticules de fer dans les différents milieux d'exposition, leur interaction avec la molécule d'ADN ainsi que leurs effets sur nos modèles biologiques, végétaux et humains.

Le tableau 13 récapitule les techniques utilisées au cours de nos travaux de recherche.

Parallèlement, nous avons aussi développé différentes méthodes telles que le test des comètes chez *Physcomitrella patens* et la culture primaire des cellules épithéliales bronchiques humaines en interface air-liquide.

Tab. 13 : Bilan des méthodes utilisées lors de nos analyses effectuées lors de nos travaux de recherche

Caractérisation des nanoparticules manufacturées de fer	
Diamètre nominal	MET
Forme	MET
Diamètre hydrodynamique et DPI	DLS (Zetasizer)
Composition chimique et composition de surface	XPS
Épaisseur de la couche d'oxyde	XPS
Pureté	XPS
Potentiel zeta	électrophorèse laser Doppler (Zetasizer)
Surface spécifique	BET
<i>Volume specific surface area</i>	BET
Interaction nanoparticules/vivant	
Adsorption d'ADN à la surface des nanoparticules suite à leur immersion dans différents milieux d'exposition	XPS
Etude d'écotoxicité sur <i>Physcomitrella patens</i>	
Pénétration	Microscopie confocale/MET
Cytotoxicité/Viabilité	Dosage de l'ATP
Stress oxydant	Dosage des ROS, du GSH, du GSSG et du MDA
Génotoxicité	Dosage de la 8-OHdG
Modulation de l'expression génique	RT-qPCR
Etude de toxicité sur cellules épithéliales bronchiques humaines	
Pénétration	MET
Cytotoxicité/Viabilité	Dosage de l'ATP
Stress oxydant	Dosage des ROS, du GSH, du GSSG et du MDA
Modulation de l'expression génique et inflammation	RT-qPCR

6. Références bibliographiques

- Ashton, N.W. & Cove, D.J.** 1977. The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 154: 87-95.
- Briggs, D. & Seah, M.P.** 1990. Practical Surface Analysis. Volume 1. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy" D, Briggs and M.P. Seah (Ed.). John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E.** 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 309-319.
- Champion, Y. & Bigot, J.** 1996. Preparation and characterization of nanocrystalline copper powders. *Scripta Materialia*, 35(4): 517-522.
- Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F. & Lo-Guidice J.J.** 2012. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with *in vivo* expression profiles. *Drug Metabolism And Disposition*, 40(10): 1953–1965.
- Cove, D. & Quatrano, R.S.** 2006. Agravitropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* do not complement mutants having a reversed gravitropic response. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1379–1387.
- Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R. & Betbeder, D.** 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*, 21(35): 355102.
- Eunil, L., Oh, E., Lee, J., Sun, D. & Lee, J.** 2004. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological Sciences*, 81: 121-132.
- Frank, W., Ratnadewi, D. & Reski, R.** 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220: 384–394.
- Gichner, T., Patkov, T., Sz.Kov, J. & Demnerov, K.** 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559: 49–57.

- Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Coro-Nado, M.J., Corredor, E., Testillano, P.S., Risueno, M. C., Marquina, C., Ibarra, M. R., Rubiales, D. & Perez-De-Luque, A.** 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101: 187-195.
- Hohe, A. & Reski, R.**, 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Science*, 163(1): 69-74.
- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O. & Zuzana Cervinkova, Z.** 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1382–1387.
- Koppen, G., Toncelli, L.M., Triest, L. & Verschaeve, L.** 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mechanisms of Ageing and Development*, 110: 13–24.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q.** 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3): 165-168.
- Lira, M.C.B., Santos-Magalhães, N.S., Nicolas, V., Marsaud, V., Silva, M.P.C., Ponchel, G. & Vauthier, C.** 2011. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1): 162-70, DOI:10.1016/j.ejpb.2011.02.013.
- Loriol C.** 2006. Les O-fucosyltransférases - Caractérisation des enzymes bovines et étude préliminaire du rôle de Pofut1 murine dans la différenciation de la cellule musculaire. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'université de Limoges, Limoges, 306p.
- Lunde, C., Baumann, U., Shirley, N.J., Drew, D.P. & Fincher, G.B.** 2006. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAr) genes in *Physcomitrella patens*: Implications for the evolution of the MDHAR family in plants. *Plant Molecular Biology*, 60: 259–275.
- Manier N.** 2008. Etude d'un nouveau modèle biologique végétal (*Trifolium repens*) en écotoxicologie, applicable aux sols contaminés par les métaux lourds. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 313p.

- Martin, A., Lang, D., Hanke, S., Mueller, S., Sarnighausen, E., Vervliet-Scheebaum, M. & Reski, R.** 2009. Targeted gene knockouts reveal overlapping functions of the five *Physcomitrella patens* FtsZ isoforms in chloroplast division, chloroplast shaping, cell patterning, plant development, and gravity sensing. *Molecular Plant*, 2(6): 1359-1372.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P. & Pospisek, M.** 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 336: 46–50
- Mittmann, F., Dienstbach, S., Weisert, A. & Forreiter, C.** 2009. Analysis of the phytochrome gene family in *Ceratodon purpureus* by gene targeting reveals the primary phytochrome responsible for photo- and polarotropism. *Planta*, 230: 27–37.
- Olive, P.L. & Banath, J.P.** 1993. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵IIdUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64(4): 349-358.
- Östling O. & Johanson K.J.** 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian celled. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Padham, A.K., Hopkins, M.T., Wang, T.W., Mcnamara, L.M., Lo, M., Richardson, L.G.L., Smith, M.D., Taylor, C.A. & Thompson, J.E.** 2007. Characterization of a plastid triacylglycerol lipase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 1372-1384.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Brad Barbazuk, N.A.W., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van De Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S. & Boore, J.L.** 2008. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*, 319: 64-69.
- Reski, R.** 2010. Moss methods – Cell culture. [en ligne]. Fribourg: Plant Biotechnology. [consulté le 14 octobre 2010]. Disponible sur internet: <http://www.plant-biotech.net/>.

Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.

Singh, K.K. 2006. Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067: 182-190.

Thornton, L.E., Keren, N., Ohad, I. & Pakrasi, H.B., 2005. *Physcomitrella patens* and *Ceratodon purpureus*, mosses as model organisms in photosynthesis studies. *Photosynthesis Research*, 83: 87-96.

**CHAPITRE 3 - LA
CARACTERISATION PHYSICO-
CHIMIQUE ET SURFACIQUE DES
NANOPARTICULES DE FER**

CHAPITRE 3 – LA CARACTERISATION PHYSICO-CHEMIE ET SURFACIQUE DES NANOPARTICULES DE FER

Ce chapitre est consacré à la caractérisation des nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC de Thiais (ou Fe-NP). Huit paramètres ont été déterminés en suivant les recommandations de Card et Magnuson (2010). Au vu des propriétés particulières des nanoparticules, il paraît indispensable de les caractériser finement avant toute étude de toxicité et/ou d'écotoxicité (Oberdorster et al., 2005 ; Card et Magnuson, 2010).

Ce chapitre se compose de deux parties. Premièrement, les huit paramètres caractérisant nos nanoparticules de fer seront présentés comme la taille, l'agrégation et/ou l'agglomération, la forme, la composition chimique, la pureté, la surface spécifique, le *volume specific surface area* (Kreyling et al., 2010), le potentiel zêta. La caractérisation physico-chimique a été faite au niveau des nanoparticules brutes mais aussi des nanoparticules immergées dans les différents milieux biologiques afin de déterminer l'influence de ces derniers sur la modification de certains paramètres. Les principaux résultats sont synthétisés dans le tableau 14.

Puis, le cœur de ce chapitre est constitué de la publication scientifique présentant l'analyse des propriétés de surface et de la réactivité de nos Fe-NP dans différents milieux biologiques (Volvic, milieux de culture de cellules pulmonaires) en les comparant aux nanoparticules brutes. Cette étude nous a également permis de déterminer la réactivité de ces nanoparticules en contact avec la macromolécule d'ADN. En effet, les Fe-NP préparées par évaporation-condensation cryogénique (10 nm-100 nm), ont été exposées à différentes solutions : l'eau de Volvic, une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) et un milieu de croissance spécifique des cellules pulmonaires humaines (*B-Ali differentiation medium*²). Les milieux HBSS et B-Ali peuvent être utilisés pour la culture cellulaire afin d'étudier la pénétration cellulaire des Fe-NP et leur cytotoxicité induite. En effet, la chimie de surface des nanoparticules exposés à des solutions complexes peut être fortement modifiée par des procédés d'adsorption ou de corrosion avant d'atteindre le milieu intracellulaire. La taille des particules a été caractérisée par microscopie électronique à transmission (TEM), leur structure cristallographique par diffraction des rayons X (XRD) et leur chimie de surface par spectroscopie de photoélectrons à haute résolution (HR-XPS). Cette étude a mis en évidence qu'une exposition des Fe-NP dans le milieu biologique B-Ali conduit à la formation d'une couche d'oxy-hydroxyde contenant des espèces chlorées.

² Les milieux *B-Ali differentiation medium* (sans « inducer » dans notre cas) et BEGM sont ici de même composition (confirmation du fabricant)

Nous avons également constaté que la couche de passivation de Fe_2O_3 des nanoparticules de fer brutes (de l'ordre de 2 nm) est rapidement transformée en une couche plus épaisse d'oxy-hydroxyde qui a une plus grande capacité à absorber des ions moléculaires ou des biomolécules ioniques comme les protéines ou l'ADN. Ce film mince d'oxy-hydroxyde est plus soluble et pourraient être plus facilement dissous après une exposition en milieu intracellulaire. Nos résultats mettent bien en évidence un impact important des milieux environnant les nanoparticules et donc leur écotoxicité et leur toxicité (Dietz et Herth, 2011). Les résultats présentés ont fait l'objet d'un article accepté avec corrections mineures dans « *Applied Surface Science* ».

1. La caractérisation des nanoparticules de fer

1.1. La taille, le diamètre hydrodynamique et la forme

La forme et la taille des nanoparticules ont été déterminées grâce à la microscopie électronique à balayage. Les Fe-NP sont de forme sphérique et ont une taille unitaire comprise entre 20 et 80 nm. Le diamètre hydrodynamique ou la taille des agglomérats de nanoparticules, déterminé par diffusion de lumière laser avec l'analyseur de nanoparticules (Zetasizer II, Malvern Instruments) montre une forte agglomération des nanoparticules dans les différentes solutions, ce dernier pouvant atteindre plusieurs micromètres. Ce phénomène est accentué par le fait que les nanoparticules de fer sont magnétiques. Le diamètre hydrodynamique peut être diminué par une étape de sonication. En effet, une étude préliminaire a montré que la sonication permet d'homogénéiser les solutions de nanoparticules et de diminuer leur diamètre hydrodynamique mais nous avons aussi constaté une ré-agglomération rapide suivie d'une sédimentation des nanoparticules. C'est pour cela, que cette étape de sonication doit être faite juste avant l'exposition. Nous avons aussi noté que la concentration en nanoparticules avait une influence sur cette étape de sonication. Nous avons ainsi défini un temps de sonication de 15 min pour homogénéiser les solutions « mères » préalables à la préparation des solutions d'exposition. Ces dernières seront passées aux ultra-sons 5 min avant l'exposition.

1.2. La composition chimique, la composition de surface et la pureté

Une analyse détaillée de la composition globale et de la composition de surface des nanoparticules est décrite dans l'article ci-dessous. Nous reprendrons ici les principaux résultats. Premièrement, notre étude a mis en évidence l'absence d'impureté à la surface des nanoparticules de fer. En effet, aucun élément autres que le fer et de l'oxygène n'ont été mis en évidence lors des analyses. De même, nous avons démontré que les Fe-NP se composaient d'un cœur de fer métallique recouvert d'une couche d'oxyde et/ou d'hydroxyde dont l'épaisseur et la composition changent en fonction du milieu dans lesquels les nanoparticules sont immergées. Les nanoparticules brutes sont recouvertes d'une couche de 2,1 nm d'oxyde composée de FeOOH ou Fe_2O_3 avec des

hydroxydes ultime de surface (premier plan atomique). L'immersion 24h dans la Volvic et l'HBSS augmente légèrement la couche d'oxyde de 0,16 nm. Dans le cas, d'une immersion dans le milieu HBSS, l'épaisseur de la surface hydroxylée est augmentée, comparée aux nanoparticules de fer brutes et à celles immergées dans la Volvic. Nous pouvons conclure que ces milieux sont relativement inertes à l'échelle de la journée. La couche d'oxyde des nanoparticules de fer immergées dans la Volvic et dans l'HBSS se compose respectivement de 71% de Fe_2O_3 et 29% de FeOH_3 ; et de 55% de Fe_2O_3 et 45% de FeOH_3 . A l'inverse, le milieu B-Ali augmente l'épaisseur de la couche d'oxyde qui mesure 2,8 nm après une immersion de 24h et 3,1 nm après une immersion de 48h. La composition de cette couche d'oxyde varie également et se compose de 28% de Fe_2O_3 , 55% de FeOOH/FeOCl et 17% de FeOH_3 .

1.3. Le potentiel zêta

Le potentiel zêta a été déterminé dans une solution de NaCl à 15mM pour les nanoparticules brutes et dans l'eau de Volvic. Globalement, le potentiel zêta reste négatif dans les différents milieux.

1.4. La surface spécifique et le *volume specific surface area* (VSSA)

Afin de parfaire la caractérisation de nos nanoparticules de fer, nous avons déterminé leur surface spécifique. Ce paramètre a été évalué par le Département Génie Civil et Environnemental de l'Ecole des Mines de Douai selon la méthode BET (Brunauer, Emmett and Teller) d'après Brunauer *et al.* (1938) par absorption d'azote. La surface spécifique a été évaluée à $27,72 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$.

Un dernier paramètre a été déterminé : le *Volume Specific Surface Area* ou VSSA (Kreyling *et al.*, 2010). Le VSSA est un paramètre obtenu à partir du matériau en poudre, y compris pour les particules dont la distribution de taille peut être importante. Il permet de déterminer si un matériau entre dans la catégorie des matériaux nanostructurés. En effet, si un matériau se présente sous la forme de nanoparticules agglomérées et que le VSSA est supérieur à $60 \text{ m}^2.\text{cm}^{-3}$, il est alors considéré comme entrant dans la catégorie des nanoparticules. Le VSSA correspond au produit de la surface spécifique et de la densité du matériau. Dans nos cas, avec une densité de $7,87 \text{ g.cm}^{-3}$, le VSSA de nos nanoparticules est de $218,27 \text{ m}^2.\text{cm}^{-3}$.

Tab. 14 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des nanoparticules de fer produites par le MCMC de Thiais (na : non adapté – nd : non déterminé – SS : sans sonication – AS : avec sonication – a. immersion de 24h – b. immersion de 48h) – Pour le potentiel zêta, les mesures ont été faites plusieurs fois mais les résultats restent similaires.

	Distribution de taille (nm)	Agrégats – agglomérats (nm) après 5 min de sonication	Indice de polydispersion	Composition chimique et composition de surface	Epaisseur de la couche d'oxyde	Forme	Pureté	Potentiel Zeta	Surface spécifique	Volume Specific Surface area
Nanoparticules de fer MCMC brutes	20-80 nm	na	na	Cœur de fer avec une couche d'oxyde de 2 nm (Fe ²⁺ et Fe ³⁺) et d'hydroxyde (OH)	2,1 nm	Sphérique	Fer et oxyde de fer exempt de toute impureté	SS : -13,1 mV ± 7,47 AS : -22,4 mV ± 7,28	27,72 m ² .g ⁻¹	218,27 m ² .cm ⁻³
Nanoparticules de fer MCMC Volvic	na	De 214 nm ± 53,65 (10ng.ml ⁻¹) 1527 nm ± 83,14 (100µg.ml ⁻¹)	0,682 nm ± 0,335 (10ng.ml ⁻¹) 0,332 ± 0,042 (100µg.ml ⁻¹)	Cœur de fer avec une couche d'oxyde composée de 71% de Fe ₂ O ₃ et 29% de FeOH ₃	2,26 nm ^a	Sphérique	Fer et oxyde de fer exempt de toute impureté	SS : -17,9 mV ± 0,208 AS : -09,7 mV ± 1,56	na	na
Nanoparticules de fer MCMC dans l'HBSS	na	649 nm (10µg.ml ⁻¹)	0,392 ± 0,027 (10µg.ml ⁻¹)	Cœur de fer avec une couche d'oxyde composée de 55% de Fe ₂ O ₃ et 45% de FeOH ₃	2,26 nm ^a	nd	Adsorption en surface de divers éléments : carbone, phosphore, chlore, calcium	nd	na	na
Nanoparticules de fer MCMC dans le B-ALI	na	nd	nd	Cœur de fer avec une couche d'oxyde composée de 28% de Fe ₂ O ₃ , 55% de FeOOH/FeOCl et 17% de FeOH ₃	2,80 nm ^a 3,10 nm ^b	nd	Adsorption en surface de divers éléments : molécules biologiques (rapport N/C), sulfate, chlore	nd	na	na

2. Article 1. Photoemission study of metallic iron nanoparticles surface aging in biological fluids. Influence on biomolecules adsorption.

Ludivine Canivet, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Franck-Olivier Denayer, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Yannick Champion, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Pierre Cenedese, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Pierre Dubot, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Abstract. Iron nanoparticles (nFe) prepared by vaporization and cryogenic condensation process (10 nm-100 nm) has been exposed to Hank's balanced salt solution (HBSS) and the B-Ali cell growth fluids. These media can be used for cellular growth to study nFe penetration through cell membrane and its induced cytotoxicity. Surface chemistry of nFe exposed to such complex fluids has been characterized as the nanoparticles surface can be strongly changed by adsorption or corrosion processes before reaching intracellular medium. Particle size and surface chemistry have been characterized by transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution X-ray photoelectron spectroscopy (HR-XPS). Exposition of nFe particles to growth and differentiation media leads to the formation of an oxy-hydroxide layer containing chlorinated species. We found that the passivated Fe₂O₃ layer of the bare nFe particles is rapidly transformed into a thicker oxy-hydroxide layer that has a greater ability to adsorb molecular ions or ionic biomolecules like proteins or DNA.

Keywords: iron nanoparticle, reactivity, photoemission, adsorption.

2.1. Introduction

Nowadays particulate matter is strongly present in the ambient air and it has been associated with health effects such as respiratory diseases, even suspected to induced cancer and cardiovascular diseases. Some studies have shown that mortality can be correlated with the fine particles concentration in ambient air (diameter < 2.5 μm) (Dockery *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 2002). Particles present in the air can be different by their size or their chemical composition (metal/oxide/organic). Ultrafine particles are potentially more toxic as they can diffuse more easily in biological systems as suggested by some studies (Donaldson et Tran, 2002).

Concerning iron nanoparticles, they have received considerable attention for their potential applications in both environment and biomedical fields. For example, zero-valent iron nanoparticles have shown potentiality for the transformation of organic contaminants and heavy metals. Extensive studies have demonstrated that nanoscale iron particles are effective for the transformation of a wide array of environmental contaminants such as chlorinated organic solvents, organo-chlorine pesticides, PCBs (Elliott et Zhang, 2001; Alowitz et Scherer, 2002; Zhang, 2003; He et Zhao, 2005; Kanel *et al.*, 2005; Nutt et al., 2005). On the biomedical side, fully oxidized iron nanoparticles (called SPION) are being used for biomedical applications as for example in magnetic resonance imaging or for local drugs delivery.

These nano-sized or micro-sized particles can also appear in the environment in an unwanted way as they can be product in industrial processes (smokes in iron and steel industry) or can occur naturally in the environment. For example, small sized iron oxides as magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) can be produced in volcanoes smokes.

As these particles can be found in the environment, one has to wonder about their interaction with a biological system. More precisely, we have to wonder if any physiological or cellular damage could not be associated with the presence of these molecular sized particles in a living body.

In a cell, nanosized particles-cells interaction can induced biological damages resulting from DNA alterations or some protein denaturation or some oxidative stress in some cellular organites. In such mechanisms, interactions between the nanoparticle surface and the biological system are of prime importance. Different particle surface chemistry may cause alteration in gene expression and alteration in cellular responses such as activation of signaling pathways cell mechanism regulation. This peculiar cytotoxicity can be evidenced by strong perturbations of the major components of the cell as for example mitochondria, nucleus and DNA. Some studies demonstrated that exposure to SPION has been associated with inflammation, formation of apoptotic bodies, membrane leakage and generation of reactive oxygen species (ROS). In some studies, iron has been associated with carcinogenesis following the generation of ROS that can induce damage to DNA or proteins (Valko *et al.*, 2004).

During SPION interaction with a biological system, particles are supposed to be corroded and release iron ions within cellular organites. This iron ions can cross the mitochondrial membrane can react with hydrogen peroxide and oxygen produced by the mitochondria leading to reactive hydroxyl radicals and Fe^{3+} ions.

Moreover, SPION can accumulate in organs such as liver or lungs subsequently to inhalation and Karlsson *et al.* (2008a) have shown that magnetite particles can cause

genotoxicity via the induction of oxidative stress.

A central problem is thus the information on the nanoparticles surface chemistry evolution under given medium constraints (vapor or liquid phase) as some modifications can yield to drastic changes in their reactive properties. While macroscopic iron sample strongly reacts with oxygen or water (corrosion), leading to bulk oxidation and sample properties degradation, nano-sized iron particles look like passivated solids, that's to say it exists a thin oxide layer (some nanometers) protective toward an full oxidation of the metal. Surface oxides can be of different type (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeOOH) depending on material oxidation or ageing that are correlated to environment conditions and leading to different surface reactivity. The surface oxide type of the nano-sized particles should be driving the reactivity in the living medium. Magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (Fe_2O_3) can effectively show different cellular responses. The different crystallographic structures must induce different surface sites that have different ability to undergo oxidation/reduction reactions. Magnetite has been shown to cause higher levels of oxidative DNA lesions as compared to maghemite (Petersen et Nelson, 2010). In the living medium, nano-sized particles are in strongly ionic aqueous liquid and SPION exist as magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Dias *et al.*, 2011) and corrosion processes can lead to the formation of products with surfaces that are in the range between magnetite and maghemite and maghemite or a non-stoichiometric intermediate (Laurent *et al.*, 2008) can be found in fluids as a common by-product of magnetite oxidation.

For other oxidized nano-scaled metallic particles, it has been shown that nanoparticles of CuO were more cytotoxic than micrometer particles. In contrast, the micrometer particles of TiO_2 caused more DNA damage compared to the nanoparticles (Neenu et al., 2012). So no general trends can be deduced from the particle sizes and a careful attention must be paid to particle chemistry and surface reactive sites, especially after chemical modifications when exposed to biological fluids.

In this work, we present a characterization of iron nanoparticles (nFe) prepared by vaporization and cryogenic condensation process with diameter in the range 10 nm-100 nm. These particles can be representative of industrial smokes emitted by the metallurgical industry. Particle size and surface composition have been characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), high-resolution X-ray photoelectron spectroscopy (HR-XPS). Iron nano-particles have been exposed to different biological fluids that can be used for cellular growth to study nFe penetration through cell membrane and its induced cytotoxicity. Surfaces exposed to such complex fluids must be carefully characterized as the nanoparticles surface chemistry can be strongly changed by adsorption or corrosion processes before reaching intracellular organites or systems.

Immersion in two growth and differentiation fluids have been studied: Hank's

balanced salt solution (HBSS) that is a highly ionic solution the essential function of which is to maintain pH and osmotic balance as well as provide your cells with water and essential inorganic ions. The other media is the B-Ali medium that is also highly ionic nutritive medium solution but that also contains complex biological molecules for the cell culture.

We compare the influence of these two media on nFe surface chemistry by also exposing nanoparticles to a more neutral aqueous medium (Volvic mineral water). Modifications of surface oxide thin film chemistry and thickness have been investigated by photoemission to characterize the influence of growth media on the nanoparticles surface chemistry. In a final step, we investigate the influence of the surface ageing in these fluids on DNA adsorption.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Chemicals

Metallic iron nanocrystals (nFe) have been produced using a gas condensation technique (cryogenic melting) that is described in ref (Champion et Bigot, 1996). Biologically active ionic solutions used in this work are HBSS and B-Ali. The HBSS medium is a buffered solution that mainly contains carbonate, sulfate, phosphate, calcium, sodium and chloride ions. HBSS was purchased from LifeTechnology. The B-Ali medium (Clonetics) that is also highly ionic solution but that also contains complex biological molecules such as insulin, hydrocortisone, transferrin or epinephrine, essential molecules in this nutritive medium for the cell multiplication. B-Ali medium was purchased from Lonza. In this study, we used a reference ageing aqueous media (mineral Volvic water) to compare the oxidation power of HBSS and B-Ali solutions. DNA solution was prepared from human lung cells. DNA extractions from lung cells were performed with QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The DNA was eluted in high purity water. The yield of the extracted DNA was determined by measuring the optical density at 260 nm and 280 nm with the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu). The assays were performed with genomic DNA concentrated to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.2.2. Apparatus

XPS measurements for surface analysis of the samples were performed using a ThermoElectron K-alpha photoelectron spectrometer with monochromatized Al K α excitation ($h\nu = 1486.6$ eV). The compositions of the surface oxide film surface and the underlying metal were determined by measuring integrated photopeak intensities after a Shirley background subtraction. The peaks area was corrected from sensitivity factors (Briggs et Seah, 1990). The X-ray spot diameter was set to 0.1 mm. For depth profiling, the Ar ion gun primary energy was set to 3.0 KeV, with a sputtering speed circa 0.1 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Survey spectra (overall XPS spectra) were acquired with an energy step ΔE of

1.0 eV, while ΔE was 0.1 eV for core level regions. Acquisition time was 100 ms per step in all the case. The analysis chamber base pressure was by $6.0 \cdot 10^{-10}$ torr and increased by a decade during Ar^+ sputtering. Initial nFe particles that were conserved in hexane were ultrasonically cleaned 300 s in a 50% mixture acetone-alcohol then rinsed with deionized water before immersion in the aging solutions. After interaction of 3, 24 and 48 hours, each nFe solution was exposed to a magnet to concentrate the iron nanoparticles then 0.1 ml was dropped on a cleaned silicon wafer and dried before introduction in the UHV transfer chamber. In each case the nFe particles agglomerate into a millimeter square compact deposit and no silicon XPS signal could be detected (dense coverage).

The shape and the size of iron nanoparticles were determined by scanning electron microscope. Scanning electron micrographs were recorded with a LEO 1530 (Zeiss, Germany). Samples of nanoparticles were prepared by spraying an iron nanoparticle solution homogenized on a thin plate of glass coated with gold.

2.3. Results and discussions

Figure 40 shows the survey XPS spectrum of the cleaned nFe sample. It reveals mainly the oxidized state of the iron nanoparticles surface with dominant $\text{O}1s$ (531.4 eV) and $\text{Fe}2p$ (711.0 eV) appearing at lower binding energy than the Fe Auger LMM Spectrum (780.0 - 950.0 eV). The low carbon contamination is attested by the low $[\text{C}1s]/[\text{O}1s]$ intensity ratio.

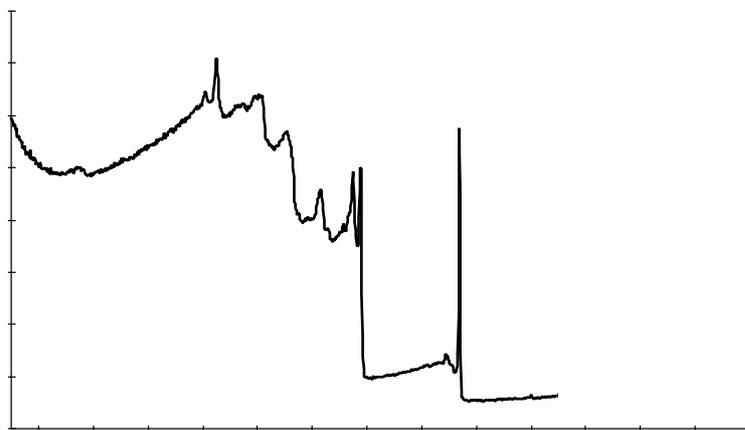


Fig. 40: Survey XPS Spectrum of cleaned nFe sample. Main photoelectron peaks are located near 531 eV for the $\text{O}1s$ core level and between 700 eV and 1000 eV for the $\text{Fe}2p$ core level and Auger Fe LMM transitions. We can observe a relative low carbon contamination, as the $\text{C}1s$ peak near 285 eV is about ten times lower in intensity than the $\text{O}1s$

O_{1s} high-resolution spectrum clearly reveals two components corresponding to O^{2-} and OH^- in the oxide layer (figure 41) meaning that the oxide thin film is hydroxylated. The absence of a higher binding energy component located near 533.5 eV precludes molecularly adsorbed H_2O molecules on this surface. Before Ar^+ sputtering, Fe is mostly in a trivalent oxidation state (711.0 eV). As on the outermost surface plane, the O_{1s} signal shows an OH component that disappears during first sputtering step, we conclude that the oxide layer is of $FeOOH$ type or Fe_2O_3 covered with surface hydroxyls.

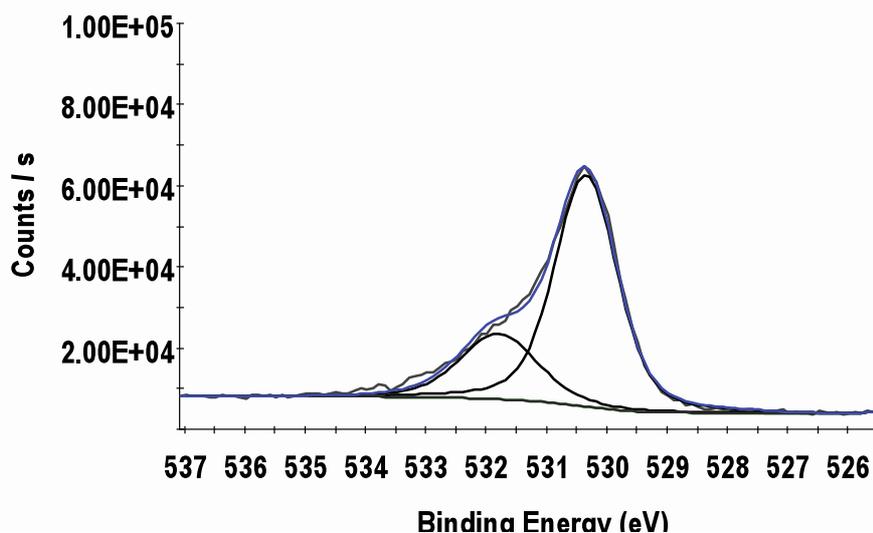


Fig. 41: O_{1s} XPS Spectrum of cleaned nFe sample. Two components can be fitted: one located at 530.4 eV for the O^{2-} species and the other near 531.9 eV for the hydroxyl OH^- .

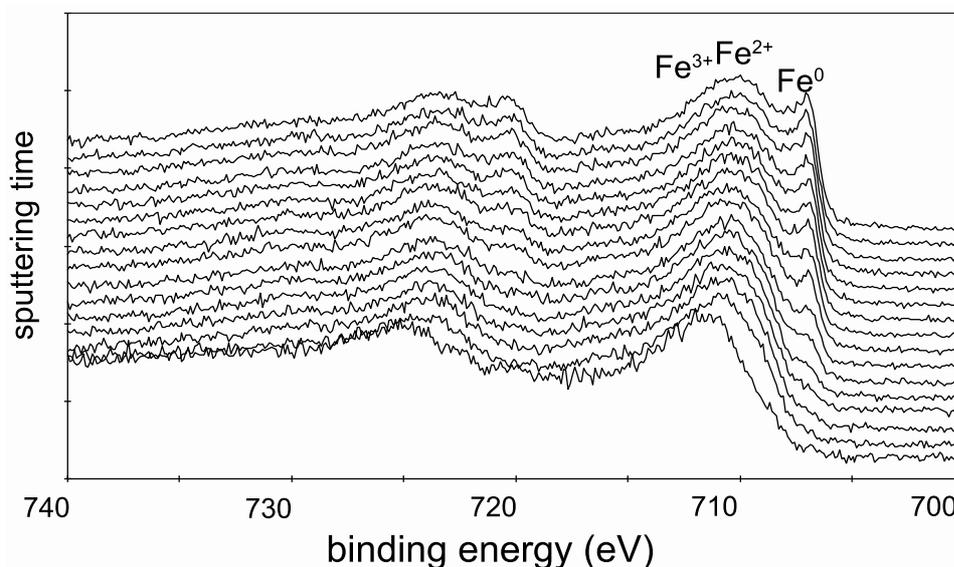


Fig. 42: Fe2p spectral region evolution during Ar^+ sputtering experiment. Sputtering step has been set to 2s between each spectrum. This region reveals two broad bands attributed to $Fe_{2p_{3/2}}$ and $Fe_{2p_{1/2}}$ multiplet splitting. Each band can be decomposed in components characteristic of the iron oxidation state.

In the first sputtering steps, divalent state component immediately appears at lower binding energy (around 709.0 eV), indicating that this chemical state is due to Fe³⁺ reduction by the ion beam (figure 42). Even if this modification is due to an artifact, total iron oxide intensity can be estimated by adding Fe²⁺ and Fe³⁺ peak areas for quantitative element estimation. Intensities measurements can be done by peak fitting process following the observations of Grosvenor *et al.* (2004).

In this calculation, each oxidation state component is assumed to be a linear combination of gaussian lines. As shown in figure 43a, the 2p_{3/2} line can be fitted by 3 gaussian peaks for the trivalent state, while 2 gaussian peaks for the divalent state. In the case of cleaned nFe, the metallic Fe component appears at 707.0 eV after 6.0 s of Ar⁺ sputtering. The beginning of metal signal appearance gives an estimation of the oxide layer thickness. The sputtering conditions used in our experiment induce a sputtering speed (v) near 0.08 nm.s⁻¹ that can be verified on a passivated alumina oxide layer (4.2 nm thick) on aluminum. Assuming an exponential attenuation law for photoelectron scattering during their escape to the surface, the appearance of metallic Fe_{2p} peak means that the oxide layer is near $3l\cos(\theta)$, where l is the transport mean free path and θ is the mean escape detection angle.

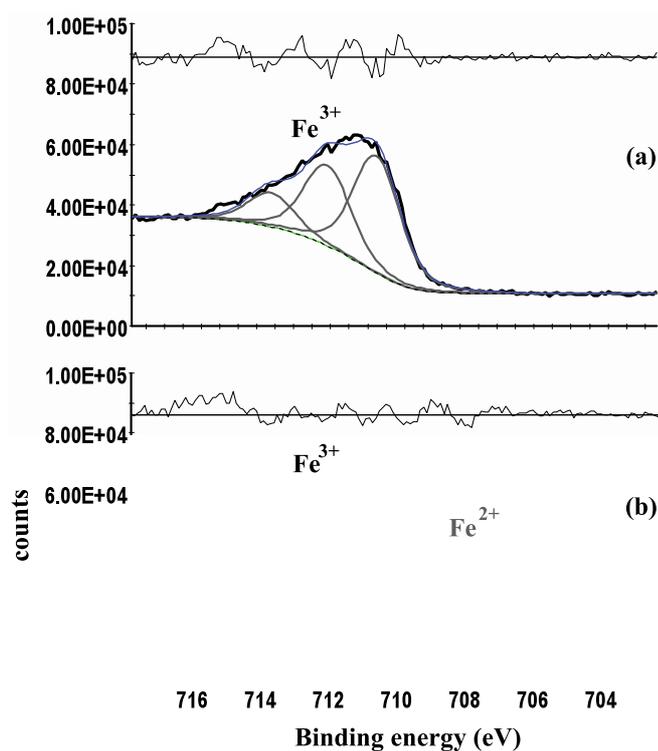


Fig. 43: Fe2p_{3/2} spectrum of cleaned nFe sample. The high spin component has been decomposed following Grosvenor and al procedure [ref]. Before sputtering, only the trivalent oxidation state can be observed (a). After some sputtering cycles (b), divalent state is apparent at lower binding energy.

If we suppose that the nFe is an assembly of spherical particles covered by a thin regular oxide shell, for a perpendicular geometry for the photoelectron collection (analyzer axis perpendicular to the macroscopic surface where the nFe is set down), Ω can be easily estimated by integration and gives a value by 57° . The transport mean free path λ is uniform for electrons having a kinetic energy of 800 eV (Briggs & Seah, 1990), therefore the mean oxide layer thickness (d_{ox}) on clean nFe can be estimated by adding $3 \lambda \cos(\theta)$ to the sputtered thickness when the metal signal begins to appear ($v \cdot t = 0.48$ nm). This result of $d_{ox} = 2.1$ nm is very close to the estimated value of 2.0 nm obtained by transmission electron microscopy (figure 44).

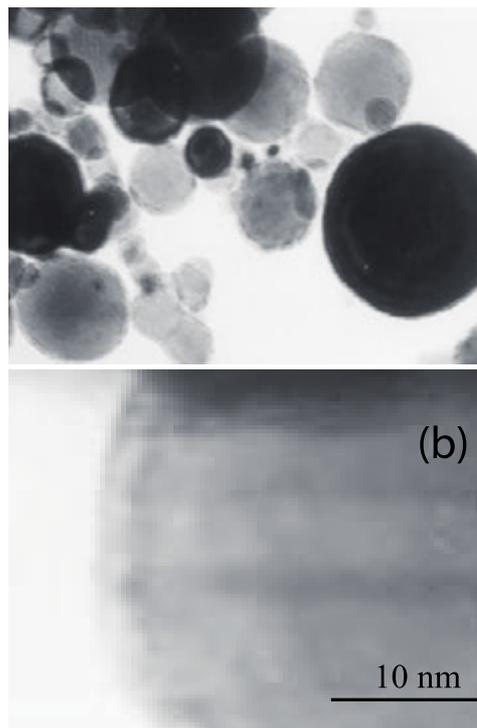


Fig. 44: TEM of clean nFe: (a) agglomeration of different size iron nanoparticles due to magnetism. (b) picture magnification on a single particle showing a less dense film on the sphere surface with a thickness of approximately 2.0 nm.

In figure 45, we compare the results of sputtering experiment for nFe that have remained 24 hours in different solutions, Volvic water, HBSS medium and B-Ali medium. The evolution of relative oxide and metal intensities are plotted versus sputtering time and presented on the left of figure 46. On the right, a 3D representation (binding energy, counts, sputtering time) of the O_{1s} signal is also shown for each case. By comparison with the clean nFe case (figure 46 a), we observe that the immersion during 24 hours in the liquid only slightly increases the oxide thickness of 0.16 nm when the nFe are exposed to Volvic water (figure 46 b) or HBSS (figure 6 4c). In the case of HBSS medium, the surface hydroxylation is increased compared to clean nFe or Volvic exposed nFe as it is shown on the O_{1s} signal evolution. We thus can conclude that these media are relatively inert toward nFe oxidation (corrosion) at days scale.

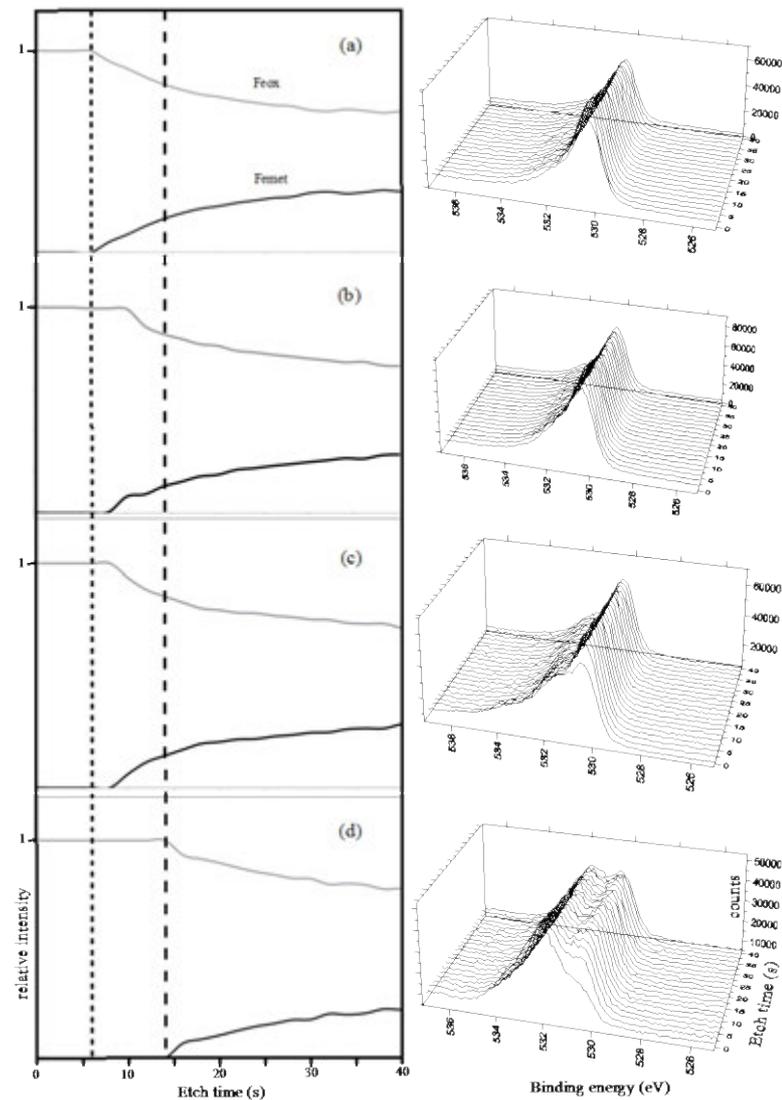


Fig. 45: On the left: evolution of I_{ox} and I_{met} relative intensities ($I_{met} = 1$ and $I_{ox} = 0$ before sputtering) as function of sputtering time for nFe exposed 24 hours in different aqueous solutions. Clean nFe reference (a), Volvic water (b), HBSS solution (c), B-Ali solution (d). On the right: corresponding O1s spectra evolution during sputtering. Note that non-zero intensity for the metallic state is detected at different etching time [6 s (a), 7 s (b), 8 s (c) and 14 s (d)].

On the contrary, the B-Ali solution strongly increases the iron oxide layer thickness. In figure 45(d), we observe that after 24 hours in B-Ali, the oxide layer thickness is near 2.8 nm and mainly hydroxylated (main O1s component at 532.0 eV). We notice that for 48 hours exposition time, the oxide layer thickness continues to increase for the B-Ali (figure 46) and reaches a value by 3.1 nm.

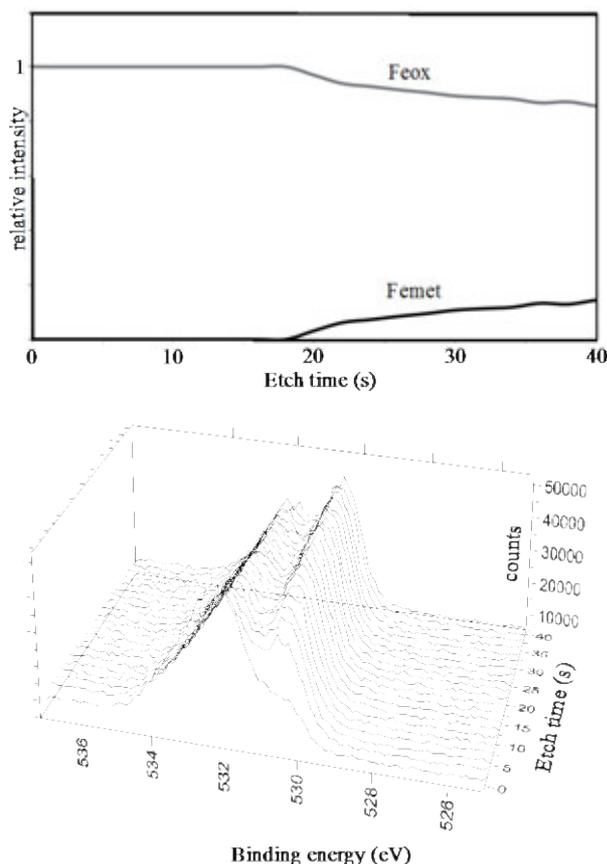


Fig. 46: The same as in figure 6 for the more oxidant B-Ali solution for a 48 hours exposure time. For the other media, results do not significantly differ from 24 hours exposition and are thus not presented.

To get some insights on the iron oxide chemistry, we calculate O and Fe surface concentrations by measuring the O_{1s} and Fe_{2p} peak areas corrected by the XPS sensitivity factors. From the [Fe]/[O] ratios calculated for the different oxygen species, we can evaluate the surface concentration of iron compounds present in the oxide layer. Values of [Fe]/[O]_i ratios are reported in table 15 for the different O_{1s} components ([O]_i) where R_i ratios concern the bare surface while r_i ratios are for cleaned surface (light ion sputtering 3.0 s) to eliminate surface contamination (adsorbed water or carbonaceous species containing oxygen). R₁ and r₁ are for the total O_{1s} area (O²⁻ + OH, H₂O not included), R₂ and r₂ are for the O²⁻ component (531.0 eV) and R₃ and r₃ are for the OH component (532.5 eV).

Tab. 15: [Fe]/[O] calculated from peak intensities corrected by XPS sensitivity factors (SF) for the total O1s area (R_1, r_1), the O2- component (R_2, r_2), the OH component (R_3, r_3). For iron, the Fe2p3/2 peak has been considered and the SF is 2.0. For oxygen the SF is 0.66. This evaluation is shown for clean nFe nanoparticles (nFeb), nFe immersed in Volvic water for 24 hours (VOL24H), nFe immersed in HBSS solution for 24 hours (HBSS24H), nFe immersed in B-Ali solution for 24 hours (B-Ali24H) and finally nFe immersed B-Ali solution for 48 hours (B-Ali48H). The 3 columns on the left are for the bare surface, the 3 columns on the right are for the surface after 5 s of sputtering (cleaned from surface contamination).

	R_1	R_2	R_3	r_1	r_2	r_3
nFeb	0.45	0.54	2.70	0.62	0.70	4.54
Vol24h	0.36	0.55	1.13	0.55	0.64	3.84
HBSS24H	0.32	0.46	1.20	0.48	0.60	1.80
B-Ali24H	0.18	0.57	0.67	0.32	0.75	0.60
B-Ali48H	0.20	0.34	0.11	0.33	0.73	0.61

We have previously seen that Fe₂O₃ or FeOOH species can be expected from the binding energy value of the high spin component of the Fe_{2p} peak. In each case, we can expect a [Fe]/[O] values of 0.67 and 0.50 respectively for R₁(r₁) and a R₂(r₂). In fact, due to surface contamination (oxygen containing carbonaceous molecules), R₁ values are always lower than 0.50 and R₁ value decreases in the sequence nFeb, Vol_{24H}, HBSS_{24H}, B-Ali_{24H}, B-Ali_{48H}. We can observe at the same time that R₃ value strongly decreases, meaning that the hydroxyl surface concentration strongly increases compared to iron ions in the surface layer. To have reliable information on the oxide layer chemistry, we remove the surface contamination layer by a light ion sputtering and draw the stoichiometry of the iron oxide layer from r₁ values. In the case of bare nFe particles (nFeb), we observe r₂ value by 0.70, near the r₂ value of 0.67 for Fe₂O₃. We can also remark that the r₁ value (with total oxygen content) is lower than 0.67, meaning that the oxygen concentration is greater than in Fe₂O₃. We can expect that this is due to the presence of hydroxylated species in FeO_xOH_y compounds (FeOOH or FeOH₃ for example). This will be more evident in the following for immersion in more oxidant aqueous media. Concerning the r₁ value, it continuously decreases in the experiment sequence nFeb, Vol_{24H}, HBSS_{24H}, B-Ali_{24H}, B-Ali_{48H}. We thus conclude that the global oxygen content increases along this series and this is again correlated with r₃ values evolution (increasing of OH component in O_{1s}). The different media studied in this work are thus increasingly oxidant and lead to a high hydroxylation level of the oxide thin film. Nevertheless, we can remark that r₂ value is lower than 0.67 (Fe₂O₃) for Vol_{24H} and

HBSS_{24H}, while it is significantly higher than 0.67 for B-Ali_{24H} and B-Ali_{48H}. This can be explained by the existence of a mixture of different oxi-hydroxi iron compounds with specific $[Fe^{3+}]/[O^{2-}]$ ratios. For the nanoparticles exposed to the different media, we can expect a mixed phase containing both Fe₂O₃ and FeOOH and FeOH₃ where the metallic cation is trivalent. By assuming a linear combination for these three species, $xFe_2O_3+yFeOOH+zFeOH_3$, the set of equations that takes into account the element surface concentrations leads to (Numerical Minimization routine with Mathematica 8.0): 71% of Fe₂O₃ and 29% of FeOH₃ in the surface layer for the Vol_{24H} case, and 55% of Fe₂O₃ and 45% of FeOH₃ for HBSS_{24H}. This difference of composition is also revealed by the r_3 ratio that strongly decreases between Vol_{24H} and HBSS_{24H}. The presence of FeOH₃ can also be expected by the loss structure appearing at higher binding energy from the from the main 2p_{3/2} component (figure 47). For Fe₂O₃, Fe₃O₄ or FeOOH, this loss is observed at 8.5 eV (Grosvenor *et al.*, 2004).

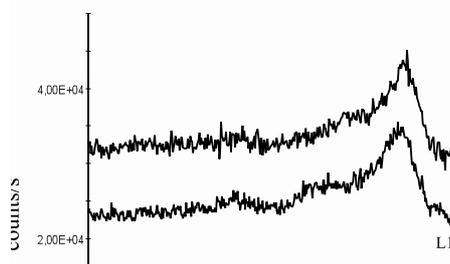


Fig. 47: Fe2p spectra for (a): clean nFe particle showing a characteristic loss (L1) located at 8.5 eV higher than the main 2p_{3/2} component. (b): nFe particle exposed 24 hours to B-Ali solution showing a characteristic loss (L2) located at a lower energy (5.4) eV from the main 2p_{3/2} component.

The lowering of the loss to about 5.5 eV is observed for iron chlorides, iron sulfates or ferric hydroxide FeOH₃. This is certainly correlated with a beginning of surface corrosion by the B-Ali medium. The shape of the O_{1s} peak, with a strong increase of the OH component confirms that this corrosion state is also accompanied by the appearance of an hydroxylation of the corroded surface layer.

In the case of the B-Ali medium (24H and 48H exposure), the effect of surface oxygen enrichment and surface hydroxylation is even more important and r_1 value by 0.33 is reached. Higher hydroxylation level is also revealed by r_3 value near 0.60. Nevertheless, we observe a r_2 value greater than 0.67 (0.75 and 0.73). To explain this fact, we have to suppose that oxide iron species with greater $[Fe]/[O]$ ratio are present. As B-Ali medium is highly saline containing chlorine ions, oxidation mechanisms can lead to FeOCl or FeOOH soluble species ($r_2= 1.0$) (Alizadeh et Bordbar, 2013; Xu et al., 2013).

Following the same process as described previously, for a mixed phase containing $x\text{Fe}_2\text{O}_3+y\text{FeOOH}+z\text{FeOH}_3$, we calculate from the element surface concentrations a relative percentage of 28% for Fe_2O_3 and 55% for FeOOH or FeOCl concerning O^{2-} containing species and 17% of FeOH_3 . This leads to a thicker, but corroded layer with soluble species, a similar behavior as in marine corrosion on iron alloys (Ma *et al.*, 2009). We show in figure 48 the survey spectra for bare nFe (I-a and I-d) compared with those of nFe exposed to B-Ali (I) and HBSS (II) media for 24 hours (b, e) and 48 hours (c, f). In the case of HBSS media, peaks located at 289.8 eV, 133.1, 200.4 and 346.7 indicate the presence of adsorbed carbonate (C_{1s}), phosphate (P_{2p}), chlorine (Cl_{2p}) and calcium (Ca_{2p}) ions respectively. We do not observe a peak located by 169.0 eV corresponding to sulfate (S_{2p}), meaning a lower surface affinity for sulfate ion adsorption.

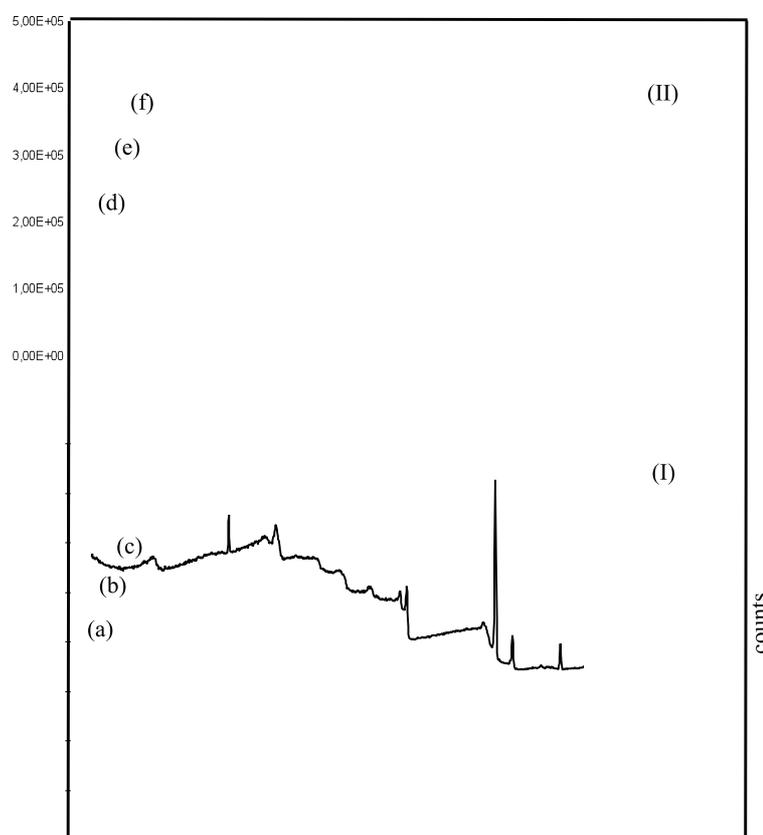


Fig. 48: Survey spectra for nFe exposed 24 hours [(b), (e)] and 48 hours [(c) and (f)] in the most oxidant HBSS (II) and B-Ali (I) media. (a), (d) spectra are for the clean nFe reference. Spectra (b, c, e, f) have been shifted in energy to avoid peak superposition

We remark that the Cl_{2p} peak strongly increases (x5) between 24 hours and 48 hours exposures (II-e and II-f), confirming both the hydroxylation and the formation of chlorinated species on the nFe surface exposed to HBSS media. In the case of B-Ali (figure 49 I), the peak located at 400.0 eV (N_{1s}) and the high intensity of the C_{1s} peak at 285.2 eV, indicate the adsorption of biological molecules present in this fluid ($[\text{N}]/[\text{C}] = 0.26$ for of a protein like BSA (Frateur *et al.*, 2006)). A peak located

by 169.2 eV can also be observed meaning that sulfate co-adsorbs with biological molecules in the case of B-Ali medium. We also observe that biological molecules surface concentration does not strongly increase between 24 hours and 48 hours exposures (C_{1s} and N_{1s} intensities do not vary), indicating a fast adsorption process and a high surface affinity for protein toward the oxidized nFe surface. As in the presence of chloride ions proteins are suspected to increase local corrosion of iron alloys (Lartundo-Rojas, 2007), we conclude that in the case of B-Ali medium, the fast biological molecules adsorption is related to the nFe corrosion and surface hydroxylation and chlorination previously observed from the O_{1s} and Fe_{2p} peaks shape.

The enhanced adsorption ability of oxidized nFe particles is also revealed by exposing the bare and the aged nFe nanoparticles to DNA extracted from human cells. For each aging experiment (Volvic, HBSS and B-Ali), the aged nanoparticles were rinsed in deionized water and then immersed in the DNA solution. Taking away were carried out at 1, 3, 5, 10 and 20 minutes and dropped onto a silicon wafer surface as previously described.

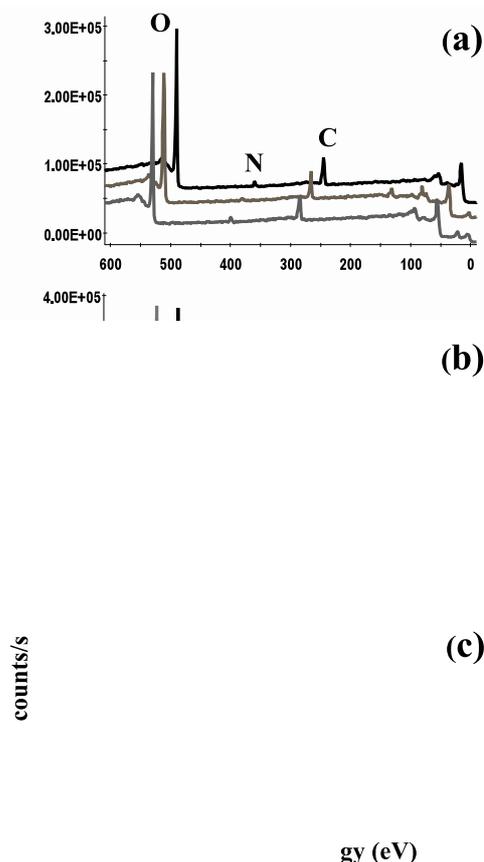


Fig. 49: XPS spectra of nFe aged particles (24 hours) immersed in DNA solution. (a) aging in Volvic water. (b) aging in HBSS solution. (c) aging in B-Ali solution. In each case (a, b, c), 3 immersion times are presented (bottom to top: 1min, 3 min, 20 min). C_{1s} and N_{1s} are much more important when aging is realized in B-Ali (c);

In figure 49, we observe that the C_{1s} and N_{1s} photoelectron peak intensities are low compared to the O_{1s} signal coming from the nFe oxidized surface when aging was realized in Volvic water or HBSS solution. These signals are much more important when the nFe particles were aged in B-Ali solution. In this last case, the value of the C_{1s}/N_{1s} intensity ratio agrees with the one observed by Petrovykh *et al.* (2003). We thus conclude that the more hydroxylated nFe surfaces have a stronger bonding affinity to DNA as these highly OH rich surfaces are propitious to the generation surface-molecules hydrogen bonds or strong electrostatic forces (Li *et al.*, 2011). This agrees with the high biomolecule surface concentration observed in the case of ageing in B-Ali medium. As ionic molecules adsorption can lead to surface reactions that can destabilize the Fe-O bond thereby leading to oxide dissolution as shown by Cwiertny *et al.* (2009) and Rubasinghege *et al.* (2012) for micro rods of FeOOH, we can thus expect a stronger dissolution ability of nFe particles when exposed to the more oxidant B-Ali or to the intracellular media.

2.4. Conclusion

Exposition of nFe particles to growth media (HBSS and B-Ali) leads to the formation of an oxy-hydroxide layer containing chlorinated species. The initial passivated surface oxide layer, mainly Fe_2O_3 is thus transformed into a thicker oxy-hydroxide layer that has a greater ability to adsorb molecular ions or ionic biomolecules like proteins or DNA. More soluble iron compounds are formed on the nanoparticles surface that could be more easily dissolved after exposition to the intracellular medium. Modifications of nFe surface chemistry due to growth and differentiation media can act on cell cytotoxicity both by direct molecular adsorption due to a higher surface affinity to biomolecules or by the induced oxy-hydroxide dissolution that releases toxic iron ions.

3. Bilan du chapitre 3

Ce troisième chapitre s'est focalisé sur la caractérisation des nanoparticules manufacturées de fer utilisées dans nos études. Il met en avant plusieurs points essentiels pouvant être utiles dans l'interprétation des résultats de nos études de toxicité et d'écotoxicité.

- ❖ Les principales caractéristiques des nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC de Thiais sont récapitulées dans le tableau 14.
- ❖ La détermination du VSSA nous a permis de valider que même agglomérées, nos Fe-NP avaient une réactivité nanoparticulaire.
- ❖ Notre étude sur la chimie de surface des nanoparticules a montré des modifications des propriétés de surface en fonction du milieu de suspension des nanoparticules. Nous avons ainsi mis en évidence que l'eau de Volvic et le milieu HBSS étaient relativement inertes à l'échelle temporelle de la journée. En revanche, le milieu B-Ali (ou BEGM) est corrosif entraînant un épaissement important de la couche d'oxyde. Ces milieux ont également entraîné des modifications dans la composition de cette couche d'oxyde.
- ❖ Nous avons mis en évidence que les modifications de surface des nanoparticules ont entraîné des modifications sur leur réactivité de surface. Nous avons ainsi observé un lien entre modification de la surface des nanoparticules et adsorption de molécules sur cette même surface. En effet, nos travaux ont permis de mettre en évidence une adsorption plus importante de la molécule d'ADN au niveau de la surface des nanoparticules de fer immergées dans le milieu B-Ali, c'est-à-dire à la surface des nanoparticules de fer les plus oxydées.

Ces résultats montrent l'importance de la caractérisation des nanoparticules (Oberdorster *et al.*, 2005 ; Card et Magnuson, 2010) ainsi que l'étude des effets des milieux de dispersion des nanoparticules sur leur réactivité de surface. Il est donc probable que l'environnement des nanoparticules modifie leurs caractéristiques et donc l'interface nanoparticules/vivant.

4. Références bibliographiques

- Alizadeh, M. & Bordbar, S.** 2013. The influence of microstructure on the protective properties of the corrosion product layer generated on the welded API X70 steel in chloride solution. *Corrosion Science*, 70: 170–179.
- Alowitz, M. & Scherer, M.** 2002. Kinetics of Nitrate, Nitrite, and Cr(VI) Reduction by Iron Metal. *Environ Sci Technol.*, 36(3): 299-306.
- Briggs, D. & Seah, M.P.** 1990. Practical Surface Analysis. Volume 1. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy" D, Briggs and M.P. Seah (Ed.). John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E.** 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 309-319.
- Card, J.W. & Magnuson, B.A.** 2010. A Method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology*, 29(4): 402-410.
- Champion, Y. & Bigot, J.** 1996. Preparation and characterization of nanocrystalline copper powders. *Scripta Materialia*, 35(4): 517-522.
- Cwiertny, D. M., Hunter, G. J., Pettibone, J. M., Scherer, M. M. & Grassian V. H.** 2009. Surface chemistry and dissolution of alpha-FeOOH nanorods and microrods: Environmental implications of size-dependent interactions with oxalate. *J Phys Chem C*, 113(6): 2175–2186, DOI: 10.1021/jp807336t.
- Dias, A. M., Hussain, A., Marcos, A. S. & Roque, A. C.** 2011. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnol Adv.*, 29(1): 142-155.
- Dietz, K.J. & Herth, S.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11): 582-589.
- Dockery, D.W., Pope, C.A. III, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G. Jr & Speizer, F.E.** 1993. An association between air pollution and mortality in six US cities. *New Engl J Med*, 329: 1753-1759.
- Donaldson, K. & Tran, C.L.** 2002. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol.*, 14: 5–27.

- Elliott, D. & Zhang, W.** 2001. Field Assessment of Nanoscale Bimetallic Particles for Groundwater Treatment. *Environ Sci Technol.*, 35(24): 4922–4926.
- Frateur, I., Lartundo-Rojas, L., Méthivier, C., Galtayries, A. & Marcus, P.** 2006. Influence of bovine serum albumin in sulphuric acid aqueous solution on the corrosion and the passivation of an iron-chromium alloy. *Electrochem Acta*, 51: 1550-1557.
- Grosvenor, .P., Kobe, B. A., Biesinger, M. C. & McIntyre, N.S.** 2004. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. *Surf Interf Anal.*, 36(12): 1564-1574.
- He, F. & Zhao, D.** 2005. Preparation and characterization of a new class of starch-stabilized bimetallic nanoparticles for degradation of chlorinated hydrocarbons in water. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 3314–3320.
- Kanel, S., Manning, B., Charlet, L. & Choi, H.** 2005. Removal of Arsenic(III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environ. Sci. Technol.*, 39(5): 1291–1298.
- Karlsson, H. L., Holgersson, A. & Moller, L.** 2008a. Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources. *Chem Res Toxicol.*, 21 (3): 726–31.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q.A.** 2010. Complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3): 165-168.
- Lartundo-Rojas, L.** 2007. Influence de l'adsorption de protéine (BSA) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17Cr en solution aqueuse. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Paris VI, Paris, 180p.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, RN.** 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.*, 108(6) 2064-2110.
- Li, X., Zhang, J. & Gu, H.** 2011. Adsorption and Desorption Behaviors of DNA with Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles. *Langmuir*, 27: 6099-6106.
- Ma, Y., Li, Y. & Wang, F.** 2009. Corrosion of low carbon steel in atmospheric environments of different chloride content. *Corrosion Science*, 51(55): 997–1006.

- Neenu, S., Gareth, J.S., Nelson, B.C., Marquis, B.J., Maffei, T.G.G., Brown, A.P., Williams, P.M., Wright, C.J. & Doak, S.H.** 2012. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33(1): 163-170.
- Nutt, M., Hughes, J. & Wong, M.** 2005. Designing Pd-on-Au Bimetallic Nanoparticle Catalysts for Trichloroethene Hydrodechlorination. *Environ Sci Technol.*, 39(5):1346-1353.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7): 823-839.
- Petersen, E. & Nelson, B.** 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem*, 398(2): 613-650.
- Petrovykh, D. Y., Kimura-Suda, H. Whitman, L. J. & Tarlov, M. J.** 2003. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *JACS*, 125: 5219-5226
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K. & Thurston, G.D.** 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9): 1132-1141.
- Rubasinghe, G., Kyei, P.K., Scherer, M.M. & Grassian, V.H.** 2012. Proton-promoted dissolution of α -FeOOH nanorods and microrods: Size dependence, anion effects (carbonate and phosphate), aggregation and surface adsorption. *J Colloid and Int Sci*, 385: 15-23.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. & Telser, J.** 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266(1-2): 37-56.
- Xu, J.H., Gao, N.Y., Deng, Y. & Xia, S.Q.** 2013. Nanoscale iron hydroxide-doped granular activated carbon (Fe-GAC) as a sorbent for perchlorate in water. *Chemical Engineering Journal*, 222: 520-526.
- Zhang, W.** 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J Nanopart Res*, 5:323-323.

**CHAPITRE 4 - LES EFFETS
ECOTOXIQUES DES
NANOPARTICULES DE FER CHEZ
PHYSCOMITRELLA PATENS (HEDW.)
BRUCH & SCHIMP.**

Chapitre 4. Les effets écotoxiques des nanoparticules de fer chez *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp

Ce chapitre est consacré à l'étude des effets écotoxiques des nanoparticules manufacturées de fer (Fe-NP) sur notre modèle bryophytique : *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. Ce travail s'inscrit dans une démarche d'évaluation des dangers pour l'environnement que représentent les nanoparticules de fer dispersées par voie atmosphérique. Comme nous l'avons vu précédemment, les végétaux sont les premiers organismes à être exposés à des retombées atmosphériques nanoparticulaires. Or, des études ont montré des effets non négligeables, voire délétères, de nanoparticules sur différentes espèces végétales. Quant aux bryophytes, organismes pionniers, elles permettent la colonisation des terres et le maintien d'une végétation pérenne. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi une mousse comme modèle végétal.

Dans une recherche d'effet toxique sur le vivant, il faut tout d'abord s'assurer de la biodisponibilité du contaminant sur l'organisme modèle et déterminer sa capacité à pénétrer et à se distribuer au sein des cellules des différents organes qui le composent. Ainsi, l'objectif premier de nos travaux est de vérifier la pénétration de nos nanoparticules de fer au sein des cellules bryophytiques afin de mieux définir leurs potentiels effets cytotoxiques, via par exemple, l'induction d'un stress oxydant. Nous avons également voulu savoir s'il y avait également des effets sur la modulation de l'expression d'un certain nombre de gènes et de leurs isoformes impliqués dans le stress oxydant. Nos recherches ont donc permis d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- ❖ Les nanoparticules de fer, même agglomérées, pénètrent-elles au sein des cellules bryophytiques suite à une exposition par dépôt humide au niveau des gamétophytes ?

Nos observations ont mis en évidence une forte agglomération de nos Fe-NP dans le milieu d'exposition de notre modèle végétal (eau de *Volvic*). Cette observation et notre analyse de la surface des nanoparticules (Chapitre 3) vont dans le sens de certaines études qui ont montré une adsorption de molécules organiques à la surface des nano-oxydes dans des milieux biologiques complexes (pH neutre, riches en sucres, sels, protéines, lipides, enzymes...) (Limbach *et al.*, 2005) ce qui a pour conséquence une passivation de la surface induisant une diminution des forces de répulsion entre les nanoparticules et donc une forte agglomération (Limbach *et al.*, 2005 ; Auffan *et al.*, 2006). Cette agglomération augmente donc le diamètre hydrodynamique des

agglomérats ce qui peut influencer leur pénétration et donc leurs effets biologiques. Ainsi, avant toutes études d'écotoxicité, il nous a paru indispensable de vérifier cette pénétration et absorption au sein des cellules de *Physcomitrella patens*.

- ❖ Les nanoparticules de fer sont-elles capables d'induire des effets cytotoxiques, un stress oxydant et/ou de moduler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant ?

Au préalable, nous avons cherché à démontrer la pénétration de ces nanoparticules de fer au sein des cellules de *Physcomitrella patens* (Cf. article 2) et leurs effets biologiques (Cf. article 3).

1. La pénétration des nanoparticules de fer au sein des cellules de *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.

Cette partie est consacrée à l'étude de la pénétration des Fe-NP au sein des cellules de *Physcomitrella patens* suite à une exposition par dépôt humide au niveau des gamétophytes. Pour cela, nous avons adapté deux techniques de microscopie à notre modèle : la microscopie confocale avec l'utilisation de la technique de Nomarski (differential interference contrast ou DIC) et l'autofluorescence des plantes ; et la microscopie électronique à transmission (MET).

Notre étude a permis de mettre en évidence la pénétration de Fe-NP au niveau des cellules de *Physcomitrella patens* après trois jours d'exposition entre 500 et 50 000 ng/plant, cette pénétration restant observable même après 21 jours d'exposition.

Ces résultats obtenus à l'aide de la microscopie confocale ont fait l'objet d'un article accepté dans « *Journal of Bryology* » en 2014. Dans cet article, c'est le second nom de *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. qui sera utilisé, soit *Aphanorrhagma patens* (Hedw.) Lindb. qui correspond à la nomenclature de « *Checklist and Census Catalogue of British and Irish Bryophytes* » (2008), utilisé comme référence par « *Journal of Bryology* ». Une seconde partie est consacrée aux résultats obtenus en microscopie électronique à transmission.

1.1. Article 2. Atmospheric foliar iron engineered nanoparticle uptake by *Aphanorrhegma patens* (Hedw.) Lindb.

Ludivine Canivet, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Pierre Dubot, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Franck-Olivier Denayer, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Abstract. Iron nanoparticles were produced in a radiofrequency levitation furnace and their dimensions and purity determined by scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Confocal microscopy revealed that these particles penetrated the leaves of *Aphanoregma* when applied to the plants in mineral water suspensions. This, the first demonstration of nanoparticle uptake by a bryophyte, opens the way to nanotoxicological studies paralleling those in higher plants. The actual penetration mechanism in both groups remains unknown.

Key words: confocal microscopy, x-ray microanalysis, iron nanoparticles, nanotoxicology, *Aphanorrhegma patens*

1.1.1. Introduction

The industrial fallout of particulate matter is an important source of atmospheric pollution (Meyer et al., 2010; Ledoux et al., 2006; Garçon et al., 2006). These particles are emitted in a large variety of sizes and, in recent decades, the proportion of fine particulate matter has increased with the use of more efficient filters by industry (Muller et al., 2007). In 2006, Garçon et al. highlighted that 33% of the particles are now less than 500 nm in size with, thanks to better detection, a dramatic increase in metallic nanoparticles (defined as those having at least one dimension less than 100nm) and particularly those containing iron, a finding confirmed in other studies (Ledoux et al., 2006; Garçon et al., 2006; Lamaison, 2006). Although the possible impact of nanoparticle emissions on living organisms is poorly understood “Plant nanotoxicology” has recently been recognised as a new discipline (Dietz & Herth, 2011) that is receiving increasing attention alongside the rapid development of engineered nanoparticles (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006; Nowack & Bucheli, 2007).

Plants are increasingly being used as biological models for studies on nanotoxicity and several ecotoxicity studies have now demonstrated the penetration of various nanoparticles into root and leaf cells of higher plants (Battke et al., 2008; Gonzalez-Melendi et al., 2008; Lin & Xing, 2008; Larue et al., 2011, 2012; Uzu et al.,

2010; Dietz & Hertz, 2011). However, to date there are no parallel studies on nanoparticles in bryophytes. This is all the more surprising since bryophytes are excellent sentinels of air quality and are generally recognized as efficient accumulators of pollutants particularly of metallic trace elements (Denayer, 2000; Faburé et al., 2010; Garrec & Van Haluwyn, 2002).

The objective of this study was to evaluate, using different microscopy techniques, possible uptake of iron-engineered nanoparticles by leaves of *Aphanorrhagma patens* (Hedw.) Lindb., as a prelude to understanding the impact of nanoparticles on bryophytes.

1.1.2. Materials and methods

1.1.2.1 Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles

In nanotoxicology studies, precise characterization of the nanoparticles is essential (Card & Magnuson, 2010) since their size and surface area affects their penetration into cells (Dietz & Herth, 2011). Metallic iron nanocrystals were produced using a gas condensation technique (cryogenic melting) described by Champion and Bigot (1996). To avoid contamination through reactions with a crucible, the metal was heated in a radiofrequency levitation furnace. These particles are representative of those in smoke emitted by metallurgical industries (Hervé-Bazin, 2007). The shape and the size of the iron nanoparticles were determined by scanning electron microscopy using a LEO 1530 (Zeiss, Germany). Samples of the particles were prepared by spraying a homogenized iron nanoparticle solution on a thin plate of gold-coated glass and their size determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS_K ALPHA, Thermo Scientific) was used to analyse the surface chemical elemental composition of the nanopowders, deposited on the gold-coated substrate, by photoionization of heart atomic levels (Al K α source, $h\nu = 1486.6$ eV). We coupled this analysis with ion sputtering (Kr $^+$, 3keV) to determine the depth distribution of elements within the iron nanoparticle surfaces. The compositions of the surface oxide film surface and the underlying metal were determined by measuring integrated photopeak intensities with a Shirley background subtraction. The peak area was corrected from sensitivity factors (Briggs & Seah, 1990). The X-ray spot diameter was set to 0.1 mm. For depth-profiling, the Ar ion gun primary energy was set to 3.0 KeV, with a sputtering speed of approximately 0.1 nm.s $^{-1}$. Survey spectra (overall XPS spectra) were acquired with an energy step ΔE of 1.0 eV, while ΔE was 0.1 eV for core level regions. Acquisition time was 100 ms per step in all cases. The analysis chamber base pressure was 6.0 10 $^{-10}$ torr and which increased by a tenth during Ar $^+$ sputtering. The zeta potential (ζ) was recorded as a measurement of the nanoparticle surface charge (Zetasizer II, Malvern Instruments). Finally, we determined the specific surface area (ssa) of our iron nanoparticles

according to the Brunauer, Emmet and Teller method (Brunauer and al., 1938) by nitrogen adsorption (Micromeritics_Type ASAP 2010).

1.1.2.2 Plant material and growth conditions and nanoparticle application

Aphanorrhegma patens (Hedw.) Lindb. plants (Gransden, Gransden Wood, Cambridge, United Kingdom) were obtained from the International Moss Stock Center in Freiburg. Gametophytes of *Aphanorrhegma patens* from vegetative cultures were grown axenically on a solid BCD medium (Ashton & Cove, 1977; Cove & Quatrano, 2006) at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, in a culture chamber (Phytobac[®], Strader) with an irradiance of $300 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ and a light/dark periodicity of 16/8h. Young plants were cultivated for three weeks in phytatrays[®] (Sigma) to obtain plants of about 1 cm. These were transplanted into new 6-well plates and were acclimatised for one week before exposure to the nanoparticles.

The nanoparticles were suspended in commercial mineral water (Volvic, France) and the solution was placed in an ultrasonic bath (Neyo, 50-60 Hz) for five minutes before exposure. This solution was selected because it has a low mineral content (Meyer et al., 2010). 500 μl of the suspension was applied by pipette onto the *Aphanorrhegma patens* plants. The treatments, all with 3 replicates, were: 5 ng/plant, 50 ng/plant, 500 ng/plant, 5 000 ng/plant and 50 000 ng/plant for 3 days, 7 days, 14 days and 21 days. Control plants received 500 μl of the nanoparticle-free commercial water.

1.1.2.3 Microscopic analysis methods

Confocal microscopy. Confocal imaging was used to detect the presence of the iron nanoparticles within *Aphanorrhegma patens* rather than labelling the nanoparticles with a fluorescent marker (Eichert et al., 2008; Navarro et al., 2012; Zhao et al., 2012a; Zhang et al., 2013) since this modifies the nanoparticle surfaces, which in turn may radically change their penetration properties) Freshly harvested gametophytes were fixed in 2 % paraformaldehyde and 2 % glutaraldehyde in a phosphate buffer (PBS) overnight at 4°C . The materials were washed with phosphate-buffered saline (PBS) twice (30 min each) at room temperature to remove the fixative (Dombu et al., 2010; Lira et al., 2011) and mounted on microscopic slides in a 1:1 mixture of PBS:glycerol. To visualise the iron nanoparticles in the *Aphanoregma* leaves the fixed specimens were observed in white light with an inverted optical microscope Eclipse Ti-U (Nikon). The confocal observations were performed with an inverted laser scanning Axio observer microscope LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) and EC PLAN Apochromat 63x/1.4 NA. A DPSS laser was used for autofluorescence with excitation at 561 nm. We used both autofluorescence of the plants and differential interference contrast (DIC) (Gonzalez-Melendi et al., 2008). Three-dimensional analysis was performed by Z-axis imaging with 0.42 μm -thick optical slices. Acquisitions were performed in sequential modes and analysed with ZEN confocal software.

Elemental analysis. Energy dispersive X-ray analysis (EDS Ultradry; Thermo Electron fitted to a HITACHI S-4300 SE/N scanning electron microscope) was used to determine the elemental composition of the nanoparticle agglomerates observed on the *Aphanorrhegma patens* leaves. For this, leaves were placed on a carbon support and dehydrated for 48 h.

Tab. 16: Characterization of pristine state of nanoparticles of iron-engineered nanoparticles

Shape	Composition	Purity	Surface area	Size distribution	Agglomeration	Zeta potentiel	VSSA
Sphere	Core of metallic iron with an oxide (Fe^{2+} and Fe^{3+}) and hydroxide layer of 2 nm	Free of impurity	$27.72 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	20-80 nm	700 nm (average of 200 nm with sonication step)	-12 mV	$218.27 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$

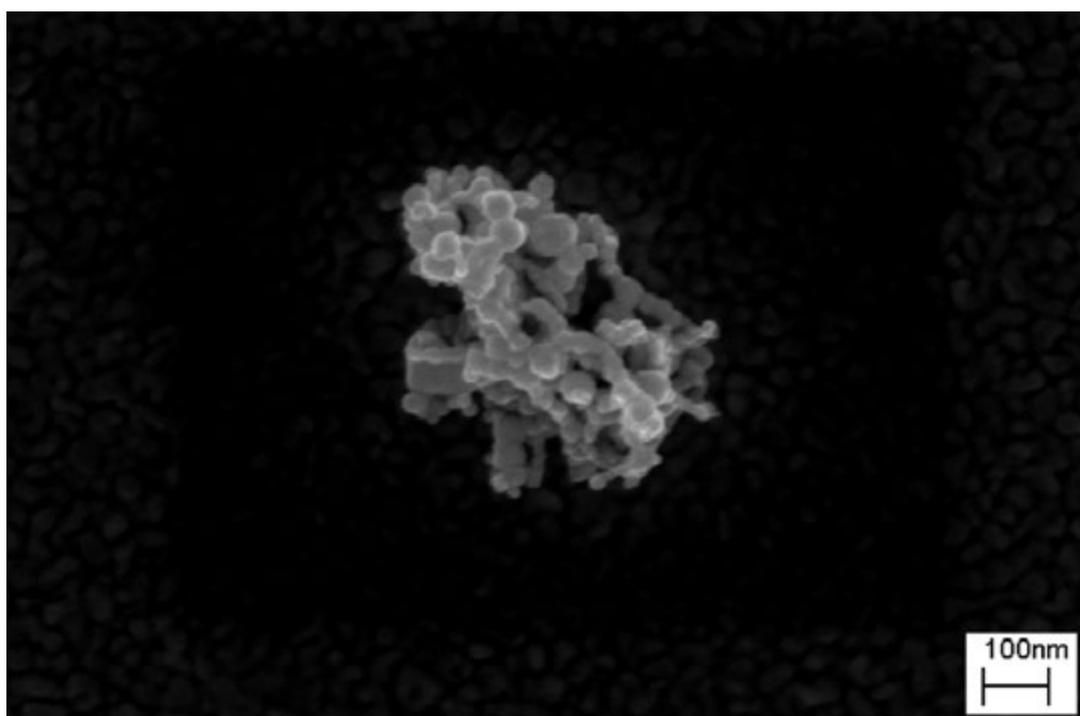


Fig. 50: SEM image of iron nanoparticles

1.1.3. Results

1.1.3.1 Characterization of iron nanoparticles

The key features of the iron nanoparticles are summarized in Table 16 using the eight parameters of Card & Magnuson (2010). They were formed from a metallic iron core with an oxide layer (Fe^{2+} and Fe^{3+}) of 2 nm as revealed by the Fe_{2p} core level and were free from any impurities. The layer of hydroxide was revealed by deconvolution of the O_{1s} peak and this increased slightly by 0.16nm following immersion in water for 24h.

The particles also formed magnetic agglomerates with a mean size of 700 nm. A typical iron nanoparticle is illustrated in Figure 50.

Sonication for 15 min (Neyo, 50-60 Hz) as part of the preparation of the suspensions followed by further sonication of 5 min just before their application reduced the size of the agglomerates down to an average size of 200 nm. The zeta potential of the pristine state of nanoparticles was about -12 mV. We also verified that this sonication step did not change this zeta potential. The mean surface area of iron nanoparticles was $27.72 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. To distinguish nanostructured material from non-nanostructured material, the volume specific surface area (VSSA) can be a complementary criterion, based on its integral material surface area per unit volume. Expressing the surface area related to the volume instead of mass allows for an additional criterion independent of the density and size or size distribution of the nanomaterial. A VSSA above $60 \text{ m}^2.\text{cm}^{-3}$ would indicate an average size below 100 nm, thus indicating a high nanomaterial or nanostructure content (Kreyling et al., 2010). The VSSA of the iron nanoparticles was calculated to be $218.27 \text{ m}^2.\text{cm}^{-3}$. This result indicates that the nanoparticle agglomerates retained their nanoparticle reactivity.

*1.1.3.2 Uptake of iron nanoparticles in *Aphanorhagma patens**

Iron nanoparticle agglomerates were clearly visible by optical microscopy on the surface of leaves following application of 500ng/plant suspension and were more numerous following application of the more concentrated suspensions (Figure 51). They were not observed in the controls nor following the application of the 5ng and 50ng/plant suspensions.

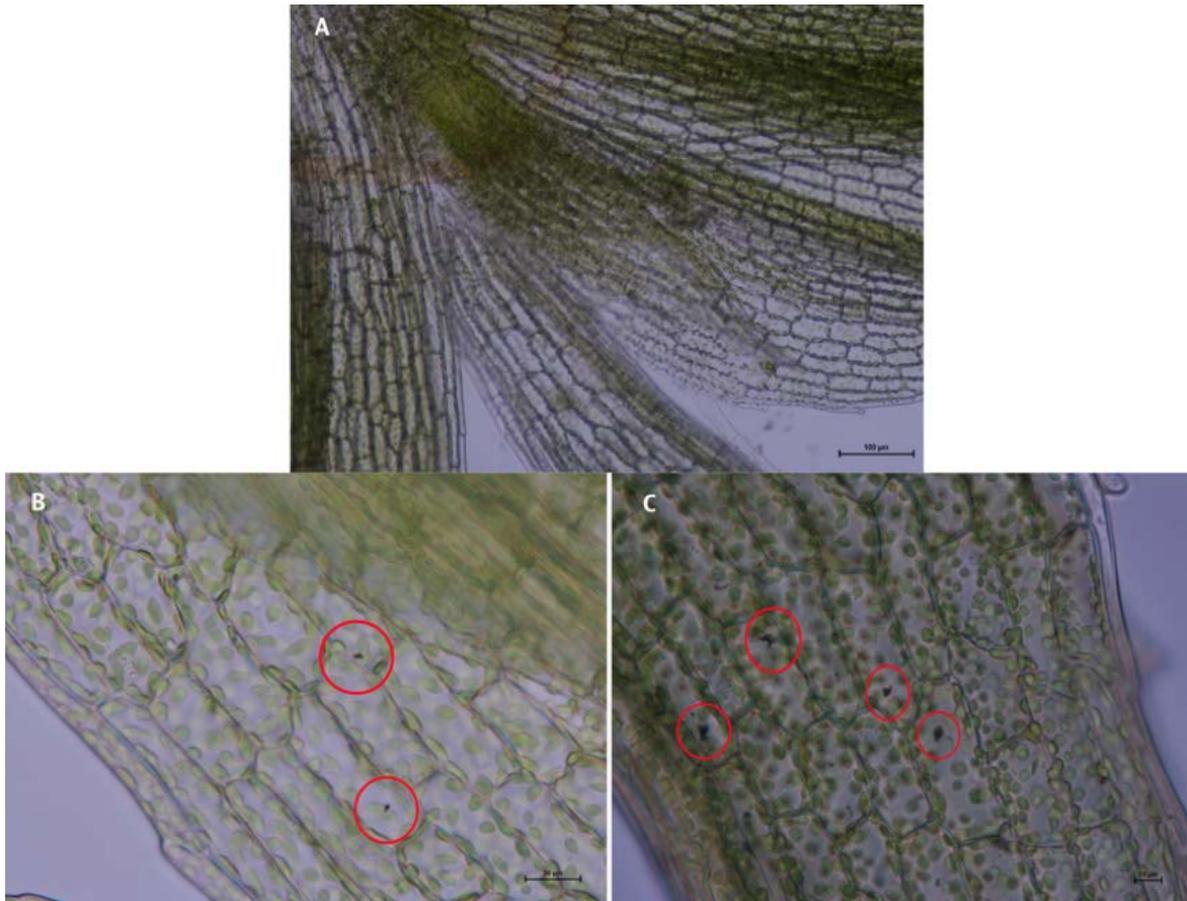


Fig. 51: A - Microscopy image of leaf of *Aphanorrrhegma patens* not exposed to iron-engineered nanoparticles (x10). B - Microscopy image of leaf of *Physcomitrella patens* under treatment of 500 ng/plants of Fe nanoparticles following 14-day exposure (x40). C - Microscopy image of leaf of *Physcomitrella patens* under treatment of 5 000 ng/plants of Fe nanoparticles following 7-day exposure (x40). The red circles around the agglomerates of nanoparticles.

EDX analysis (Figure 52) confirmed that the particles on the leaf surfaces were indeed iron agglomerates.

Confocal microscopy clearly revealed that nanoparticles had actually penetrated the leaves of *Aphanorhagma patens* (Figure 53). The iron particles, appearing as black grains due to light absorption (Figure 53 A, C), are clearly in the same focal plane within in the cells as the chloroplasts visualised by chlorophyll autofluorescence (Figure 53 B). These intracellular agglomerates were first seen only 3 days after application of the 5 000 ng and 50 000 ng/plant suspensions and were invariably present after 7, 14 and 21 days exposure. They were not detected in the controls nor with the lower suspension concentrations.

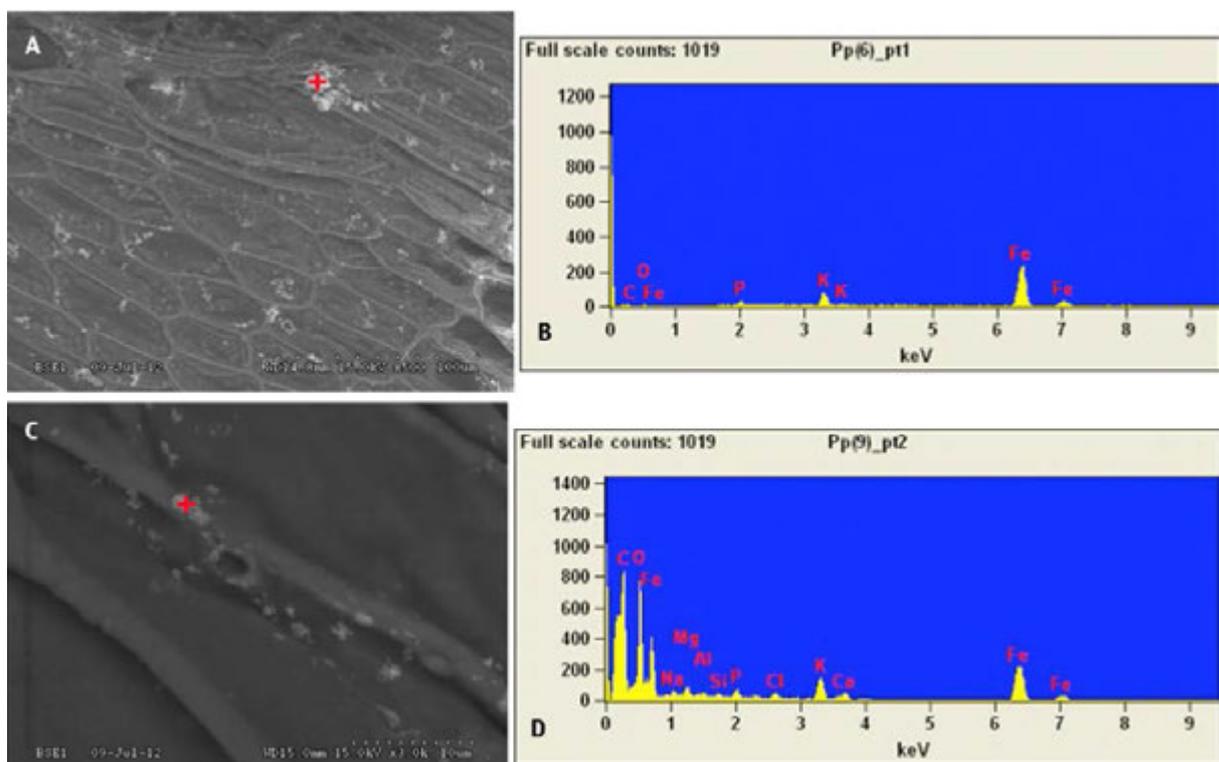


Fig. 52: SEM micrographs (A) and EDX analysis (B) of the iron-engineered nanoparticles deposited on *Aphanorhagma patens* leaves.

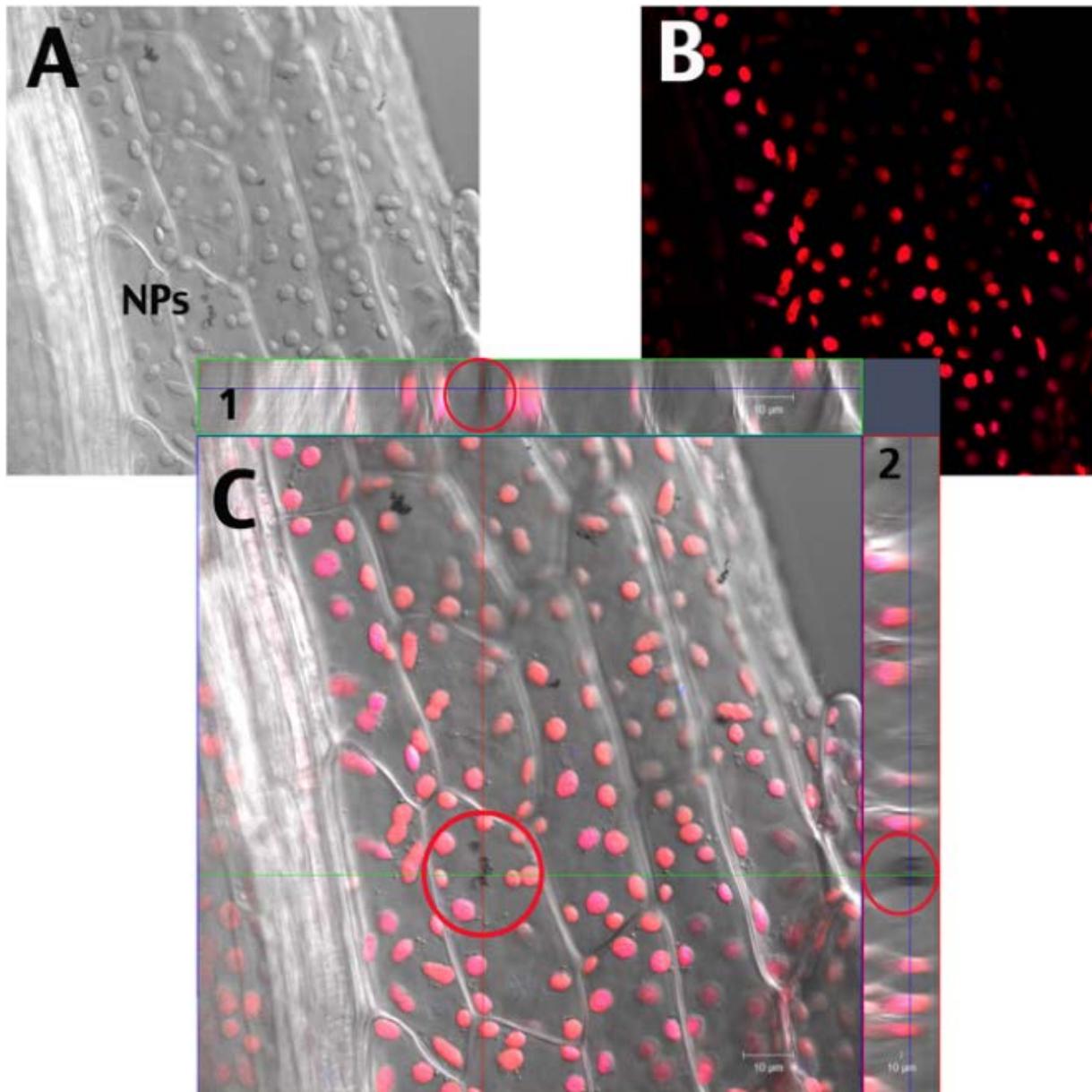


Fig. 53: A, B, C - Confocal fluorescence microscopy image of leaf of *Aphanorrhagma patens* under treatment of 5μg/plants of Fe nanoparticles following 14-day exposure. View A shows the leaf of *Physcomitrella patens* in DIC method. The view B shows the same leaf under an excitation of 561nm. The view C shows the same leaf in post-observation with ZEN (orthogonal section view). In this view, section 1 shows the horizontal optical section and section 2 shows the vertical optical section. The agglomerates of Fe nanoparticles observed are surrounded. (photos of L. Canivet, 2011). NPs: Nanoparticles

1.1.4. Discussion

This study clearly shows that iron nanoparticles are taken up by leaves of *Aphanorhagma patens*, but, as in higher plants, the penetration mechanism by metallic particles remains a mystery (Tomasevic et al., 2005; Uzu et al., 2010). Entry via stomata or through the bases of trichomes, as suggested for higher plants, (Uzu et al., 2010; Eichert et al., 2008; Fernandez & Eichert, 2009) is clearly not possible in bryophytes. According to Nair et al. (2010), the cell wall of the higher plants acts as a barrier to the free entry of any external agent, including nanoparticles. Leaves have pores in their cell walls whose diameter ranges from 5 to 20 nm (Fleischer et al., 1999). These are clearly much smaller than nanoparticles or nanoparticle aggregates (Moore, 2006; Navarro et al., 2008). It has however, been suggested that an interaction between nanoparticles and the cell wall might induce enlargement of the pores or create new ones (Nair et al., 2010). In addition, it may be that penetration of cell walls and possible changes in pore dimensions are related to the surface reactivity of nanoparticles

Our demonstration that iron nanoparticles penetrate *Aphanorhagma patens* leaves opens the door to ecotoxicological studies. It will be of considerable interest to explore whether the phytotoxic effects are the same as in higher plants (Zheng et al., 2005; Gao et al., 2006; Yang et al., 2006; Yang et al., 2007; Gao et al., 2008; Khodakovskaya et al., 2009; 2011; Tripathi et al., 2011; Feng et al., 2013; Kumar et al., 2013; Shaw & Hossain, 2013) where they range from oxidative stress (Dietz & Herth, 2011) to possible genotoxic effects (Kumari et al., 2009; Ghosh et al., 2010; Canivet et Denayer, 2011; Klančnik et al., 2011; Panda et al., 2011; Ghosh et al., 2012; Patlolla et al., 2012).

1.1.5. Acknowledgements

The laboratory participates in the Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI) which is financed by the Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and European Regional Development Fund (ERDF).

The ADEME (the French Agency for Environment and Energy) is acknowledged for their financial support.

We are grateful to Meryem Tardivel of the BICeL- Campus Lille 2 IMPRT Facility for access to instruments and technical advice.

We thank Didier Betbeder for access to the Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments) and the Ecole des Mines in Douai for the determination of specific surface areas of the iron nanoparticles.

We thank Damien Cuny and Guillaume Garçon for internal reviewing and Suzanna Scott for English reviewing.

The authors declare no competing financial interests.

1.2. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission

Le MET nous a permis de voir les organites et l'organisation intracellulaire de *Physcomitrella patens* (figure 54). Lors de nos travaux, nous avons pu observer un agglomérat de Fe-NP au niveau intracellulaire (figure 54). Cependant, nous n'avons pas pu avoir accès à un MET couplé à une sonde EDX. C'est pour cela, que nous n'avons pas pu vérifier que nous étions bien en présence de fer. De plus, l'observation de la pénétration cellulaire des Fe-NP n'est pas aisée à cause :

- ❖ la présence d'une paroi, qui posait des difficultés pour la mise au point de la préparation des échantillons, notamment pour la pénétration homogène de la résine ;
- ❖ de la finesse des coupes faites en MET qui peut induire un phénomène d'arrachement lorsque la lame du couteau rencontre un agglomérat métallique ;
- ❖ et, du caractère aléatoire de la récolte des feuilles analysées mais aussi celui de la pénétration cellulaire des Fe-NP.

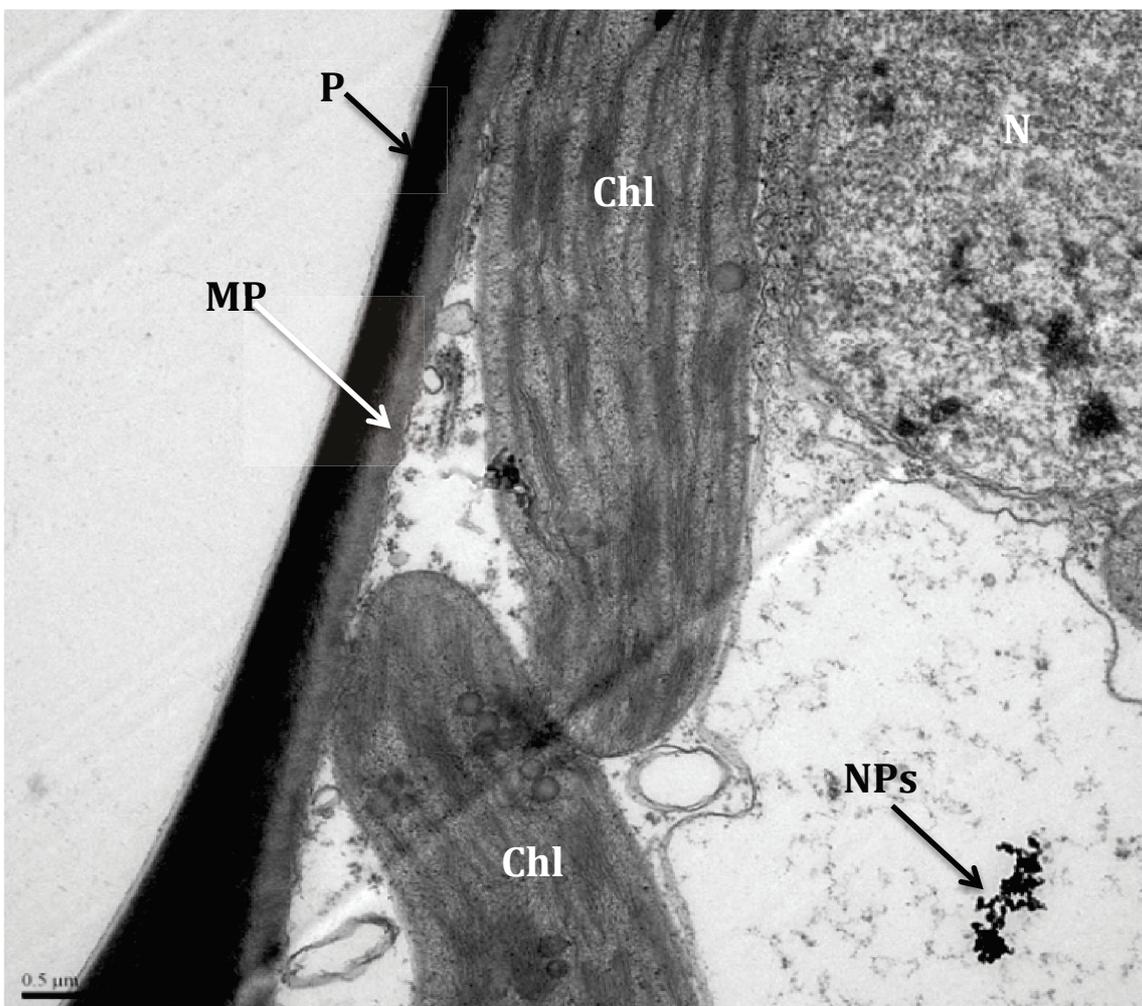


Fig. 54 : Figure d'une cellule de *Physcomitrella patens* après une exposition de 21 jours à des Fe-NP (50 000 ng/plant) (Photo of C. Allet, 2010) - P : paroi - MP : membrane plasmique - Chl : chloroplaste - N: noyau - NPs : Fe-NP.

2. Les effets des nanoparticules de fer chez *Physcomitrella patens*

Après avoir mis en évidence l'internalisation des Fe-NP au sein des cellules de *Physcomitrella patens*, nous avons étudié leurs impacts sur la viabilité cellulaire, l'induction d'un stress oxydant, leur génotoxicité et leurs effets sur la modulation de l'expression de gènes.

Nous nous sommes, tout d'abord, focalisé sur la capacité qu'auraient les nanoparticules à induire une cytotoxicité et à générer la production de ROS et RNS. Nous avons donc travaillé sur un paramètre qu'est l'ATP afin de vérifier la viabilité cellulaire et sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Puis, avons recherché plusieurs biomarqueurs d'exposition en relation avec le stress oxydant comme le glutathion impliqué dans beaucoup de mécanismes antioxydants et le malondialdéhyde témoignant d'une lipopéroxydation membranaire. Nos travaux de recherche montrent que même aux plus fortes doses, l'état sanitaire de nos plants n'a pas semblé être impacté. De même, l'augmentation rapide de la production de ROS induite par une exposition aux Fe-NP a semblé rapidement contrôlée et compensée par l'organisme. De même, les mécanismes antioxydants, étudiés au travers du ratio GSSG/GSH ont montré une adaptation de l'organisme pour lutter contre le stress induit, observable par un phénomène de « sur-compensation » (Tausz *et al.*, 2004). Enfin, une peroxydation lipidique significative n'a pas été mise en évidence, même si certaines tendances ont pu être observées. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis dans *Ecotoxicology and Environmental Safety* en 2013.

De manière à obtenir un biomarqueur plus précoce témoignant de l'initiation des mécanismes de défenses antioxydants de la plante, nous avons recherché de quelle manière ces Fe-NP sont susceptibles de moduler l'expression de certains gènes impliqués dans la lutte contre le stress oxydant. Nous avons observé quelques modulations d'expression de gènes comme celle de la monodéhydroascorbate réductase, de la glutathion réductase et de l'ascorbate peroxydase ; ainsi que de leurs isoformes.

Enfin, nous avons étudié la génotoxicité des Fe-NP en mesurant la production d'adduit à l'ADN (8-OHdG). Un faible effet génotoxique sur *Physcomitrella patens* a été observé, correspondant à une augmentation de la formation de 8-OHdG à la concentration de 50 000 ng/plant après 24h d'exposition ($p < 0,05$).

Parallèlement, nous avons développé le test des comètes sur notre modèle bryophytique. Nos essais nous ont permis d'observer, pour la première fois des noyaux intacts et des images de comètes, montrant une dégradation de l'ADN, chez la mousse. Une fois optimisé, ce test pourra s'ajouter à ceux déjà existants pour les bryophytes.

2.1. Article 3. Effects of iron engineered nanoparticles on *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp after foliar exposure

Ludivine Canivet, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Pierre Dubot, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Guillaume Garçon, Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Franck-Olivier Denayer, laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, EA4483, Université de Lille 2

Abstract. In industrial areas, we can observe the presence of nanoparticles, produced unintentionally by industries and rejected into the atmosphere. The proportion of anthropogenic nanoparticles increased with more efficient filters in industry, which retain the fine particles but not the nanoparticles. Moreover, studies have shown a significant proportion of iron in these atmospheric particles and nanoparticles, rejected principally by metallurgical industries. These nanoparticles can have an impact on the environment, and particularly the plants that are exposed first. In this context, plant nanotoxicology takes all its meaning. It is important to evaluate the impact of the nanoparticles on plants. Moreover, bryophytes are excellent models in environmental biomonitoring. Therefore, we chose bryophytes to study the effects of nanoparticle-loaded fallouts where foliar exposure can be particularly important.

The aim of our study was to evaluate iron-engineered nanoparticle effects on *Physcomitrella patens* (bryophyte) following foliar exposure. After a complete characterization of iron nanoparticles and the validation of nanoparticle internalization in cells, the effects (cytotoxicity, oxidative stress, lipid peroxidation of membrane) of iron nanoparticles were determined through the axenic culturing of *Physcomitrella patens* exposed to iron nanoparticle dispersions at five different concentrations (5, 50, 500, 5 000 and 50 000 ng per plant). After nanoparticle exposure, the plant health, measured by the ATP concentration, was not impacted, so any cytotoxic effect was shown for doses used. Moreover, we studied oxidative stress in three ways: through the measure of reactive oxygen species production, through malondialdehyde production and also through glutathione regulation. Despite a slight disruption of ROS and oxidative stress biomarkers, *Physcomitrella patens* seems little affected by exposure to iron nanoparticles at concentrations tested over a short period. Our organism seems to have an efficient antioxidant system to counteract the stress induced by nanoparticles at the tested concentrations.

Key words: iron nanoparticles, *Physcomitrella patens*, reactive oxygen species, glutathione, malondialdehyde

2.1.1. Introduction

In the past years, the problem of air pollution and its effects on the ecosystem have been a growing concern. Preoccupations have arisen in this context particularly due to the presence of metals in airborne particles (Ledoux et al., 2006). Indeed, the atmospheric environment is a mixture of gases and particles of mineral or organic origin. The types of atmospheric pollutants and the pollution levels depend on many factors, such as emission sources, physical conditions, and meteorological parameters (Meyer et al., 2010). Industrial fallouts of atmospheric particulate matter represent an important source of atmospheric pollution (Meyer et al., 2010; Ledoux et al., 2003; Garçon et al., 2006). The particles emitted in the environment have a large variety of sizes, and in recent decades the proportion of fine particulate matter has increased with the use of more efficient filters in industry (Muller et al., 2007). In 2006, Garçon et al. highlighted that 33% of particles are less than 500 nm in size and they demonstrated the presence of metallic nanoparticles in industrial atmosphere with an important presence of iron confirmed by other authors (Ledoux et al., 2003; Garçon et al., 2006; Lamaison, 2006). Therefore, it was interesting to study the effects of iron nanoparticles on the ecosystem and evaluate plant models in biomonitoring studies.

The emerging concept of “Plant nanotoxicology” (Dietz & Herth, 2011) is receiving increasing attention within this context of air pollution and with the fast development of nanotechnology (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006; Nowack and Bucheli, 2007). To date, plants are widely used as biological models to evaluate the impact of pollution on the ecosystem. Nanotoxicity plants studies are still emerging but have developed considerably in recent years. Several ecotoxicity studies have shown penetration of various nanoparticles in cells of higher plants following root exposure (Battke et al., 2008; Gonzalez-Melendi et al., 2008; Lin & Xing, 2008; Larue et al., 2011, 2012) and leaf exposure (Uzu et al., 2010; Dietz & Hertz, 2011). Ecotoxicity studies have developed but the results are often conflicting. Indeed, they could highlight the negative effects on growth and development of higher plants (Ruffini-Castiglione & Cremonini, 2009). Conversely, Barrena et al. (2009) showed that gold, silver and Fe₃O₄ nanoparticles had little or no effect on cucumber and lettuce germination. The scientific community agrees that research should be deepened and extended, and the exposure conditions, the type of nanoparticles and their characteristics and the studied biological model should be taken into account in order to interpret the results of ecotoxicity studies (Ma et al., 2013).

Little research on the nanoparticle effects on bryophytes has been carried out, and yet mosses are specific organisms that could be used to evaluate the atmospheric pollutant impact on the environment. Many studies have shown that bryophytes are excellent sentinels of air quality. Indeed, these lower plants are recognized as good accumulators of pollution, particularly for metal trace elements (Denayer, 2000; Faburé et al., 2010; Garrec and Van Haluwyn, 2002). Moreover, these organisms do not have a

root system that ensures exposure of these organisms to atmospheric pollutants. Finally, some mosses are pioneer species, which play an important role in the bare or degraded soil colonization and they permit the installation and maintenance of higher plants, significant for a good plant soil dynamic and sustainable ecosystem development. Therefore, bryophytes are excellent models for monitoring studies. Moreover, over time, we hope develop precocious indicators of danger.

The main objective of this study is to evaluate the iron nanoparticle effects on *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. For this, we used iron nanoparticles (Fe-NP) prepared by the vaporization and cryogenic condensation process (Champion and Bigot, 1996). These particles are representative of industrial smoke emitted by the metallurgical industries. First, in view of the special properties of nanoparticles, it was essential to characterize them before any study (Card and Magnuson, 2010). Indeed, the chemical composition of nanoparticles plays an important role in their ecotoxicity and the novel properties of nanoparticles such as their smaller size, large surface area and higher reactivity are a major point of concern. Then, after checking the atmospheric foliar iron nanoparticle uptake by *Physcomitrella patens* (Canivet et al., 2014), we evaluated their effects on viability and oxidative stress measuring ATP, reactive oxygen species, malondialdehyde and glutathione status respectively.

2.1.2. Materials and methods

2.1.2.1 Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles

Metallic iron nanocrystals were produced using a gas condensation technique (cryogenic melting) that is described by Champion and Bigot (1996). To avoid contamination through reaction with a crucible, the metal was heated in a radiofrequency levitation furnace. To confront iron nanoparticle effects in bryophyte cells with nanoparticle characteristics, a set of techniques was used to characterize our material precisely. First, we used electron microscope scanning to determine the shape and the size of iron nanoparticles. The size of nanoparticle agglomerates was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments). Then, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS_K ALPHA, Thermo Scientific) was used to analyse the surface chemical elemental composition of nanopowders. The zeta potential (ζ) was recorded as a measurement of the nanoparticle surface charge. We determined the specific surface area (ssa) of our iron nanoparticles according to the Brunnauer, Emmet and Teller method (Bruauer and al., 1938) by nitrogen adsorption (Micromeritics_Type ASAP 2010). The procedures of iron nanoparticle characterization have been described in a previous study (Canivet et al., *in press submission*).

2.1.2.2 Plant material and growth conditions

Physcomitrella patens subsp. *patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. plants (Gransden, Gransden Wood, Cambridge, United Kingdom) were obtained from the International Moss Stock Center in Freiburg. Gametophytes of *Physcomitrella patens* from vegetative cultures were grown axenically on a solid BCD medium (Ashton and Cove, 1977; Cove and Quatrano, 2006). The BCD medium was composed of MgSO₄.7H₂O (0,25 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (0,25 g.l⁻¹), KNO₃ (1,01 g.l⁻¹), FeSO₄.7H₂O (0,0125 g.l⁻¹) and Hoagland's medium (0,0016 g.l⁻¹; Sigma). BCD medium was supplemented with 7 g (#A9799 ; Sigma). Just before placing the culture, CaCl₂ (0,111g.l⁻¹) was added. The *Physcomitrella patens* plants were cultivated at a temperature of 25±1°C, in a culture chamber (Phytobac®, Strader). The light intensity was 300 μmol.s⁻¹.m⁻² with a light/dark periodicity of 16/8h. Young plants were cultivated during three weeks in phytatrays® (Sigma) before exposure, to obtain plants of about 1 cm and which were transplanted into new 6-well plates and were acclimatised for one week before exposure.

2.1.2.3 Application of iron nanoparticles

Nanoparticles were suspended in commercial mineral water (Volvic, France) and the solution was placed in an ultrasonic bath (Neyo, 50-60 Hz) for five minutes before exposure. This solution was selected because it is a water of low mineral content, with a know composition. Futhermore this water is used in bryophyte exposure (Meyer et al., 2010). We exposed the plants to nanoparticles through the atmosphere using a wet deposition corresponding to a volume of 500 μl. For this, we used a pipette and the volume was applied uniformly on the *Physcomitrella patens* plants. The plants were exposed in 3 replicates at 5 ng/plant, 50 ng/plant, 500 ng/plant, 5 000 ng/plant and 50 000 ng/plant over various periods of time. For each period, three negative controls received 500μl of nanoparticle-free commercial water.

2.1.2.4 Preparation of gametophytes for assays

The *Physcomitrella patens* plants were harvested and pressed between two sheets of Whatman paper in order to eliminate superficial water and use the biomass as reference (Sartorius, precision 10⁻⁴). The plants were fixed in liquid nitrogen and ground in specific solution (which will be specified in the following sections) using M tube (Miltenyi Biotec) with a gentleMacs™ Dissociator (Miltenyi Biotec) with the fonction RNA_01_01. The homogenate in the tube M was centrifuged (4 min, 337 g) to recover all everything and it was placed in a microtube and centrifuged (5 min, 14 000 g). The supernatant was used for the assays.

2.1.2.5 Cells viability of *Physcomitrella patens* exposed to Fe-NP

After 1 h, 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days) of exposure, the ATP content per plant was determined using the BacTiter-Glo® microbial cell viability assay (Promega). This assay quantifies the ATP present, which signals the presence of

metabolically active cells. Arising luminescence, produced by the luciferase-catalyzed reaction of luciferin and ATP, was measured using a counter (GloMax[®]-Multi Detection System; PROMEGA). In brief, the plants were ground in 700 μl of PBS, the 100 μl of the resulting supernatant was used in the assay and it was placed in a 96-well plate. This plate was incubated for 15 min at room temperature. Then, 100 μl of CellTiter-Glo[®] reagent was added to the well and agitated during 5 min. After an incubation period of 5 min at room temperature, the luminescent signal was recorded in relative luminescence units (RLU) (Herten et al., 2009). These results were adjusted to biomass of the plants ($\text{RLU}\cdot\text{mg}^{-1}$).

2.1.2.6 Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)

After 1 h, 3 h, 6 h, 24 h (1 day) and 72 h (3 days) of exposure, the reactive oxygen species (ROS) and the reactive nitrogen species (RNS) content per plant were determined using the OxiSelect[™] In Vitro ROS/RNS Assay kit (Green Fluorescence) (Cell Biolabs, Inc.) following the manufacturer's recommendation. The plants were ground in 1,5 ml of PBS (InVitrogen) and the supernatant was used in the assay. The results were given in nanomoles of ROS/RNS per gram of biomass ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.1.2.7 Membrane lipid peroxidation: malondialdehyde

After 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days) of exposure, the measure of the malondialdehyde (MDA) content per plant was performed using the HPLC method.

2.1.2.7.1 Sample preparation

The plants were ground in 500 μl of PBS. And after the centrifugation to recuperate the supernatant, 22 μl of butylated hydroxytoluene (BHT) was added and all samples were immediately stored at -80°C .

2.1.2.7.2 MDA extraction

One milliliter of 0.1 N HCL was added to 200 μl of each previously prepared sample. After 1 min of agitation, 3 ml of ethyl acetate were added. Mixtures were vortexed for 2 min and centrifuged at 1800 g (Eppendorf 5810R) for 10 min. Organic phases were then recovered (first extraction). This step was repeated once and the second extractions were added to the first and evaporated under a gentle nitrogen stream. Finally, 250 μl of methanol were used to retrieve the MDA and the samples were stored at -20°C .

2.1.2.7.3 MDA assay in HPLC

Samples (100 μl) were mixed with 650 μl of 1% H_3PO_4 and 250 μl of 0,6% thiobarbituric acid (TBA) and incubated for 30 min at 100°C in a dry bath in the dark. It was cooled rapidly on ice. The fluorescence reading was made with a Symmetry Shield C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm, WATERS) analytical column fitted with a Symmetry Shield C18 (5 μm , 3,9 x 20 mm, WATERS) guard column. The mobile phase consisted of methanol and 50 mM KH_2PO_4 , pH 6.8 (40:60, v/v). The flow rate was kept constant at 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Fluorometric detection was performed with excitation at 527 nm and emission

at 551 nm. The amount of MDA was quantified from the corresponding peak area using Empower chromatography software. The peak of the MDA-TBA adduct was calibrated as a 1,1,3,3- tetraethoxypropane standard solution following the same process as that used for the sample. The results were given in nanomoles of MDA per gram of biomass (nmol.g^{-1}).

2.1.2.8 Antioxidant system: glutathione oxidation

After 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days) of exposure, the measure of the reduced glutathione (GSH) and the oxidized glutathione (GSSG) content per plants were performed following the method developed by Kandar et al (2007), with slight modifications.

2.1.2.8.1 Sample preparation

The plants were ground in 250 μl of PBS and 500 μl of cold 10 % metaphosphoric acid (Sigma). After an incubation period of 10 min at 4°C, the whole homogenate was recuperated and centrifuged (15 min, 4°C, 22 000 g). The supernatants were aliquoted: 50 μl for GSH determination and 100 μl for GSSH determination, and immediately stored at -80°C.

2.1.2.8.2 Derivatization procedure

GSH assay. The supernatant (50 μl) was added with 200 μl of 0.1% EDTA in 0.1 M sodium hydrogenphosphate (pH 8.0). To a 240 μl portion of this mixture, 720 μl of 0.1% EDTA in 0.1 M sodium hydrogenphosphate, and 60 μl of 0.1 % OPA in methanol, was added. After incubation at 25°C for 15 min in dark, reaction mixtures were stored at 4°C.

GSSG assay. The supernatant (100 μl) was incubated at 25°C with 100 μl of 40 mM NEM for 25 min in the dark to interact with GSH present in the sample. 75 μl of 0.1 M NaOH was added to this mixture. To a 240 μl portion of this mixture, 720 μl of 0.1 M NaOH, and 60 μl of 0.1 % OPA in methanol, was added. After incubation at 25°C for 15 min in the dark, reaction mixtures were stored at 4°C.

2.1.2.8.3 Chromatography method

Chromatography of GSH and GSSG after their derivatization with OPA to form a stable, highly fluorescent tricyclic derivate was accomplished using isocratic elution on Symmetry Shield C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm, WATERS) analytical column fitted with a Symmetry Shield C18 (5 μm , 3,9 x 20 mm, WATERS) guard column at 37 °C (Block heater SBM 130D STUART). The mobile phase consisted of methanol and 25mM sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4), pH 6.0 (25:75, v/v). The flow rate was kept constant at 1 ml.min^{-1} . Optimum response of the fluorescent derivate was observed when the excitation and emission wavelengths were set at 350 and 420 nm, respectively. The amount of GSH and GSSG was quantified from the corresponding peak area using Empower chromatography software. The concentration of GSH and GSSG in the samples was determined from the calibration curve. The results were given in nmol of GSH (or GSSG) per gram of biomass (nmol.g^{-1}).

2.1.2.9 Statistical analysis

Normality and equality of variances were checked for each data set. For the purpose of comparison with the literature, data were presented as the means and standard deviations (SD). Each experimental value was compared to the corresponding control value at each point of time. Each exposure was made in 3 replicates. When the normality and the equality of variance were checked, a series of one-way variance analyses (ANOVA) was used to examine the difference between non-exposed cultures and exposed cultures to Fe-NP. Then, a Dunnett's *post hoc* test was carried out for pairwise difference, using non exposed cultures (NE) as the control. When normality was skewed, the Kruskal Wallis Test was performed (followed by Dunnett's *post hoc* test). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed with SigmaStat® 2.03 software (SPSS Inc., USA).

2.1.3. Results

2.1.3.1 Characterization of iron nanoparticles

The characterization of our iron-engineered nanoparticles was performed on the pristine state of nanoparticles and nanoparticles in water (as used for exposure) (Canivet *et al.*, in press). We defined eight parameters (Card and Magnuson, 2010), listed below. Our nanoparticles were spherical (Fig. 55) and their size distribution was measured and shown to be in a size range of 20-80 nm. They were formed from a metallic iron core with an oxide layer (Fe^{2+} and Fe^{3+}) of 2 nm as revealed by the Fe_{2p} core level. A layer of hydroxide could be also demonstrated by deconvolution of the O_{1s} peak. Moreover, this method of analysis showed that our metallic samples were free from any impurities. During our analyses, we were able to identify an agglomeration of our nanoparticles. Indeed, they were magnetic and formed agglomerates with a mean size of 700 nm. As we dispersed the nanoparticles in water, we conducted a study that showed the effect of the sonication on the reduction of the average size of agglomerates. A sonication of 15 min (Neyo, 50-60 Hz) to prepare the solution of exposure, and a sonication of 5 min just before exposure allowed us to homogenize the solution and to reduce the size of the agglomerates. We obtained an average size of 200 nm. The zeta potential of pristine state of nanoparticles was about -12 mV. We also verified that this sonication step did not change this zeta potential. The surface area of iron nanoparticles was measured to be $27.72 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. To distinguish a nanostructured material from a non-nanostructured material, the volume specific surface area (VSSA) can be a complementary criterion, based on its integral material surface area per unit volume. Expressing the surface area related to the volume instead of mass allows for an additional criterion independent of the density and size or size distribution of the nanomaterial. A VSSA above $60 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ would indicate an average size below 100 nm, thus indicating a high nanomaterial or nanostructure content (Kreyling *et al.*, 2010). The VSSA of the iron nanoparticles was calculated to be $218.27 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$. This result implies that the nanoparticle agglomerates keep their nanoparticle reactivity. Table 17

summarizes the characteristics of our iron-engineered nanoparticles in pristine state. These nanoparticles were also characterized after their immersion during 24 hours in the exposure medium (water). We observed only a slight increase in the oxide and hydroxide thickness of 0.16 nm (Canivet *et al.*, *in press submission*).

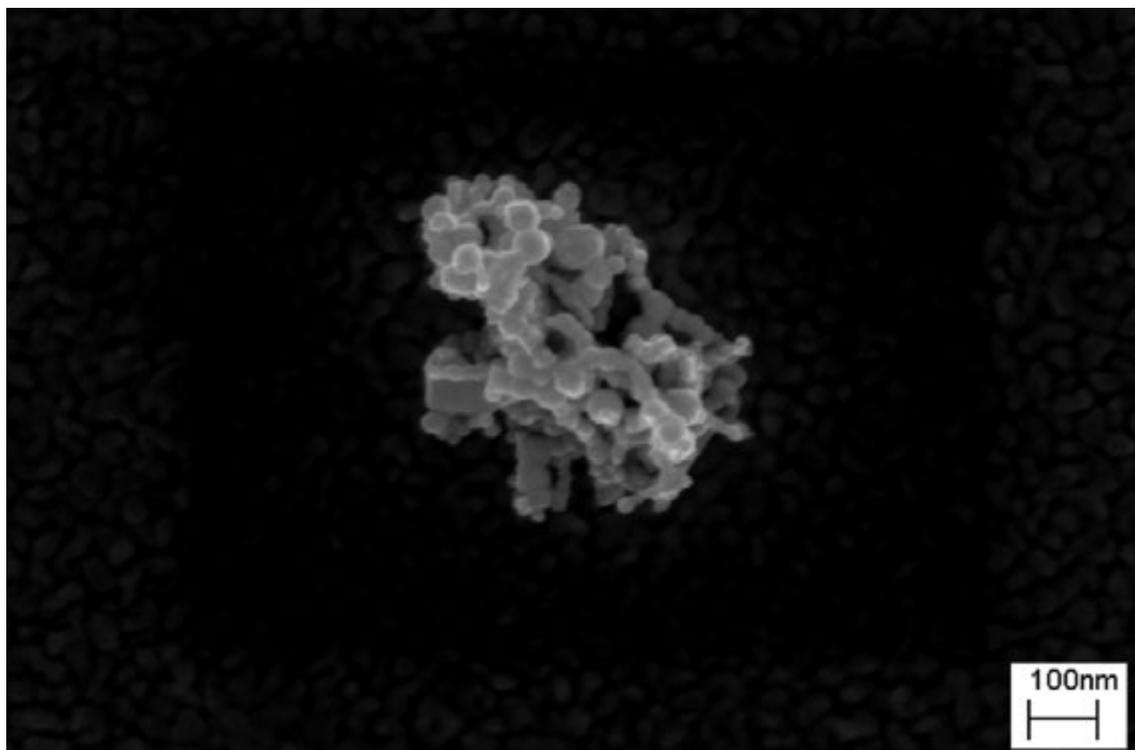


Fig. 55: MEB image of iron nanoparticles

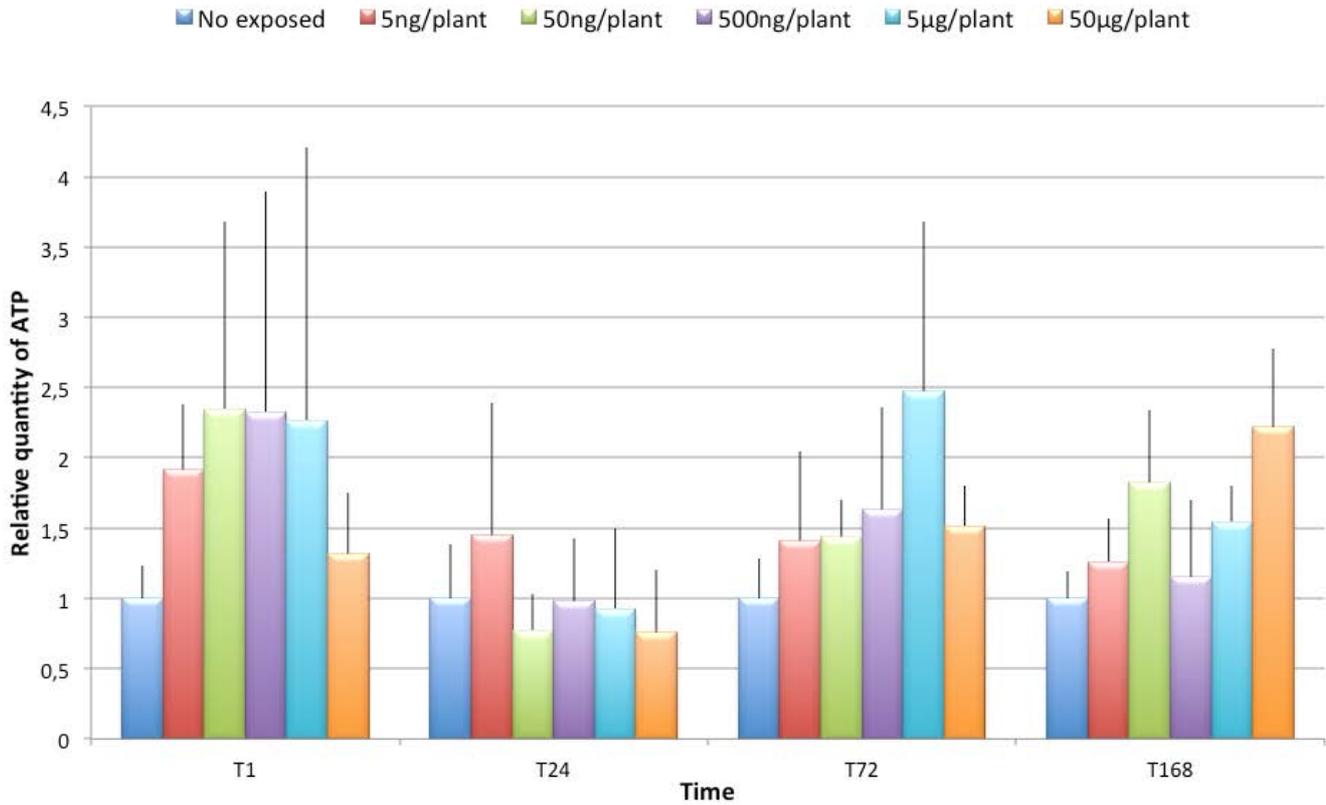
Tab. 17: Characterization of pristine state of nanoparticles of iron-engineered nanoparticles

Shape	Composition	Purity	Surface area	Size distribution	Agglomeration	Zeta potentiel	VSSA
Sphere	Core of metallic iron with an oxide (Fe ²⁺ and Fe ³⁺) and hydroxide layer of 2 nm	Free of impurity	27.72 m ² .g ⁻¹	20-80 nm	700 nm (average of 200 nm with sonication step)	-12 mV	218.27 m ² .cm ⁻³

2.1.3.2 Cells viability of *Physcomitrella patens* exposed to Fe-NP

We measured the ATP quantity present in plant cells, which signals the presence of metabolically active cells. We saw a slight overall increase after 1-h, 72-h and 168-h exposure and an increased significant after an exposure to 50 000 ng of Fe-NP after 168-h exposure ($p < 0.05$) (Fig. 56).

Fig. 56: ATP formation in *Physcomitrella patens* plants non-exposed and exposed to increased



concentration of Fe-NP after 1 h, 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days). All values are relative quantity means \pm SD (n = 3). * $p < 0,05$ vs non-exposed

2.1.3.3 Oxidative stress in gametophytes of Fe-NP-treated *Physcomitrella patens*

2.1.3.3.1 Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)

The ROS/RNS are the first markers indicating a recent oxidative stress. In our study, a slight ROS/RNS increase in *Physcomitrella patens* plants exposed to Fe-NP could be observed after 3-h exposure. Following 6-h and 72-h exposure, the ROS/RNS production was counteracted surely by the antioxidant systems. And after 72-h exposure, we observed another increase with significant difference following an exposure to 50 ng/plant and 50 000 ng/plant ($p < 0.05$) (Fig. 57).

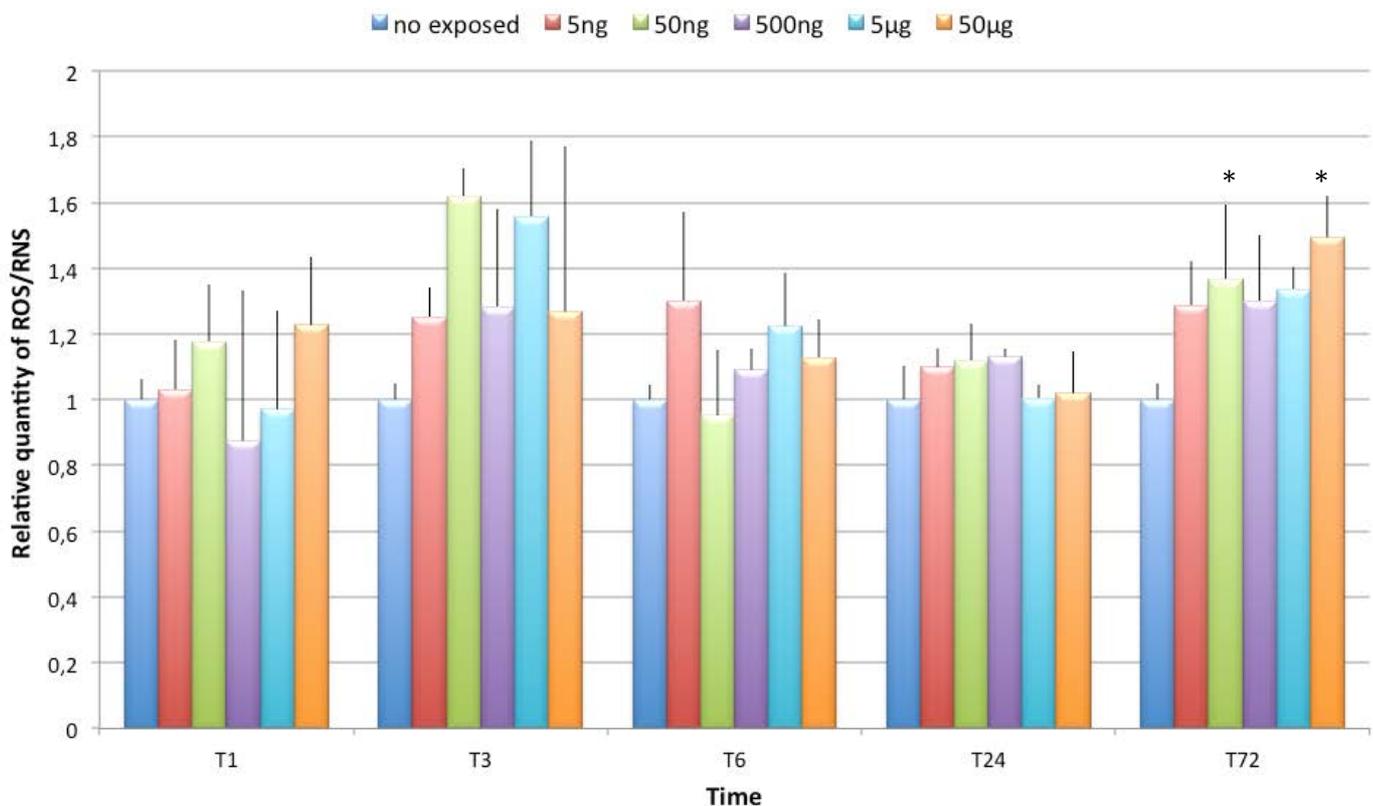


Fig. 57: ROS/RNS formation in *Physcomitrella patens* plants non exposed and exposed to increased concentration of Fe-NP after 1 h, 3 h, 6h, 24 h (1 day) and 72 h (3 days). All values are means \pm SD ($n = 3$). * $p < 0,05$ vs non exposed

2.1.3.3.2 Membrane lipid peroxidation: malondialdehyde

Malondialdehyde (MDA) is a marker of lipid peroxidation of the membrane due to an oxidative stress causing membrane destruction or due to physical destruction by direct action of nanoparticles. MDA quantity was not affected by iron nanoparticle exposure, except after 168-h exposure, where we could observe a slight increase (Fig. 58-A).

2.1.3.3.3 Antioxidant system: glutathione oxidation

An environmental stress could cause an oxidative stress. To fight against this stress, organisms could produce glutathione, a non-enzymatic antioxidant. Firstly, the formation of reduced glutathione (GSH) did not seem affected by an exposure to Fe-NP (not shown here). Therefore, the GSH baseline levels were not changed despite exposure. The study of the effects of iron nanoparticles on glutathione status (Fig. 58-B) showed a decreasing trend after 24 h, 72 h and 168 h, reflecting the establishment of defence systems. Indeed, a decrease could be observed for an exposure of 5 and 50 ng/plant after 24-h exposure, for an exposure of 500 and 5 000 ng/plant after 72-h exposure and for an exposure of 50, 500, 5 000 and 50 000 ng/plant after 168-h exposure.

2.1.4. Discussion

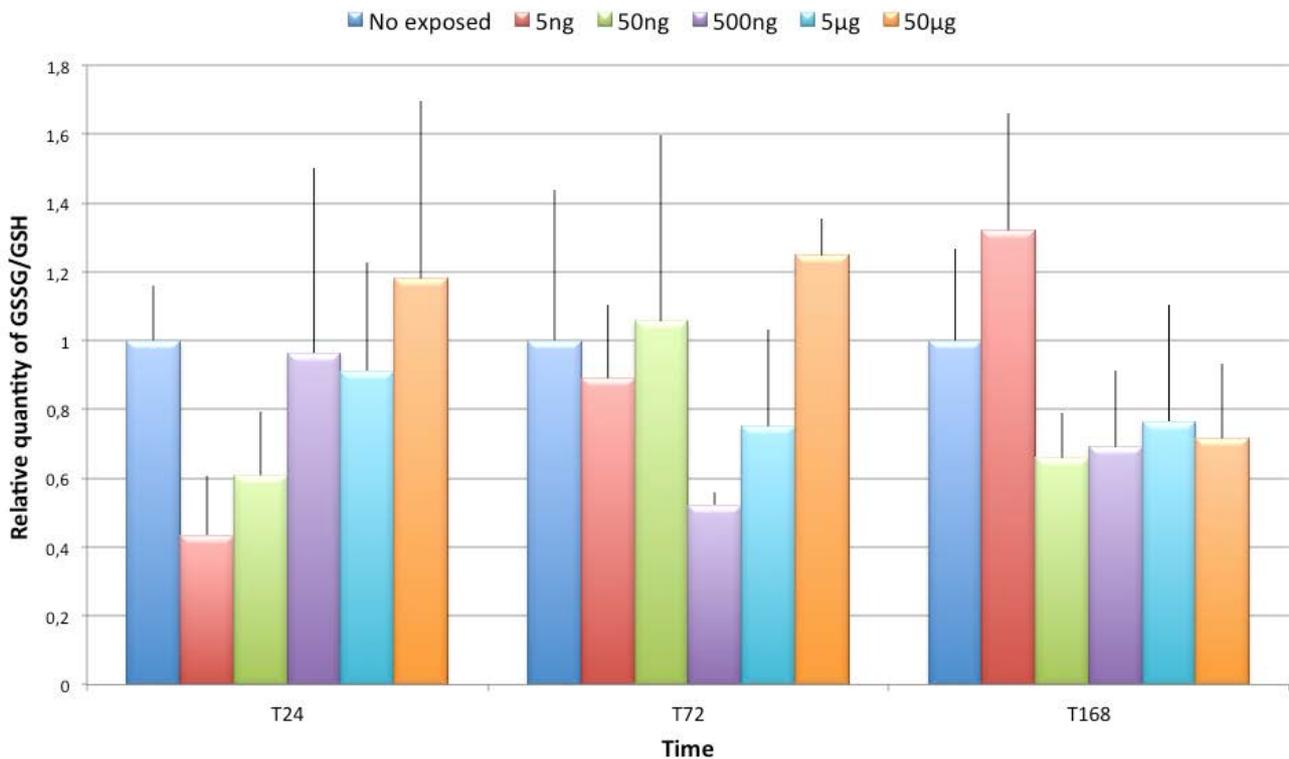
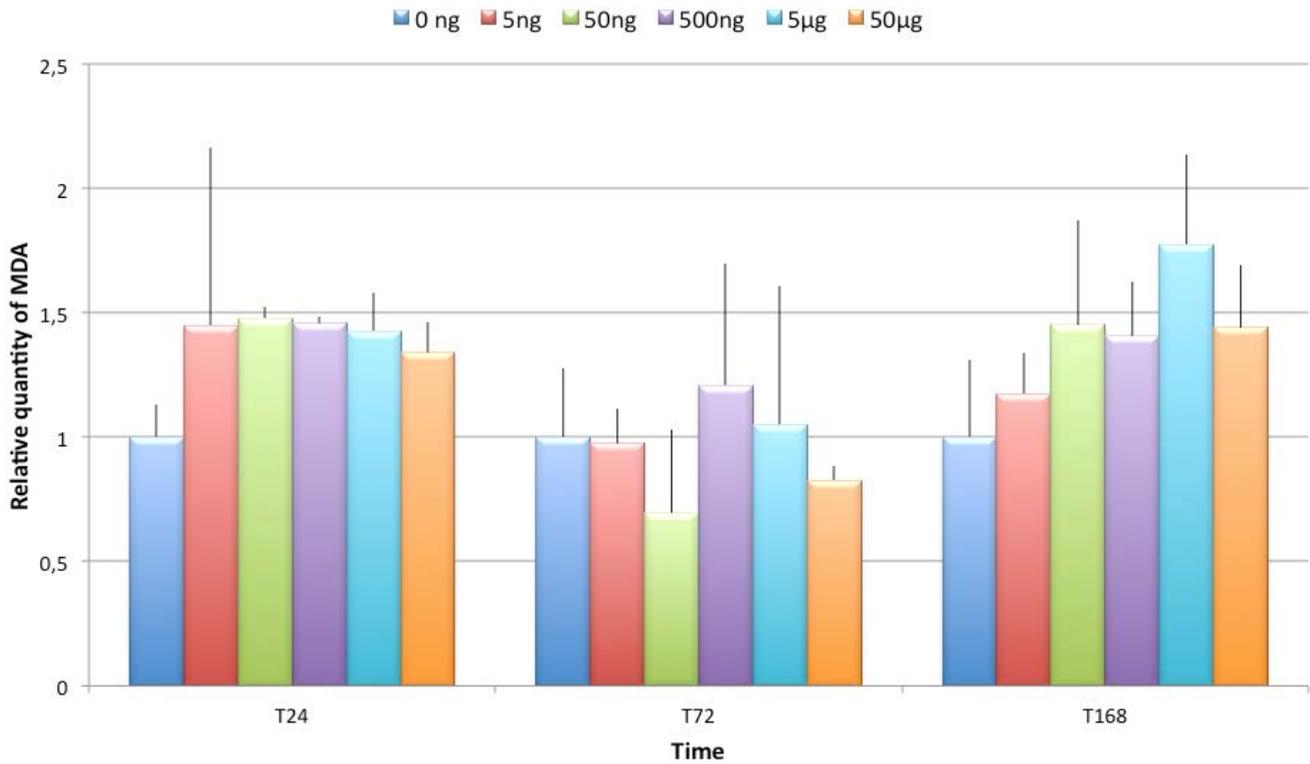
Our study showed that the iron nanoparticles at concentrations tested had a limited impact on *Physcomitrella patens* following a short-time exposure. After the internalization, the Fe-NP could interact with the intracellular medium and cause cytotoxic effects and/or oxidative stress. Moreover, despite the nanoparticle penetration, the only trends which emerged after short-time exposure, were statistically insignificant.

First, we used ATP in order to determine the health of plants. Adenosine-5'-triphosphate (ATP) is an energy-rich metabolite of fundamental importance in all organisms. ATP is usually viewed as a key substrate and co-factor in a wide range of intracellular biochemical and signalling processes (Chivasa et al., 2009). We did not observe a decrease of ATP quantity in *Physcomitrella patens* plants exposed to Fe-NP. Unlike Oukarroum et al. (2012), we did not see a degradation of the general state of our plants. However, we observed a slight increase of ATP quantity after 1-h, 72-h exposure, and after 168-h exposure, we observed an increased of ATP quantity at the highest concentration ($p < 0.05$). It is arguable that the plant increase its production of energy to defend against contamination by implementing its defence systems.

To date, there are limited data on the ecotoxicological effects of iron nanoparticles on plants, particularly following atmospheric exposure. However, there are many studies focused on effects of various nanoparticles on different plants. The nanoparticle-induced ROS generation and its potential damage to protein and lipid in tissues have been less studied (Zhao et al., 2012b).

Chapitre 4. Les effets écotoxiques des nanoparticules de fer chez *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.

Fig 58. Oxidative stress biomarkers formation in *Physcomitrella patens* plants non-exposed and



exposed to increased concentration of Fe-NP after 24 h (1 day), 72 h (3 days) and 168 h (7 days). A. Malondialdehyde - B. Glutathione status. All values are relative quantity means \pm SD (n = 3). * p < 0,05 vs non-exposed

Many authors have highlighted an ROS increase in several plant species following exposure to different nanoparticles, as Faisal et al. (2013) with NiO-NPs on tomato seeds, as Oukarroum et al. (2012) on *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*, as Oukarroum et al. (2013) with AgNPs on the aquatic plant *Lemna gibba*, as Zhao et al. (2012b) with CeO₂-NPs on corn. Moreover, there is ample evidence that exposure of plants to excess concentrations of redox active heavy metals such as Fe and Cu results in oxidative stress (De Vos et al., 1992; Gallego et al., 1996; Weckx and Clijsters, 1996; Mazhoudi et al., 1997; Yamamoto et al., 1997).

In contrast to these studies, in our exposure conditions, we observed a slight increase of ROS after 1-h and 72-h exposure. These slight effects observed, were, perhaps, due to Fe and OH ions, present on the nanoparticle surface and that were able to pass into suspension. But these effects are limited because the dispersion medium is relatively inert regarding the corrosion of iron nanoparticles. However, after an 168-h exposure, a ROS/RNS production was observed ($p < 0.05$). Rico et al. (2013) studied the effects of cerium oxide nanoparticles (nanoCeO₂) on rice, and also showed that relative to the control, the 62.5 and 125 mg.l⁻¹ of nanoCeO₂ (low nanoCeO₂ concentrations) decreased the H₂O₂ content by 74–79%, whereas the 250 and 500 mg.l⁻¹ of nanoCeO₂ (high nanoCeO₂ concentrations) did not significantly change the H₂O₂ content. They hypothesized that nanoCeO₂ played rather a protective role. Moreover, Thwala et al. (2013) studied the oxidative toxicity of silver (nAg) and of zinc oxide (nZnO) nanoparticles concerning the aquatic plant *Spirodela punctata*. They showed few or no production of ROS/RNS following 4-d exposure to nAg and to nZnO. The increase of ROS was only visible to some concentrations after 14-d exposure for the two nanoparticle types. In most studies, the production of ROS is observed after a longer exposure time (Zhao et al., 2012b; Oukarroum et al., 2013; Thwala et al., 2013).

Studies concerning effects of nanoparticles on lipid peroxidation showed different results depending on the nanoparticles and biological models studied. Some authors highlighted a malondialdehyde (MDA) increase following nanoparticle exposure. Shaw and Hossain (2013) observed a MDA increase in rice leaves following a CuO nanoparticle exposure after 7 and 14 days. Oukarroum et al. (2012) showed on algal cells a significant increase of lipid peroxidation after 24-h exposure of AgNPs at 10 mg.ml⁻¹. The MDA dose-dependent increase supports the recent findings of Wang et al. (2011), who have reported that *Lolium perenne* and *Cucurbita pepo* roots grown in the presence of magnetite Fe₃O₄ nanoparticles exhibited 218% and 259% increases in lipid peroxidation over control, however, a much greater concentration of 100 mg.l⁻¹ of Fe₃O₄ nanoparticles was used (Faisal et al., 2013). However, in our study, as a whole, no membrane damage was demonstrated (no significant increase of MDA) after exposure to iron nanoparticles. Similarly, Zhao et al. (2012b) also showed that none of the CeO₂ nanoparticle treatments on corn produced significant changes in lipid peroxidation in either roots or shoots. Rico et al. (2013) obtained similar results following a cerium oxide nanoparticle exposure of rice roots, but they observed an increase of lipid

peroxidation in rice shoots after an exposure to 500 mg.l⁻¹ (but not at low doses). Ghosh et al. (2010) highlighted that the MDA concentration obtained from the TiO₂ nanoparticles treated *Allium cepa* roots showed an initial increase in concentration of MDA with a concentration of 4 mM followed by a decrease for the highest concentration of 10 mM.

Finally, following a heavy metal exposure, the plants can increase their anti-oxidative protection to combat the negative consequences of heavy metal stress. The role of glutathione in the anti-oxidative defence system provides a rationale for its use as a stress marker (Tausz et al., 2004). In most case, heavy metal exposure initially resulted in a severe GSH depletion as highlighted by Schutzendüdel and Polle (2002) after Fe, Cu and Cd exposure on sunflower leaves. In our study, the quantity of GSH was not different compared to the control. Therefore, GSH baseline levels in *Physcomitrella patens* appear sufficient to defend the organism against Fe-NP exposure at the doses used. Moreover, we observed a GSSG/GSH ratio decrease for low and medium concentrations at each exposure time. We may attribute this phenomenon to an “over-compensation” (Tausz et al., 2004), that may occur in longer-term responses, which could lead to more reduced glutathione in stress-adapted plants due to strong activation of the defence cycle. This over-compensation may be related to over-expression of the *glutathione reductase* gene (not shown here).

To conclude, we wanted to work with environmentally realistic concentrations, often weaker than the concentrations used in articles (Faisal et al., 2013). Our research allowed us to verify the intracellular penetration of Fe-NP after foliar exposure, which may induce intracellular damage. Following our experiments, we observed ROS/RNS overproduction in *Physcomitrella patens* for both the longest time period and the highest doses, but without membrane damage. Concerning the ATP level, we demonstrated an increase for the longest time and highest dose. But, in general, the Fe-NP at environmentally concentrations were non-cytotoxic. Finally, ROS/RNS production did not induce glutathione status modulation. Indeed, the glutathione pool was maintained thanks to rapid regeneration of GSSG to GSH (over-compensation). Due to the properties of iron nanoparticles and their agglomeration, it would be interesting to study the penetration mechanisms of agglomerates and their kinetics. As Oukarroum et al. (2013), we could observe that our spherical Fe-NP formed agglomerates rapidly in water (the exposure medium) even after a sonication step. This Fe-NP agglomeration could also be observed in the *Physcomitrella patens* leaves. With this agglomeration, penetration may be delayed and therefore the effects too. Finally, we can confirm as some authors have that nanoparticle impact of depends on the size and/or the shape of the particles, the applied concentrations, but especially the specific conditions of experiments, and more importantly the plant species studied (Lin and Xing, 2007; Eichert et al., 2008).

2.1.5. Acknowledgements

The laboratory participates in the Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI) which is financed by the Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and European Regional Development Fund (ERDF).

The ADEME (the French Agency for Environment and Energy) is acknowledged for their financial support.

We are grateful to Meryem Tardivel of the BICeL- Campus Lille 2 IMPRT Facility for access to instruments and technical advice.

We thank Didier Betbeder for access to the Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments) and the Ecole des Mines in Douai for the determination of specific surface areas of iron nanoparticles.

We thank Damien Cuny and Guillaume Garçon for internal reviewing and Suzanna Scott for English reviewing.

The authors declare no competing financial interests.

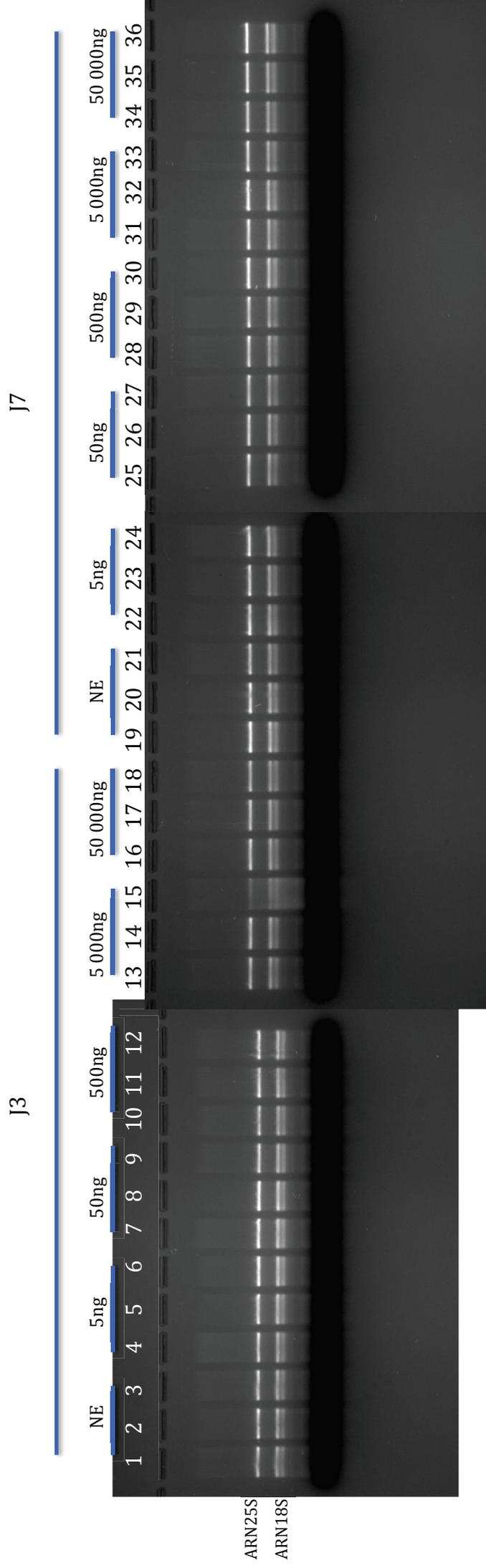


Fig. 59 : Electrophorégramme d'ARN montrant la qualité des ARNs extraits des gamétophytes de *Physcomitrella patens* après une exposition ou non aux Fe-NP - 1-18 : échantillons après 3 jours d'exposition (J3) - 19-36 : échantillons après 7 jours d'exposition (J7) - 1-3 et 19-21 : échantillons non exposés (NE) - 4-6 et 22-24 : échantillons exposés à 5 ng/plant (5ng) - 7-9 et 25-27 : échantillons exposés à 50 ng/plant (50ng) - 10-12 et 28-30 : échantillons exposés à 500 ng/plant (500ng) - 13-15 et 31-35 : échantillons exposés à 5 000 ng/plant (5 000ng) - 16-18 et 34-36 : échantillons exposés à 50 000 ng/plant (50 000ng).

2.2. La modulation de l'expression génique

Nous avons tout d'abord vérifié la qualité et l'intégrité des ARN extraits. Les résultats sont donnés dans la figure 59. Nous pouvons observer que les ARN extraits sont de très bonne qualité, à l'exception de l'échantillon 15 (échantillon exposé à 5 µg/plant de nanoparticules de fer pendant 3 jours). Cependant, les bandes des ARN 25S et 18S sont encore bien visibles ce qui suggère que la qualité est quand même acceptable.

Afin de compléter nos travaux, nous avons recherché les possibles effets des nanoparticules sur la modulation de l'expression de trois gènes : la monodéhydroascorbate réductase (3 isoformes : MDHAR 1, MDHAR 2 et MDHAR 3), la glutathion réductase (2 isoformes : GR56A et GR127A) et l'ascorbate peroxydase (4 isoformes : APX80A, APX82A, APX86A et APX255A).

Nos résultats ne montrent pas de modulation significative de ces différents gènes dans le cadre des expositions que nous avons réalisées (tableau 18). Cependant, nous pouvons observer que l'expression des isoformes appartenant à la même famille de gènes est modulée de manière similaire. L'expression des glutathions réductases (GR) a été globalement augmentée après 3 jours d'exposition, surtout pour les faibles concentrations en Fe-NP, mais elle a été plutôt diminuée après 7 jours d'exposition.

Tab. 18 : Modulation de l'expression des gènes d'intérêt étudié chez *Physcomitrella patens* après une exposition à des Fe-NP - 1/RQ en rouge ou RQ en vert mettant en évidence, respectivement, une sous-expression du gène (↘) ou une surexpression du gène (↗) - J3 : 3 jours d'exposition - J7 : 7 jours d'exposition - MDHAR : monodéhydroascorbate réductase - APX : ascorbate peroxydase - GR : glutathion réductase

	Dose d'exposition	MDHAR 1	MDHAR 2	MDHAR 3	APX86A	APX80A	APX82A	APX255A	GR56A	GR127A
J3	5ng/plant	↗ 1,06	↘ 1,07	↘ 1,30	↗ 1,01	↗ 1,10	↗ 1,26	↗ 1,20	↗ 1,23	↗ 1,62
	50ng/plant	↗ 1,29	↘ 1,10	↘ 1,23	↘ 1,09	↗ 1,19	↗ 1,85	↗ 1,30	↗ 1,78	↗ 1,94
	500ng/plant	↘ 1,34	↘ 1,51	↘ 1,44	↘ 1,56	↘ 1,09	↗ 1,03	↗ 1,10	↗ 1,29	↗ 1,13
	5ug/plant	↘ 1,28	↘ 1,33	↘ 1,45	↘ 1,32	↘ 1,34	↘ 1,28	↘ 1,01	↗ 1,13	↘ 1,02
	50ug/plant	↘ 1,52	↘ 1,45	↘ 1,83	↘ 1,40	↘ 1,15	↗ 1,03	↗ 1,09	↗ 1,08	↗ 1,03
J7	5ng/plant	↘ 1,54	↘ 1,47	↘ 1,47	↘ 1,53	↘ 1,56	↘ 1,40	↘ 1,33	↘ 1,10	↘ 1,57
	50ng/plant	↘ 1,17	↘ 1,01	↘ 1,01	↘ 1,24	↘ 1,41	↘ 1,19	↘ 1,11	↗ 1,01	↘ 1,26
	500ng/plant	↘ 1,58	↘ 2,08	↘ 2,08	↘ 2,41	↘ 2,38	↘ 2,24	↘ 1,97	↘ 1,25	↘ 2,06
	5ug/plant	↘ 1,17	↘ 1,51	↘ 1,51	↘ 1,71	↘ 1,59	↘ 1,51	↘ 1,20	↘ 1,07	↘ 1,22
	50ug/plant	↘ 1,32	↘ 1,30	↘ 1,30	↘ 1,61	↘ 1,49	↘ 1,62	↘ 1,13	↘ 1,47	↘ 1,58

Si nous émettons comme hypothèse de travail que la surexpression de ces isoformes entraîne une augmentation de la production de la protéine traduite, l'évolution des résultats obtenus lors de cette expérimentation pourraient correspondre à celle obtenue avec le ratio GSSG/GSH (inversement proportionnel) après 3 jours d'exposition (figure 60 ; chap 4.2). Cela pourrait correspondre au phénomène de sur-compensation décrit par Tausz *et al.* en 2004.

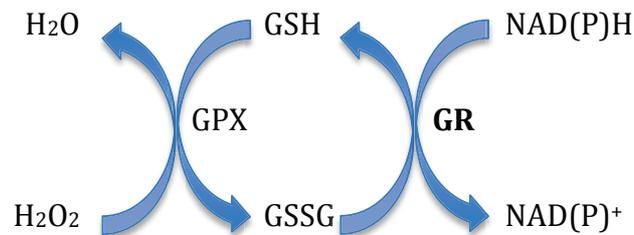


Fig. 60 : Action de la glutathion réductase (GR). Une augmentation de GR entraîne une augmentation de la transformation de GSSG en GSH et donc une augmentation de GSH et par voie de conséquence une diminution du ratio GSSG/GSH.

Concernant les isoformes de la monodehydroascorbate reductase (MDHAR) et de l'ascorbate peroxydase (APX), les protéines traduites par ces gènes ont des activités complémentaires comme le présente la figure 61. Même si les résultats sont non significatifs, nous avons pu dégager des tendances :

- ❖ après 3 jours d'exposition, une légèrement augmentation de l'expression des gènes codant pour les APX82A, APX255A et APX80A et une diminution de l'expression des gènes codant pour l'APX86A et les MDHAR1, MDHAR2 et MDHAR3 ;
- ❖ après 7 jours d'exposition, l'expression de tous ces gènes diminue.

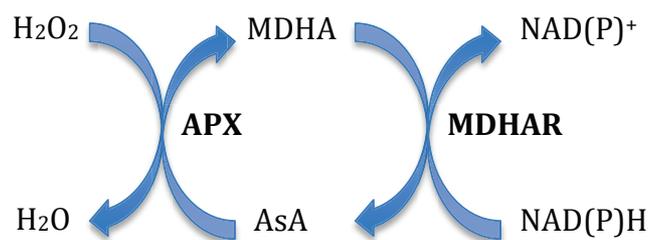


Fig. 61 : Action de l'ascorbate peroxydase (APX) et de la monodehydroascorbate réductase (MDHAR) – MDHA : monodehydroascorbate – AsA : ascorbate

Face à ces résultats, nous pouvons penser que malgré les légères modulations des gènes relatifs aux MDHAR, APX et GR, les plants de *Physcomitrella patens* possèdent des niveaux de base d'antioxydants suffisamment importants pour compenser les effets du stress oxydant induit par une exposition à des doses faibles de nanoparticules de fer.

2.3. La génotoxicité

2.3.1. Les adduits à l'ADN

Pour évaluer la génotoxicité des Fe-NP, nous nous sommes intéressés à la formation d'adduits à l'ADN, notamment à la 8-OHdG. La figure 62 présente les résultats obtenus après 3 jours et 7 jours d'exposition. Une première analyse nous permet de mettre en évidence une tendance à l'augmentation de la 8-OHdG au niveau des gamétophytes de *Physcomitrella patens* exposés à 50 ng, 5 µg et 50 µg de nanoparticules par plant après 3 jours d'exposition. Cette augmentation est significative pour la dose la plus importante. Cette tendance à l'augmentation de la quantité de 8-OHdG a aussi été observée pour les échantillons exposés pendant 7 jours à 50 ng et 5 µg de nanoparticules par plant. En revanche, pour les échantillons exposés à 50 µg par plant, la quantité de 8-OHdG est redescendue au niveau des échantillons témoins. De par ces résultats, le stress oxydant induit par les nanoparticules peut engendrer la formation d'adduits à la plus forte concentration testée. A 7 jours, les résultats ne sont pas significatifs. Il est possible que la sensibilité du test dans le cadre de notre expérimentation soit trop faible et il pourrait être intéressant d'augmenter la sensibilité de l'essai.

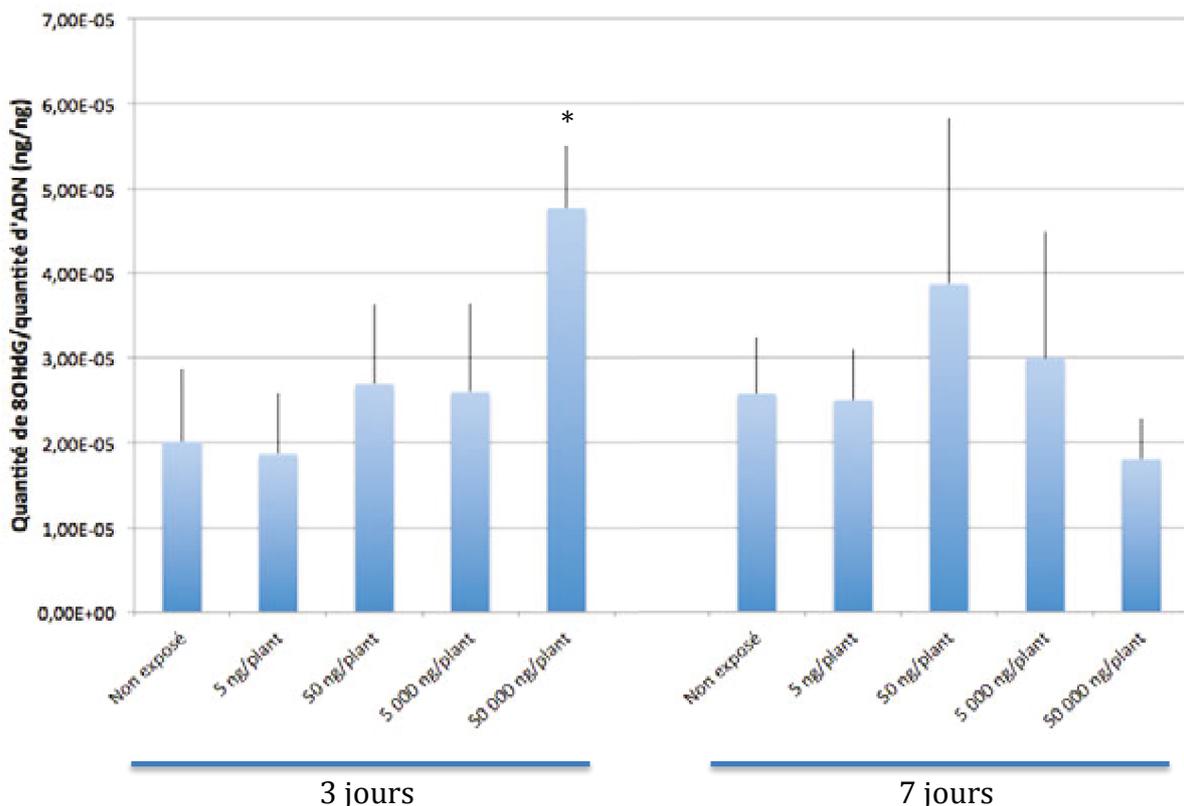


Fig. 62 : Evolution de la quantité moyenne (\pm écart type) d'adduit à l'ADN (8-OHdG) au niveau de gamétophytes de *Physcomitrella patens* exposés à des concentrations croissantes de nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC. ANOVA one way suivi d'un test *post hoc* de Dunett - * $p < 0,05$ par rapport au non exposé (n=3)

A notre connaissance, aucune étude sur la formation de 8-OHdG au niveau de végétaux exposés à des nanoparticules n'a été publiée. Les études de génotoxicité réalisées sur les nanoparticules et les végétaux utilisent d'avantage le test des comètes (Ghosh *et al.*, 2010 ; Panda *et al.*, 2011 ; Ghosh *et al.*, 2012) ou le test micronoyaux (Panda *et al.*, 2011 ; Patlolla *et al.*, 2012). Les études de génotoxicité ont montré que des nanoparticules d'argent causaient une altération de l'ADN des racines d'*Allium cepa* par la réalisation du test comètes (Panda *et al.*, 2011) mais aussi par le test micronoyaux (Panda *et al.*, 2011 ; Patlolla *et al.*, 2012). Des études ont également mis en évidence une génotoxicité des nanoparticules d'argent sur *Allium cepa* et *Nicotiana tabacum* mais en montrant un effet plus important sur les racines que sur les feuilles (Ghosh *et al.*, 2012), témoignant probablement de leur capacité de pénétration plus important au niveau racinaire. Enfin, en 2010, Ghosh *et al.* ont montré que des nanoparticules de TiO₂ avaient des effets plus notables sur *Allium cepa* que *Nicotiana tabacum*. Ces résultats confirment que selon leur composition, les effets peuvent être différents pour une même espèce mais également selon les espèces biologiques exposées. Ceci montre bien l'importance de la caractérisation des nanoparticules et du choix des espèces modèles et sentinelles utilisées.

2.3.2. Le développement du test des comètes

Afin d'approfondir nos recherches concernant la mise en évidence d'effets génotoxiques des Fe-NP chez *Physcomitrella patens*, nous avons souhaité développer le test des comètes. A notre connaissance, ce test n'a jamais été mis au point chez les bryophytes.

Pour cela, nous avons effectué nos essais sur deux types de tissus végétaux, d'une part sur gamétophytes et d'autre part sur le protonéma de *Physcomitrella patens* (cellules indifférenciées). Le protocole présenté dans le chapitre 2 est celui qui nous a permis d'obtenir les résultats les plus intéressants. Cependant, avant de présenter les résultats finaux, il est important de faire rapidement le point sur la genèse du développement de cette technique. Dans un premier temps, à l'aide des compétences développées au sein de notre laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques chez les végétaux supérieurs et de celles du laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille pour l'animal et l'homme, nous avons identifié et testé quatre étapes essentielles du protocole et déterminé de quelle manière elles pouvaient être optimisées :

- ❖ la prise de biomasse de départ,
- ❖ la méthode de broyage des échantillons,
- ❖ le temps de déroulement et d'électrophorèse,
- ❖ le pH de la solution d'électrophorèse.

Nous avons, pour la première fois pu observer des images de « comètes » (figures 63.A, 63.B, 63.C) témoignant d'une dégradation de l'ADN des noyaux de *Physcomitrella patens* au niveau des échantillons (gamétophytes et protonéma) exposés ou non au cadmium.

Cependant, aucun noyau intact n'avait pu être observé même au niveau des échantillons non exposés. De nouvelles hypothèses ont été émises afin de déterminer les éventuelles causes de cette dégradation de l'ADN : les méthodes de broyage et /ou le pH très alcalin (pH>13). En effet, le pH très alcalin (pH>13) pourrait endommager l'ADN de nos végétaux ; c'est pourquoi nous avons voulu faire un test comète à pH 7 couplé au différentes méthodes de broyage. Cependant, selon le pH auquel il est réalisé (pH 7 ou pH 13), le test des comètes ne nous donne pas les mêmes informations sur la génotoxicité du polluant. A pH 7, seule la détection des cassures doubles brins est possible. En revanche, à pH 13, nous sommes capables de détecter non seulement les cassures simple-brin, mais aussi les sites alcali-labiles, et les sites de cassures transitoires découlant de processus de réparation de l'ADN (Singh *et al.*, 1988).

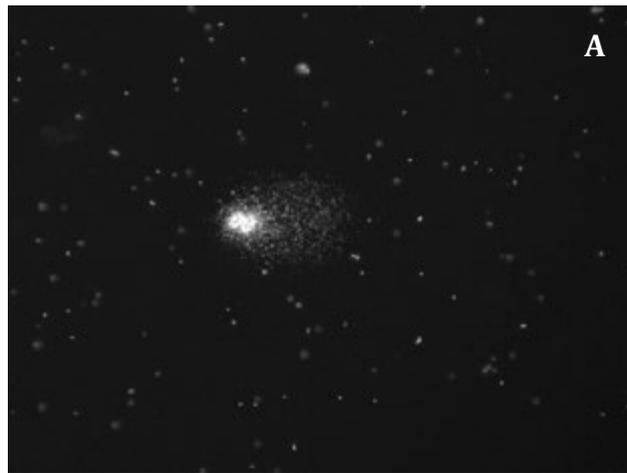
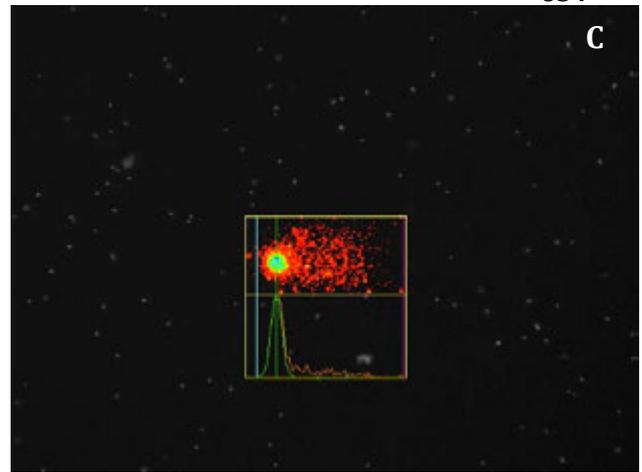
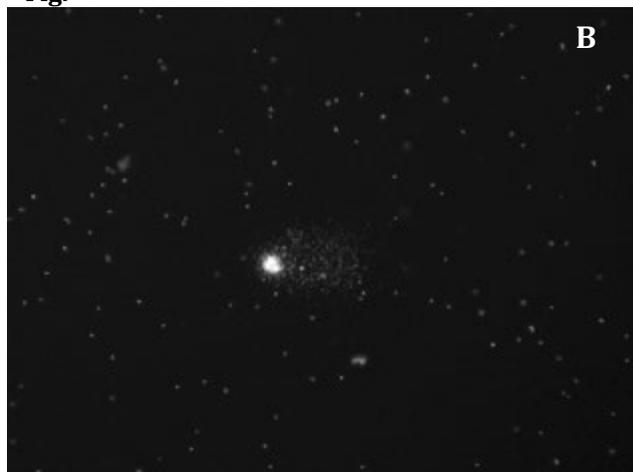


Fig.

63 :



Photos de noyaux observés lors du développement du test des comètes au niveau de gamétophytes et de protonéma de *Physcomitrella patens*. A. Comète observée dans les conditions d'un protocole à pH 13, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage à la médimachine (objectif x50) - B. Comète observée dans les conditions d'un protocole à pH 13, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage à la médimachine (objectif x50) - B. Même image de comète observée et pointée à l'aide du logiciel COMET IV - D. Noyaux intacts observée dans les conditions d'un protocole à pH 7, sur gamétophytes non exposé, avec un broyage au rasoir (objectif x40) - E. Noyaux intacts observée dans les conditions d'un protocole à pH 7, sur protonéma non exposé, avec un broyage au rasoir (objectif x40) (Photos L. Canivet, 2012).

Finale­ment, nos derniers essais nous ont permis d'observer des noyaux intacts au niveau d'échantillons non exposés à pH 7 quel que soit le tissu ou la méthode de broyage utilisés (figures 63.D et 63.E). A pH 13, quasi aucun noyau intact n'a pu être observé sauf un ou deux au niveau d'échantillons de protonéma broyés par écrasement. Le pH 13 aurait donc un effet sur la dégradation des noyaux de *Physcomitrella patens*. Or, comme nous avons pu le voir, un test des comètes réalisé à pH 13 apporte plus d'informations sur la génotoxicité des produits testés. Ainsi, pour vérifier nos résultats et tenter de limiter les effets du pH 13 sur la formation de comètes, de nouveaux essais doivent être réalisés en prenant certaines précautions au moment de la préparation des échantillons et en changeant certains paramètres comme le tampon d'extraction.

3. Bilan du chapitre 4

Dans ce quatrième chapitre, nous avons étudié l'internalisation des Fe-NP au sein des cellules de *Physcomitrella patens* suite à une exposition par voie aérienne au niveau des gamétophytes ainsi que leurs effets cytotoxiques, sur le stress oxydant, sur la modulation de l'expression de gènes et génotoxiques.

Notre première étude a permis de démontrer la pénétration foliaire des Fe-NP, même agglomérées, au niveau des gamétophytes de *Physcomitrella patens* exposés par dépôt humide à des concentrations faibles qui se veulent proches de celles de l'environnement.

Nos travaux ont permis d'étudier la capacité des Fe-NP à induire :

- ❖ des effets cytotoxiques et un stress oxydatif ;
- ❖ une modulation de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant ;
- ❖ des effets génotoxiques.

Bien que les Fe-NP aient induit des ROS/RNS à certaines concentrations, l'intégrité des cellules de *Physcomitrella patens* ne semble pas être impactée. En effet, il semblerait que les systèmes de défense antioxydants dont le glutathion fait partie soient suffisamment efficaces pour compenser le stress induit

De même, l'expression de gènes impliqués dans la lutte contre stress oxydant comme les monodéhydroascorbates réductases, les glutathions réductases et les ascorbates peroxydases a été légèrement modulée suite à une exposition aux concentrations de Fe-NP étudiées.

Des effets génotoxiques correspondant à la présence de 8-OHdG ont été observé à la plus forte dose testée après 3 jours d'exposition. Mais cette génotoxicité n'est pas confirmée à 7 jours, vraisemblablement, à cause du manque de sensibilité du test employé.

Afin de compléter l'étude sur la génotoxicité des nanoparticules chez les mousses, nous avons commencé à développer le test des comètes qui prochainement sera finalisé.

4. Références bibliographiques

- Ashton, N.W. & Cove, D.J.** 1977. The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular Genetics and Genomics*, 154: 87-95.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., DeMeo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R. & Bottero, J.Y.**, 2006. *In Vitro* Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxicity Study. *Environ. Sci. Technol.*, 40(14): 4367-4373.
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X, Sanchez, A. & Puntès V.** 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75: 850–857.
- Battke, F., Leopold, K., Maier, M., Schidhalter, U. & Schuster, M.** 2008. Palladium exposure of barley uptake and effects. *Plant biology*, 10: 272-276.
- Briggs, D. & Seah, M.P. ed.** 1990. Practical Surface Analysis. Volume 1. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy. John Wiley and Sons; Chichester, 657 p.
- Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E.** 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 309-319.
- Canivet, L. & Denayer, F.O.** 2011. Staining of protonemal cells of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. For better highlighting micronuclei in bryophytes. *Cryptogamie, Bryologie*, 32(3): 211-220.
- Canivet, L., Dubot, P. & Denayer, F.O.** 2014. Atmospheric foliar iron engineered nanoparticle uptake by *Aphanorhagma patens* (Hedw.) Lindb. *Journal of Bryology*, article accepted.
- Card, J.W. & Magnuson, B.A.** 2010. A Method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology*, 29(4): 402-410.
- Champion, Y. & Bigot, J.** 1996. Preparation and characterization of nanocrystalline copper powders. *Scripta Mater*, 34: 517-522.
- Chivasa, S., Murphy, A.M., Hamilton, J.M., Lindsey, K., Carr, J.P. & Slabas, R.** 2009. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *The Plant Journal*, 60: 436-448.

- Cove, D. & Quatrano, R.S.** 2006. Agravitropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* do not complement mutants having a reversed gravitropic response. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1379-1387.
- Denayer, F.O.** 2000. Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes, Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. PhD thesis, Université de Metz.
- De Vos, R.C.H., Vonk, M.J., Vooijs, R. & Schat, H.** 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology*, 98: 853-858.
- Dietz K.J. & Herth S.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11): 582-589.
- Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R. & Betbeder D.** 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*, 21(35): 355102.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. & Goldbach, H.E.** 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiology Plant*, 134: 151-160.
- Faburé, J., Meyer, C., Denayer, F., Gaudry, A., Gilbert, D. & Bernard, N.** 2010. Accumulation capacities of particulate matter in an acrocarpous and a pleurocarpous moss exposed at three differently polluted sites (industrial, urban and rural). *Water Air Soil Pollution*, 212: 205-217.
- Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A.A., Al-Khedhairi, A.A., Hegazy, A.K. & Musarrat J.** 2013. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. *Journal of Hazardous Materials*, 250– 251: 318– 332
- Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J. & Lin, X.** 2013. The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environmental Science and Technology*, 47: 9496-9504.
- Fernandez, V. & Eichert, T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews Plant Sciences*, 28: 36–68.
- Fleischer, A., O'neill, M.A. & Ehwald, R.** 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell wall is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturan II. *Plant Physiology*, 121: 829–838.

- Gallego, S.M., Benavidesn M.P. & Tomaro, M.L.** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*. 121: 151-159.
- Gao, F.Q., Hong, F.H., Liu, C., Zheng, L., Su, M.Y., Wu, X., Yang, F., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Mechanism of nano-anatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach - Inducing complex of Rubisco-Rubisco activase. *Biological Trace Element Research*, 111(1-3): 239-253.
- Gao, F.Q., Liu, C., Qu, C.X., Zheng, L., Yang, F., Su, M.G. & Hong, F.H.** 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO₂ treatment related to the changes of Rubisco activase? *Biometals*, 21(2): 211-217.
- Garcon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E. & Shirali, P.** 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology In Vitro*, 20: 519-528.
- Garrec, J.P. & Van Haluwyn, C.** 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tech&Doc., Lavoisier.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10): 1253-1262.
- Ghosh, M., J, M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research*, 749: 60-69.
- Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Coronado, M.J., Corredor, E., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D. & Perezde-Luque, A.** 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101: 187-195.
- Hervé-Bazin, B.** 2007. Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?. EDP Sciences.
- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O. & Cervinkova Z.,** 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1382-1387.

- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z.R., Watanabe, F. & Biris, A.S.** 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10): 3221-3227.
- Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Nedosekin, D.A., Dervishi, E., Biris, A.S., Shashkov, E.V., Galanzha, E.I. & Zharov, V.P.** 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3): 1028-1033.
- Klancnik, K., Drobne, D., Valant, J. & Dolenc Koce, J.** 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 85-92.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q.A.** 2010. Complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3): 165-168.
- Kumari, M., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N.** 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of Total Environment*, 407 : 5243-5246.
- Lamaison, L.** 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. PhD. thesis, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Larue, C., Khodja, H., Herlin-Boime, N., Brisset, F., Flank, A.M., Fayard, B., Chaillou, S. & Carrière, M.** 2011. Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. *Journal of Physics: Conference Series*, 304: 1-7.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard B., Flank, A.M., Brisset, F. & Carriere, M.** 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*, 431: 197-208.
- Ledoux, L., Laversin, H., Courcot, D., Courcot, L., Zhilinskaya, E.A., Puskaric, E. & Abouhaï, A.** 2006. Characterization of iron and manganese species in atmospheric aerosols from anthropogenic sources. *Atmospheric Research*, 82: 622-632.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. and Stark, W.J.,** 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 39(23): 9370.

- Lin, D. & Xing, B.**, 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243–250.
- Lin, D. & Xing, B.** 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 42: 5580-5585.
- Lira, M.C.B., Santos-Magalhães, N.S., Nicolas, V., Marsaud, V., Silva, M.P.C., Ponchel, G. & Vauthier, C.** 2011. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1): 160-170.
- Ma, H., Phillip, L. Williams, P.L., Stephen, A. & Diamond, S.A.** 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H. & Ferjani, E.** 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Science*. 127: 129-137.
- Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure, J. & Bernard, N.** 2010. Relationship of atmospheric pollution characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to microbial communities living in bryophytes at three differently polluted sites (rural, urban, and industrial). *Microbial Ecology*, 59: 324–334.
- Moore, M.N.** 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32: 967–976.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D.** 2007. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.
- Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y. & Kumar, D.S.** 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179: 154-163.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H. & Sigg, L.** 2008. Environmental behaviour and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372–386.
- Navarro, D.A, Bisson M.A. & Aga, D.A.** 2012. Investigating uptake of water-dispersible CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles by *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212: 427-435.

- Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N.** 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.
- Nowack, B. & Bucheli, T.D.** 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150: 5–22.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7): 823-839.
- Oukarroun, A., Bras, S., Perreault, F. & Popovic, R.** 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 80–85.
- Oukarroun, A., Barhoumi, L., Pirastru, L. & Dewez, D.** 2013. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4): 902–907.
- Panda, K.K., Acharya, V. M.M., Krishnaveni, R., Padhi, B.K., Sarangi, S.N., Sahu, S.N. & Panda, B.B.** 2011. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 25(5): 1097-1105.
- Patlolla, A.K., Berry, A., May, L. & Tchounwou, P.B.** 2012. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9: 1649-1662.
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., & Gardea-Torresdey, J.L.** 2013. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and *in vivo* fluorescence imaging. *Environmental Science & Technology*, 47: 5635-5642.
- Ruffini Castiglione, M. & Cremonini, R.,** 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2): 161-165.
- Schutzendübel, A. & Polle, A.** 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- Shaw, A.K. & Hossain, Z.** 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, *in press*.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Tausz, M., Sircelj, H. & Grill, D.** 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, 55(404): 1955-1962.
- Thwala, M., Musee, N., Sikhwivhilu, L. & Wepener, V.** 2013. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environmental Science Processes & Impacts*, 15(10): 1830-1843.
- Tomasevic, M., Vukmirovic, Z., Rajsic, S., Tasic, M. & Stevanovic, B.** 2005. Characterization of trace metal particles deposited on some deciduous tree leaves in an urban area. *Chemosphere*, 61: 753-760.
- Tripathi, S.T.S., Sonkar, S.K. & Sarkar, S.** 2011. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3): 1176-1181.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M. & Dumat, C.** 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science and Technology*, 44: 1036-1042.
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J.Q., Shan, X. & Xing, B.** 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants, *Nanotoxicology* 5: 30-42.
- Weckx, J.E.J. & Clijster, H.M.M.** 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiologia Plantarum*, 96: 506-512.
- Yamamoto, Y., Hachia, A. & Matsumoto, H.** 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminium and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology*, 38: 1333-1339.
- Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., Liu, C., Gao, F.Q., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Influences of nanoanatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110(2): 179-190.
- Yang, F., Liu, C., Gao, F.Q., Su, M.Y., Wu, X., Zheng, L., Hong, F.S. & Yang, P.** 2007. The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂ treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research*, 119(1): 77-88.

- Zhang, S., Jiang, Y., Chen, C.S., Creeley, D., Schwehr, K.A., Quigg, A., Chin, W.C. & Santschi, P.H.** 2013. Ameliorating effects of extracellular polymeric substances excreted by *Thalassiosira pseudonana* on algal toxicity of CdSe quantum dots. *Aquatic Toxicology*, 126: 214– 223.
- Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Ren, M., Varela-Ramirez, A., Li, C., Hernandez-Viezcas, J.A., Aguilera, R.J. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2012a. Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies. *Chemical Engineering Journal*, 184: 1– 8.
- Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela-Ramirez, A., Zhang, J.Y. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2012b. Stress Response and Tolerance of Zea mays to CeO₂ Nanoparticles: Cross Talk among H₂O₂, Heat Shock Protein, and Lipid Peroxidation. *ACS NANO*, 6(11): 9615-9622.
- Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P. & Liu, C.** 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally and growth aged seeds of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104(1): 83-91.

**CHAPITRE 5 - LES EFFETS
TOXIQUES DES NANOPARTICULES
DE FER AU NIVEAU DE CULTURES
PRIMAIRES DE CELLULES
EPITHELIALES HUMAINES**

Chapitre 5. Les effets toxiques des nanoparticules de fer au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'interaction entre les nanoparticules de fer fabriquées par le MCMC de Thiais, notées Fe-NP et un modèle de cellules humaines. Comme les écosystèmes, l'Homme est susceptible d'être exposé aux particules et nanoparticules présentes dans l'air et notamment à des nanoparticules de fer. Une des questions que nous pouvons nous poser est : « Quels sont les effets des nanoparticules sur la santé humaine ? » Dans le cas d'une exposition atmosphérique, les nanoparticules pénètrent principalement l'organisme par inhalation. Nous avons donc souhaité évaluer la toxicité des Fe-NP sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de différents patients, afin de mimer au mieux leurs impacts sur les poumons. En effet, ce modèle cellulaire a le plus de similarités, en terme de transcriptome du métabolisme des xénobiotiques avec le tissu bronchique humain (Courcot *et al.*, 2012). Lors de cette étude, nous avons suivi une démarche similaire que celle employé pour l'étude des effets des nanoparticules sur *Physcomitrella patens*.

Ce chapitre se compose de deux parties. La première présente l'état d'avancement de notre méthode de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaine en interface air-liquide qui reste encore à optimiser ; la seconde montre les résultats de notre étude toxicologique des effets des nanoparticules de fer sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines qui a fait l'objet d'un article soumis dans *Toxicology in vitro*.

Dans cet article, après une caractérisation complète de nos nanoparticules dans les milieux d'exposition (chapitre 3) et la vérification de la pénétration dans les cellules pulmonaires, nous avons étudié la production d'espèces réactives de l'oxygène, la modulation de l'expression de gènes et des biomarqueurs du stress oxydatif (malondialdéhyde, glutathion réduit et oxydé). Nous avons ainsi pu observer une augmentation des espèces réactives de l'oxygène. En outre, malgré la modulation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation après une exposition de 6 h, les cellules semblent capables de compenser cette modulation après 24h et 48h. Cependant, les Fe-NP n'ont pas causé l'augmentation de malondialdéhyde et du ratio GSSG/GSH après plusieurs heures d'exposition.

1. La culture primaire de cellules épithéliales bronchiques

Durant cette thèse, nous avons développé un modèle de culture *in vitro* représentatif du tissu bronchique humain. Nous nous sommes intéressés à la culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines en interface air-liquide. Après avoir défini un protocole de culture (cf chapitre 2), nous avons caractérisé nos cultures après leur mise en interface air-liquide. Pour cela, nous avons étudié l'évolution morphologique des cultures par des colorations PAS et nous avons analysé l'expression du gène de la MUC5AC, témoin d'une différenciation cellulaire.

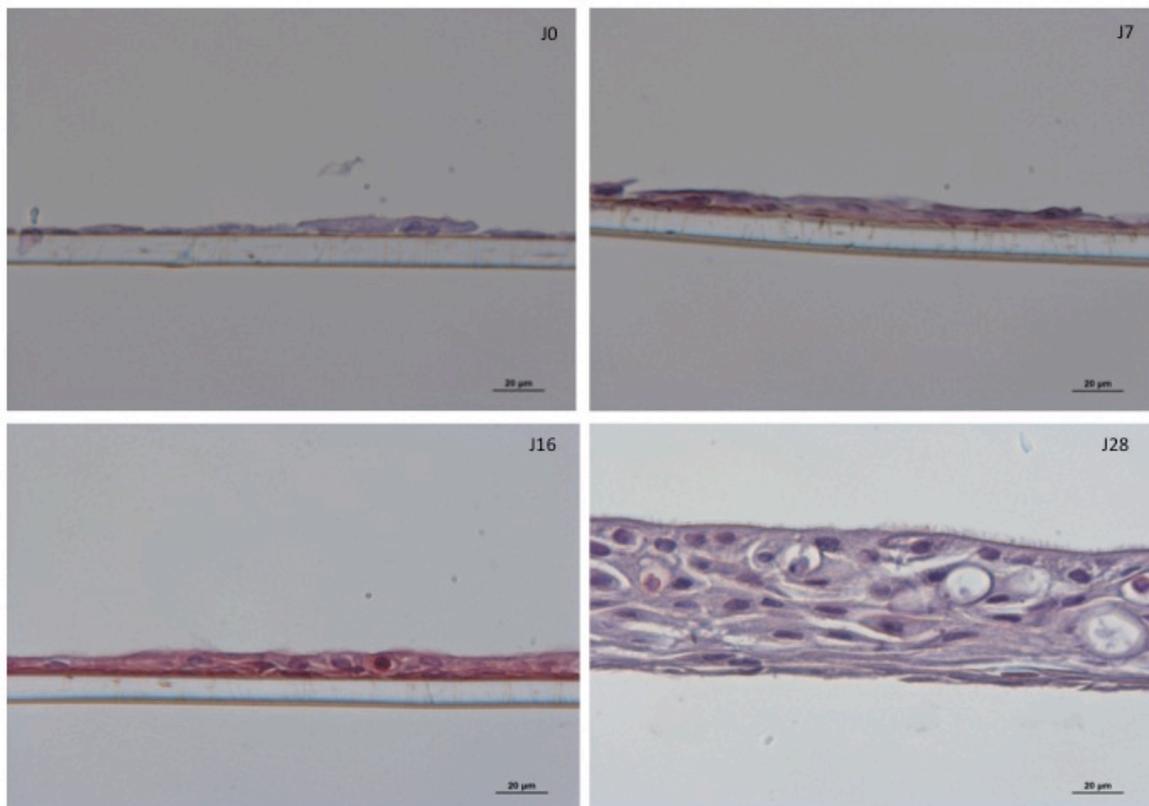


Fig. 64 : Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques cultivées en interface air-liquide, le jour de la mise en interface air-liquide (J0) et après 7 jours, 16 jours et 28 jours de culture en interface air-liquide (J7, J16 et J28) grossissement x60, Nikon Eclipse Ti-U microscope.

Nos résultats préliminaires montrent une modification morphologique des cellules au cours du temps ainsi qu'une surexpression du gène de la MUC5AC au niveau des cultures primaires de cellules issues de différents patients. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'épaisseur du tapis cellulaire au cours du temps. En effet, au moment de la mise en interface air-liquide, les cultures avaient une épaisseur moyenne de 5 μm , puis d'environ 13 μm après 7 jours de culture en interface air-liquide et d'environ 60 μm après 28 jours de culture (figure 64), ce qui témoigne aussi du passage d'un état monostратifié à un état pluristratifié. La coloration PAS nous a aussi permis de mettre en évidence une coloration pourpre de certaines cellules suggérant une sécrétion de mucus.

Parallèlement, nous avons montré, par RT-PCR en temps réel, une augmentation de l'expression du gène de la MUC5AC au cours du temps après la mise en interface air-liquide. En effet, ce gène est jusqu'à 3 500 fois plus exprimé après 28 jours de culture par rapport au jour de la mise en interface air-liquide suggérant ainsi que les cellules cultivées ainsi sécrètent d'avantage de mucine (MUC5AC).

Cependant, nous n'avons pas réussi à valider la reproductibilité de notre méthode. En fonction des patients donateurs, une souffrance plus ou moins rapide des cellules a été observée au cours du temps. Ce problème nous a donc contraint à travailler avec des cultures en culture classique afin de ne pas biaiser nos études sur les effets des nanoparticules de fer sur les cellules épithéliales bronchiques humaines.

2. Article 4. Effects of iron nanoparticles on primary cultures of lung cells.

Ludivine Canivet, Université de Lille 2, EA4483, Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Franck-Olivier Denayer, Université de Lille 2, EA4483, Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Pierre Dubot, CNRS, Métaux et céramiques à microstructure contrôlée (MCMC), Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est, UMR 7182, Thiais

Guillaume Garçon, Université de Lille 2, EA4483, Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Jean-Marc Lo-Guidice, Université de Lille 2, EA4483, Faculté de Médecin – Pôle Recherche - Place Verdum – 59045 Lille, France

Abstract. In industrial areas, the proportion of anthropogenic nanoparticles in the atmosphere increased with the use by industries of more efficient filters, retaining the fine particles. In particular, numerous studies have shown a significant proportion of iron in atmospheric particles and nanoparticles. Many studies on pulmonary nanotoxicity were conducted on lung cell lines: A549 cells (cancerous cells) and in BEAS-2B (lines cells).

The aim of the present work was to study the effects of iron-engineered nanoparticles on primary lung cells, assessing their cytotoxicity, their capacity to modulate the gene expression and oxidative stress.

After a global characterization of the Fe-NP, our study showed their cellular penetration in lung primary cells and their cytotoxicity. Using low doses environmentally, we highlighted a modulation of gene expression involved in inflammation after 6-h exposure but we failed to detect a significant induction of oxidative stress.

Key words: iron nanoparticles, primary cultures, human bronchial epithelial cells, gene expression and oxidative stress

2.1. Introduction

Nanoparticles are commonly defined as particle matter having at least one dimension under 100 nm. The terminology of nano-sized materials is variable. Engineered nanoparticles with clear chemical characteristics need to be distinguished from ambient nanoparticles (natural and anthropogenic) of varying constituents. According to Oberdörster *et al.* (2005), the terms nano-sized particles (NSP) can be used for all engineered and ambient nanoparticles, nanoparticles (NP) for engineered nanoparticles and ultrafine particles (UFP) for ambient nanoparticles. With the development of nanotechnologies, there is an increased risk of NP release in the environment. In particular, Fe-NP can be used for the remediation of deep water (Wei-Xian *et al.*, 2003. Lowry *et al.*, 2004) and for the treatment of surface waters and effluents (Hu *et al.*, 2005. Uheida *et al.*, 2006). In parallel, the industrial fallouts of particle matter represent an important source of atmospheric pollution (Meyer *et al.*, 2010; Ledoux *et al.*, 2006; Garçon *et al.*, 2006). These particles emitted in the environment have a large variety of size. In recent decades, the proportion of fine particle matter has increased with the use of more efficient filters in industry (Muller *et al.*, 2007), retaining the fine particles but not the nanoparticles. In 2006, Garçon *et al.* highlighted that 33% of particles are less than 500 nm in size and consequently they demonstrated the presence of metallic nanoparticles in the industrial atmosphere with an important presence of iron, confirmed in other studies (Ledoux *et al.*, 2006; Garçon *et al.*, 2006; Lamaison, 2006).

In case of exposure, airborne nanoparticles (UFP) mainly penetrate the body by inhalation. They are deposited in the lungs and can cause some lung injuries (inflammation, bronchial hyper-reactivity, tissue remodeling, etc.) and even contaminate the bloodstream (Oberdorster *et al.*, 2004; Witschger and Fabriès, 2005 ; Brandenberger *et al.*, 2010 ; Patil *et al.*, 2012 ; Petitot *et al.*, 2013 ; Suliman *et al.*, 2013). Different authors highlighted the penetration of nanoparticles into lung cells lines (Muhlfeld *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Konczol *et al.*, 2011). More specifically, Bhattacharya *et al.* (2012) showed the penetration of iron nanoparticles ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$) into the immortalized bronchial epithelial cells BEAS-2B. In the majority of these studies, the exposure to nanoparticles induced the production of reactive oxygen species (ROS) (Keenan *et al.*, 2009; Eom and Choi, 2011; Kim *et al.*, 2011; Bhattacharya *et al.*, 2012; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012). The ROS as well as reactive nitrogen species (RNS) production secondary to nanoparticle exposure would be a key event in the toxicological response of cells (Donaldson *et al.*, 2005; Keenan *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2011 ; Bhattacharya *et al.*, 2012). However, there are few studies concerning the effects of iron nanoparticles on other biomarkers of oxidative stress in lung cells. Some studies carried out with the A549 cell lines highlighted a cell death associated with membrane damages after iron nanoparticle exposure (Choi *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012). The inflammatory markers by lung cells exposed to nanoparticles (as TiO_2) of different crystal structures have been extensively studied (Hussain *et al.*, 2009; Sayes *et al.*, 2006;

Singh *et al.*, 2007; Uboldi *et al.*, 2009; Veranth *et al.*, 2007) but not after exposure to Fe-NP.

The aim of this study is to evaluate the impact of iron nanoparticles on human lung cells. Major studies on nanoparticles have been developed using different pulmonary cell lines, and particularly A549 cells. Some authors studied the effects of nanoparticles on immortalized human bronchial epithelial cells such as: BEAS-2B (Eom *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012), 16HBE cells (Keenan *et al.*, 2009; Belade *et al.*, 2012; Otero-Gonzalez *et al.*, 2012) and normal human bronchial epithelial cells (NHBE) (Herzog *et al.*, 2009a, 2009b; Zhang *et al.*, 2011; Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2012). Recently, Courcot *et al.* (2012) showed that primary cell cultures displayed the highest similarities with bronchial mucosa in terms of transcript profiling and therefore seem to be the most relevant *in vitro* model for investigating the metabolism and bioactivation of toxicants and drugs in bronchial epithelium. Therefore, we used primary cultures of bronchial epithelial cells to evaluate the potential effects of iron-engineered nanoparticles on the respiratory system. These nanoparticles, representative of industrial smoke emitted by the metallurgical industry (*article in press submission*), were produced using a gas condensation technique and were perfectly characterized on the physico-chemical and surface plane. We investigated (1) the iron nanoparticle capacity to penetrate lung epithelial cells, (2) to induce an oxidative stress and (3) to modulate the expression of gene encoding for proteins involved in inflammatory processing, oxidative stress, DNA repair and apoptosis...

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Synthesis and characterization of iron-engineered nanoparticles (Fe-NP)

Metallic iron nanocrystals were produced using a gas condensation technique (cryogenic melting) that is described by Champion and Bigot (1996). To avoid contamination through reaction with a crucible, the metal was heated in a radiofrequency levitation furnace. These particles are representative of industrial smoke emitted by the metallurgical industry (*article in press submission*). A set of techniques was used to characterize our material precisely. First, the shape and the size of iron nanoparticles were determined by electron microscope scanning. Samples of nanoparticles were prepared by spraying a homogenized iron nanoparticle solution on a thin plate of gold-coated glass. Scanning electron micrographs were recorded with a LEO 1530 (Zeiss, Germany). The size of nanoparticle agglomerates was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments). Then, we used X-ray photoelectron spectroscopy (XPS_K ALPHA, Thermo Scientific) to analyse the surface chemical elemental composition of nanopowders, deposited on a gold-coated substrate, by photoionization of heart atomic levels (Al K α source, $h\nu = 1486.6$ eV). We coupled this analysis with ion sputtering (Kr $^+$, 3keV) to determine the depth distribution of elements within iron nanoparticle surfaces. The

compositions of the surface oxide film surface and the underlying metal were determined by measuring integrated photopeak intensities with a Shirley background subtraction. The peak area was corrected from sensitivity factors (Briggs and Seah, 1990). The X-ray spot diameter was set to 0.1 mm. For depth-profiling, the Ar ion gun primary energy was set to 3.0 KeV, with a sputtering speed circa 0.1 nm.s⁻¹. Survey spectra (overall XPS spectra) were acquired with an energy step ΔE of 1.0 eV, while ΔE was 0.1 eV for core level regions. Acquisition time was 100 ms per step in all cases. The analysis chamber base pressure was 6.0 10⁻¹⁰ torr and increased by a tenth during Ar⁺ sputtering (not yet published). The zeta potential (ζ) was recorded as a measurement of the nanoparticle surface charge (Zetasizer II, Malvern Instruments). Finally, we determined the specific surface area (ssa) of our iron nanoparticles according to the Brunauer, Emmet and Teller method (Bruauer *et al.*, 1938) by nitrogen adsorption (Micromeritics_Type ASAP 2010).

2.2.2. Cell cultures

Human Bronchial Epithelial Cells (HBECs) were derived from bronchial tissues of patients undergoing surgery for lung carcinomas as previously described (Courcot *et al.*, 2012). After surgical resection, macroscopically healthy areas of lobar bronchi were immediately immersed in a Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1 % penicillin-streptomycin, and 2 % fungizone, and then stored at 4°C until used. Bronchial segments were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and processed for mucosa isolation using a sterile scalpel. Small pieces of bronchial mucosa (approximately 2 mm²) were used as a source of primary cells. They were placed in petri dishes (150 mm) coated with 0.03 % rat tail collagen in the presence of 5 ml of a serum-free medium (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM); Lonza, Verviers, Belgique) supplemented with 1 % penicillin-streptomycin and 2 % fungizone. After an adherence period of 24 h, 5 ml of culture medium were added and were changed every 2 to 3 days. Epithelial cells grown from bronchial explants reached 100 % confluence in approximately 10 days. After trypsinization, cells were gathered, reseeded in 6-well plates, 96-wells plates or labtech coated with collagen, and cultured until confluency. HBECs were cultivated at 37°C and with 5 % CO₂.

2.2.3. Periodic Acid Schiff (PAS) and Immunofluorescence stains

Cells grown on labtech were fixed with 1 % paraformaldehyde for 3 minutes at 37°C and methanol for 5 minutes at -20°C. Cells were conserved at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) until used.

2.2.3.1 PAS stain

Mucus secretion was identified by periodic acid-Schiff (PAS) reaction using the standard protocol recommended by the manufacturer (Merck-Millipore, Molsheim, France). Cells were washed with distilled water, incubated with periodic acid for 5 min and then with Schiff's reagent for 15 min. Between each step, slides were washed under running water for 3 min and then with distilled water. Finally, cells were counterstained with hematoxin and mounted using the Eukitt® quick-hardening mounting medium (Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France).

2.2.3.2 Immunofluorescence stain

Cells were permeabilized for 3 min with PBS containing 0.2 % Triton X-100 and rinsed three times for 5 min in PBS. They were incubated for 1 h at 37°C with primary antibodies diluted in PBS/3 % BSA/0.05 % Tween and 0.08 % NaN₃: 1:250 dilution for MU5AC antibodies (mouse monoclonal MAB2011, Clone CLH2; Merck-millipore, Molsheim, France) and 1:100 dilution for pan-cytokeratin antibodies (monoclonal, Clone PCK-26; Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France). After three times 5-min washes in PBS, cells were incubated for 30 min at 37°C with secondary antibodies conjugated with Alexa fluor 488 Dye (Life Technology, Courtaboeuf, France) in the dilution of 1:400. They were rinsed again three times for 5 min in PBS and mounted with the SlowFade Gold Antifade reagent containing DAPI (Molecular Probes).

2.2.4. Exposure of primary cultures of bronchial epithelial cells

The medium (BEGM) was changed before exposures. Nanoparticles were extemporaneously suspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Life Technology, Courtaboeuf, France) and ultrasonicated (Deltasonic; Somatherm; 28 kHz) for five minutes. Cell cultures were exposed in 3 replicates for 6 hours, 24 hours and 48 hours by loading 200 µl of NPs suspensions on the 2 ml of culture medium of each well with a final concentration of 2 µg.cm⁻².

2.2.5. Transmission electron microscopy

For this study, HBEcs were plated in cell culture inserts for 6-wells plates and grown until confluency. Cells were exposed to Fe-NP for 24 h. Then, cells were washed twice with PBS and fixed in 0,5 % paraformaldehyde/2 % glutaraldehyde containing PBS for 20 min at room temperature then over night at 4°C (with renewal of the fixative). After 3 washes with a solution of 0.1M PB /0.22M sucrose during 10 min, cells were postfixed with 1 % OsO₄ in PBS 0,1M) for 2h at room temperature. The fixed samples were dehydrated in a series of graded alcohols and embedded in Epon resin. Ultrathin sections (50-90nm) of samples embedded in Epon were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut E), stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Zeiss EM902 transmission electron microscope at 80 kV equipped with the Orius camera interface. Numerical images were acquired with Digital Micrograph of Gatan software.

2.2.6. Cell Viability assay

After 24-h exposure, the viability of the primary cells cultured in 96-wells plates, was assessed using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay according the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). In brief, 100 µl CellTiter-Glo® reagent were added to the 100 µl culture supernatant of each well. After 10 min incubation at room temperature, the luminescent signal was recorded in relative luminescence units (RLU) (Herten *et al.*, 2009).

2.2.7. Gene expression

2.2.7.1 RNA isolation

After exposure, 700 µl of QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) were directly added to the cell dishes. Total RNAs were isolated using the miRNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Courteboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The yield of the extracted RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm with the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Champs sur Marne, France).

2.2.7.2 cDNA Synthesis

Total RNAs (1 µg) were retrotranscribed in single-stranded cDNAs using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. Samples were incubated for 10 min at 25°C, then 120 min at 37°C and 5 min at 85°C. cDNAs were stored at -20°C until used.

2.2.7.3 High throughput quantitative real-time PCR

High throughput gene expression experiments were carried out on exposed primary cells from one donor, using custom TaqMan™ Low Density Arrays or TLDA (Life Technologies, Courtaboeuf, France). TLDA consist in 384-well micro fluidic cards preloaded with sets of primers and 6-FAM-labeled TaqMan MGB probes previously

selected from predesigned TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, Courtaboeuf, France). We chose a configuration with 380 different assays, the 4 remaining assays corresponding to the 18S gene as an internal control for relative quantification. The set of selected gene comprised 223 genes encoding proteins involved in inflammatory process (cytokins and receptors, etc.), 43 genes encoding regulatory proteins of oxidative stress, 72 genes encoding proteins involved in DNA repair and the regulation of apoptosis and 48 others genes (including 15 mucin genes) (Supplementary data) (Annexe 2).

Before loading on a TLDA, each cDNA template was mixed with 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. The realtime PCR amplification was performed in the 7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies, Courtaboeuf, France) using the following thermal cycling conditions: 2 min at 50°C to activate uracil-DNA glycosylase, 10 min at 94.5°C, and 40 cycles of denaturation at 97°C (30 s) and annealing-extension at 59.7°C (1 min).

2.2.7.4 Conventional quantitative real-time PCR

The quantification of the 10 gene transcripts exhibiting the highest differential expressions after NPs exposure was controlled in primary cells derived from 3 independent donors, using conventional quantitative real time PCR. PCR amplifications were conducted using 50 ng of RT products, the TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) and TaqMan Gene Expression Assays (20X) (Life Technologies, Courtaboeuf, France) according to the protocol supplied by the manufacturer. Real-time PCR was carried out in triplicate in 96-well plates using the thermocycler Step One Plus Real Time PCR System (Life Technologies, Courtaboeuf, France) and the following thermal cycling conditions 50° for 2 min, 95°C for 10 min for the activation of the Taq polymerase, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min.

2.2.7.5 Analysis of gene expression

The threshold cycle (Ct) values, which are the cycle number at which the fluorescence crosses the detection threshold, were determined with the RQ Manager 1.2 software (Life Technologies, Courtaboeuf, France). The 18S rRNA gene was selected as the reference gene for normalization of target genes. It has been reported as the most suitable reference gene for expression in profiling lung tissues (Saviozzi *et al.*, 2006; Leclerc *et al.*, 2010). We chose a Ct value > 35 as the cut-off for non-expressed genes. Ct values for target genes were normalized to the Ct value of the reference gene, creating Δ Ct values ($Ct_{\text{target gene}} - Ct_{18S \text{ rRNA}}$). After Δ Ct computation, $\Delta\Delta$ Ct values were calculated by subtracting the average Δ Ct of samples used as calibrators (non exposed cells) from the Δ Ct value of target samples (cells exposed to NPs for 6h, 24h or 48h). This enabled the calculation of the relative quantity (RQ) between samples with the formula: $RQ = 2^{-(\Delta\text{Ct of target cells} - \text{average}\Delta\text{Ct of samples used as a calibrators})}$.

2.2.8. Intracellular ROS measurement

The intracellular ROS production was measured through spectroscopic analyses of the fluorescent 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA) dye (Life Technologies, Courtaboeuf, France). Cells were plated in 96-well plates (100 000 cells per well) and grown until confluency. Before exposure, cells were washed with PBS and incubated with 100 µl of 20 µM carboxy-H₂-DCFDA in HBSS (Life Technologies, Courtaboeuf, France). For negative controls, 50 µl of 40 mM N-acetylcystein (NAC; Life Technologies, Courtaboeuf, France) were added. All wells were completed with HBSS to have a final volume of 200 µl. After 1 h incubation at 37°C, cells were washed with PBS and then exposed to 50 µl of Fe-NP, or 50 µl of 20 µM phorbol ester myristate (PMA; Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France) for positive controls or 50 µl of 40 mM NAC (Life Technologies, Courtaboeuf, France) for negative controls. All wells were completed with HBSS to have a final volume of 200 µl. The fluorescent signal (excitation 492-495 nm – emission 517-527 nm) was read at 37°C every 10 min during 3 hours with the GloMax®-Multi Detection System (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France).

2.2.9. Malondialdehyde measurements

2.2.9.1 Sample preparation

After trypsinization, exposed cells were harvested and centrifuged for 4 min at 350 g (Sigma 2.5). Supernatants were eliminated and cells were resuspended in 250µl of PBS. After removing 50 µl for protein assays, the remaining 200 µl of the cell suspensions were added with 20 µl of 40 µM butylated hydroxytoluene (BHT; Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France) and stored at -80°C until used.

2.2.9.2 Proteins assay

The protein quantification was determined using the Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France) according to the manufacturers recommendations. Samples were read at 562 nm (Multiskan® Spectrum, Thermo Scientific) for determining protein concentrations.

2.2.9.3 Malondialdehyde (MDA) assays

2.2.9.3.1 MDA extraction

One milliliter of 0.1 N HCL was added to 100 µl of each previously prepared sample. After 1 min agitation, 3 ml of ethyl acetate were added. Mixtures were vortexed for 2 min and centrifuged at 1800 g for 10 min. Organic phases were then recovered (first extraction). This step was repeated once and second extractions were added to the first one and evaporated under a gentle nitrogen stream. Finally, 250 µl of methanol were used to retrieve the MDA and samples were stored at -20 ° C.

2.2.9.3.2 MDA quantification

Samples (100µl) were mixed with 650 µl of 1% H₃PO₄ and 250 µl of 0,6 % tiobarbituric acid (TBA) and incubated in dark in a dry bath for 30 min at 100°C. After rapid chilling on ice, samples were loaded onto column Symmetry Shield C18 analytical column (5 µm, 4,6 x 150 mm, WATERS) fitted with Symmetry Shield C18 guard column (5 µm, 3,9 x 20 mm, WATERS). The mobile phase consisted in methanol and 50 mM KH₂PO₄, pH 6.8 (40:60, v/v). The flow rate was kept constant at 1 ml.min⁻¹. Fluorometric detection was performed with excitation at 527 nm and emission at 551 nm. The amount of MDA was measured from the corresponding peak area using the Empower chromatography software (Waters). The peak of the MDA-TBA adduct was calibrated solution of 1,1,3,3- tetraethoxypropane were used as internal standards for MDA quantification.

2.2.10. GSH and GSSH measurement

The measurement of GSH and GSSG was performed following the method of Kandar *et al.* (2007) with slight modifications.

2.2.10.1 Sample preparation

After elimination of the culture medium, 400 µl of cold 10 % metaphosphoric acid were carefully added (Sigma, Saint Quentin, Sallavier, France) on cells. After an incubation of 10 min at 4°C, cells were harvested and centrifuged (15 min, 4°C, 22 000 g). Fifty µl of supernatants were used for the quantification of GSH and 100 µl for the quantification of GSSH.

2.2.10.2 Derivatization procedure

2.2.10.2.1 GSH assay

Supernatants (50 µl) were added with 200 µl of 0.1% EDTA in 0.1 M sodium hydrogenophosphate (pH 8.0). To 240 µl of this mixture, 720 µl of 0.1 % EDTA in 0.1 M sodium hydrogenophosphate, and 60 µl of 0.1 % orthophthaldhehyde (OPA) in methanol, were added. After incubation at 25°C for 15 min in dark, reaction mixtures were stored at 4°C.

2.2.10.2.2 GSSG assay

Supernatants (100µl) were incubated at 25°C with 100 µl of 40 mM N-ethylmaleimide (NEM) for 25 min in dark, and then added with 75 µl of 0.1 M NaOH. To 120 µl of these mixtures, 840 µl of 0.1 M NaOH, and 60 µl of 0.1 % OPA in methanol, were added. After incubation at 25°C for 15 min in dark, reaction mixtures were stored at 4°C.

2.2.10.3 Chromatography method

Chromatography of GSH and GSSG was accomplished using isocratic elution on column Symmetry Shield C18 analytical column (5 µm, 4,6 x 150 mm, WATERS), with

fitted Symmetry Shield C18 guard column (5 μm , 3,9 x 20 mm, WATERS) at 37°C (Block heater SBM 130D STUART). The mobile phase consisted in methanol and 25 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0 (25:75, v/v). The flow rate was kept constant at 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The optimum response of fluorescent derivatives was observed when excitation and emission wavelengths were set at 350 and 420 nm, respectively. The amount of GSH and GSSG was quantified from corresponding peak areas using the Empower chromatography software. The calibration curves were obtained with standard samples of GSH and GSSG.

2.2.11. Statistical Analysis.

Normality and equality of variances were checked for each data set. For comparison purpose with the literature, data were presented as the means and standard deviations (SD). Each experimental value was compared to the corresponding control value in each time point. Each exposure was made in 3 replicates. When the normality and the equality of variance were checked, a series of one-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine the difference between non-exposed cell cultures (NE) and cell cultures exposed to Fe-NP. Then, a Dunnett's *post hoc* test was carried out for pairwise difference, using NE as controls. When normality was skewed, a Kruskal Wallis Test was performed (followed by Dunnett's *post hoc* test). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed with SigmaStat® 2.03 software (SPSS Inc., Armonk, New York).

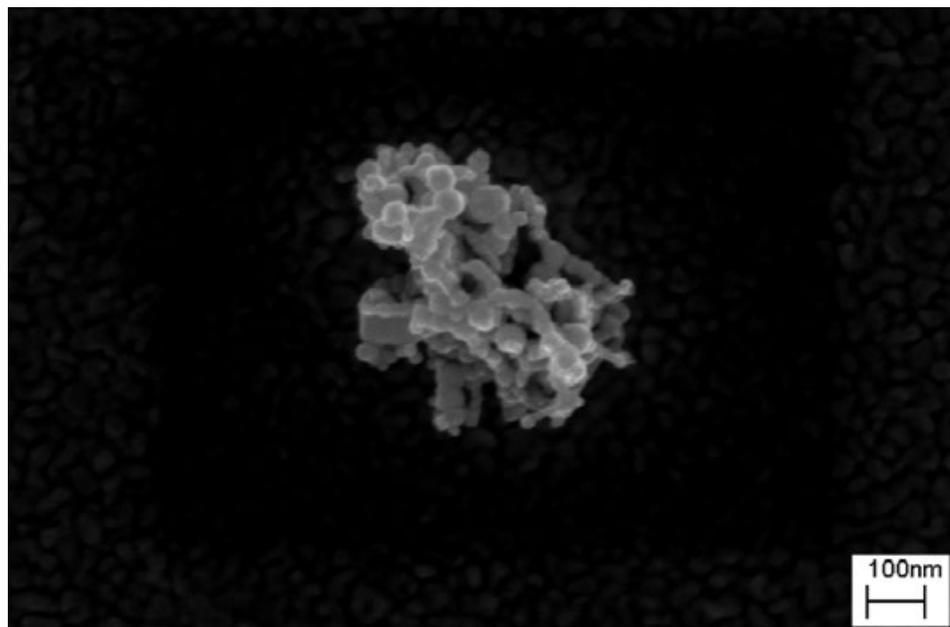


Fig. 65: MEB image of iron nanoparticles – magnitude x 50 000 - SEM LEO 1530 (Zeiss, Germany).

Tab. 19: Characterization of pristine state of iron-engineered nanoparticles

Shape	Composition	Purity	Surface area	Size distribution	Agglomeration	Zeta potentiel	VSSA
Sphere	Core of metallic iron with an oxide (Fe ²⁺ and Fe ³⁺) and hydroxide layer of 2 nm	Free of impurity	27.72 m ² .g ⁻¹	20-80 nm	700 nm (average of 200 nm with sonication step)	-12 mV	218.27 m ² .cm ⁻³

2.3. Results

2.3.1. Characterization of Fe-NP

The characterization of iron-engineered nanoparticles (*article in press submission*) was performed on the pristine state of nanoparticles and nanoparticles in HBSS and in BEGM culture medium (Lonza, Verviers, Belgique). We defined eight parameters (Card and Magnuson, 2010), listed below. Iron-engineered nanoparticles (Fe-NP) were spherical (figure 65) and their size distribution was measured and shown to be a size comprised between 20-80 nm. They were formed from a metallic iron core with an oxide layer (Fe^{2+} and Fe^{3+}) of 2,1 nm as revealed by the Fe_{2p} core level. A layer of hydroxide could be also demonstrated by deconvolution of the O_{1s} peak. Moreover, this analysis also showed that our metallic samples were free from any impurities. During our experiments, we were able to identify an agglomeration of our nanoparticles. Indeed, they were magnetic, and formed agglomerates with a mean size of 700 nm. As we dispersed the nanoparticles in water, we conducted a study that showed the effect of the sonication on the reduction of the average size of agglomerates (data not shown). A sonication of 15 min (Deltasonic, 28 kHz) when prepare solutions of exposure, and a sonication of 5 min just before exposure allowed to homogenize the solution and to reduce the average size of agglomerates to 200 nm. The zeta potential of pristine state of nanoparticles was about -12 mV. This value did not change after sonication steps. The surface area of iron nanoparticles was measured to be $27.72 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$. To distinguish a nanostructured material from a non-nanostructured material, the volume specific surface area (VSSA) can be a complementary criterion. Expressing the surface area related to the volume instead of mass allows for an additional criterion independent of the density and size or size distribution of the nanomaterial. The VSSA of the iron nanoparticles was calculated to be $218.27 \text{ m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$.

Table 19 summarizes the characteristics of iron-engineered nanoparticles in pristine state. These nanoparticles were also characterized after immersion in HBSS solution during 24 h and exposure medium (BEGM). We observed that the immersion in HBSS only slightly increased the oxide thickness of 0.16 nm to reach 2.26 nm. In the case of HBSS medium, the surface hydroxylation was increased compared to Fe-NP in pristine state. We can thus conclude that this media are relatively inert toward Fe-NP oxidation (corrosion) at days scale (*article in press submission*). On the contrary, the BEGM strongly increased the iron oxide layer thickness. We observed that after 24 h in BEGM, the oxide layer thickness was near 2.8 nm and mainly hydroxylated. We noticed that for 48 h exposition time, the oxide layer continued to increase for the BEGM and reached a value by 3.1 nm (*article in press submission*).

2.3.2. Characterization of human bronchial primary cells

The pan-cytokeratin immunostaining (figure 66-A) allowed us to confirm the epithelial phenotype of the primary cells. The MUC5AC immunostaining (figure 66-A) and PAS staining (figure 66-B) demonstrated the capacity of some cells to secrete bronchial mucin.

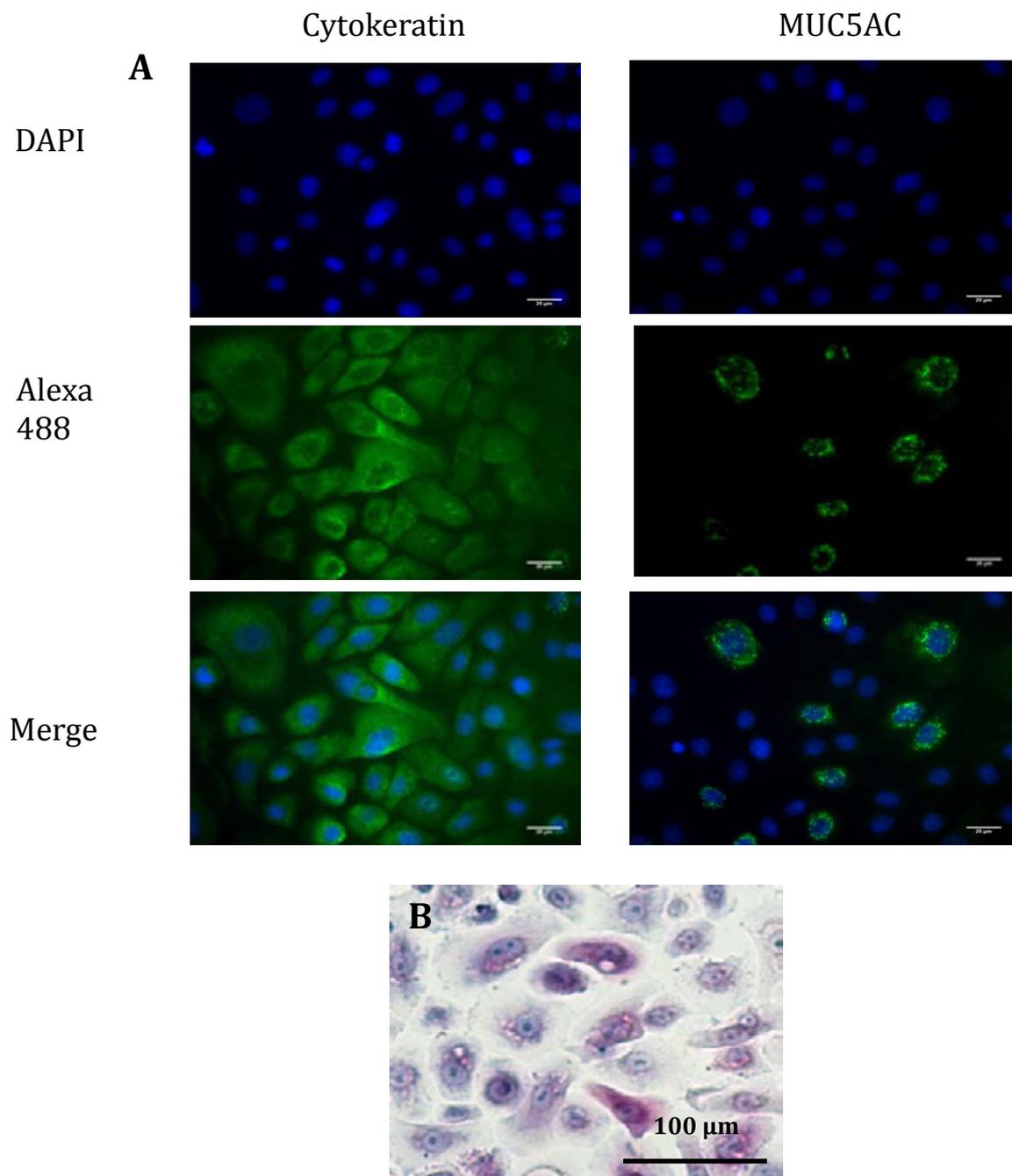


Fig. 66: Immunofluorescence and PAS stains of bronchial epithelial cells - A. Immunostaining dilutions: 1:250 for MUC5AC and 1:100 for pan-cytokeratin, magnitude x40, LEICA DMIRE microscope - B. PAS, fuchsia color corresponds to polysaccharides, magnitude x60, Nikon Eclipse Ti-U microscope.

2.3.3. Iron nanoparticles uptake

TEM investigations revealed that Fe-NP could penetrate the primary cells (figure 67-A) and were incorporated into membrane-bound vesicles, as small aggregates and rejected in extracellular medium (figure 67-B).

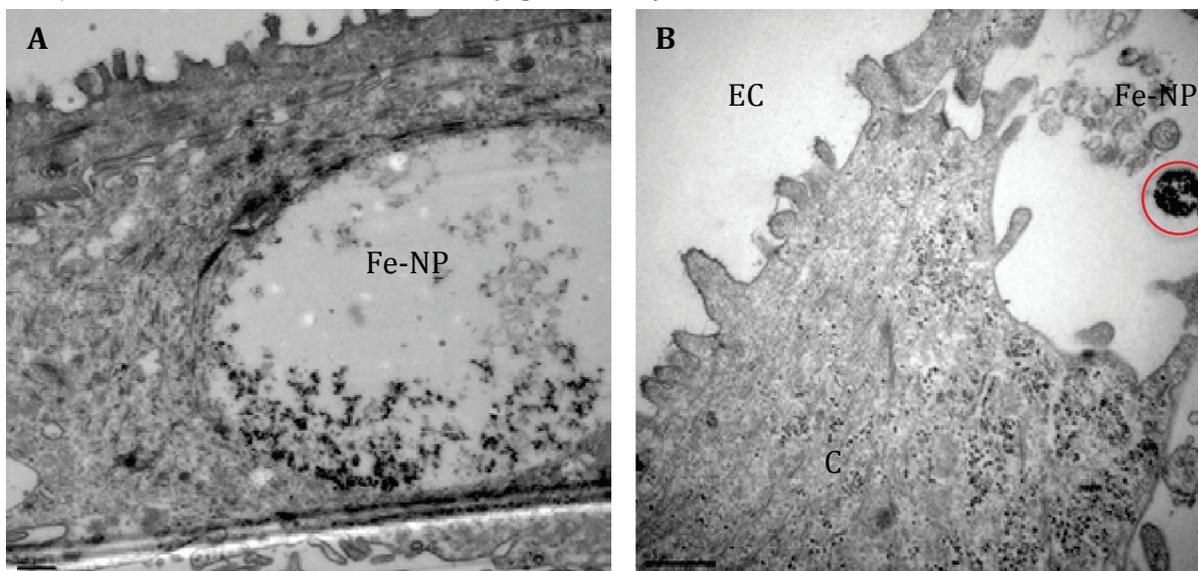


Fig. 67: TEM images of bronchial epithelial cells (after 24-h exposure to Fe-NP. The Fe-NP are enclosed in vesicles (red cercle). C: intracellular medium - EC: extracellular medium

2.3.4. Cell viability

To examine the cytotoxicity of Fe-NP, a cell viability assay was performed using primary cultures exposed to several concentrations of nanoparticles, from 0 to 300 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 24h. A decrease of cell viability was observed with increasing doses of Fe-NP (figure 68): the CL₂, CL₁₀ and CL₅₀ corresponded to 2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, 6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and 60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ concentrations, respectively. For the following exposure experiments, we decided to use the non-cytotoxic dose of 2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, in order to be as close as possible to realistic environmental concentration.

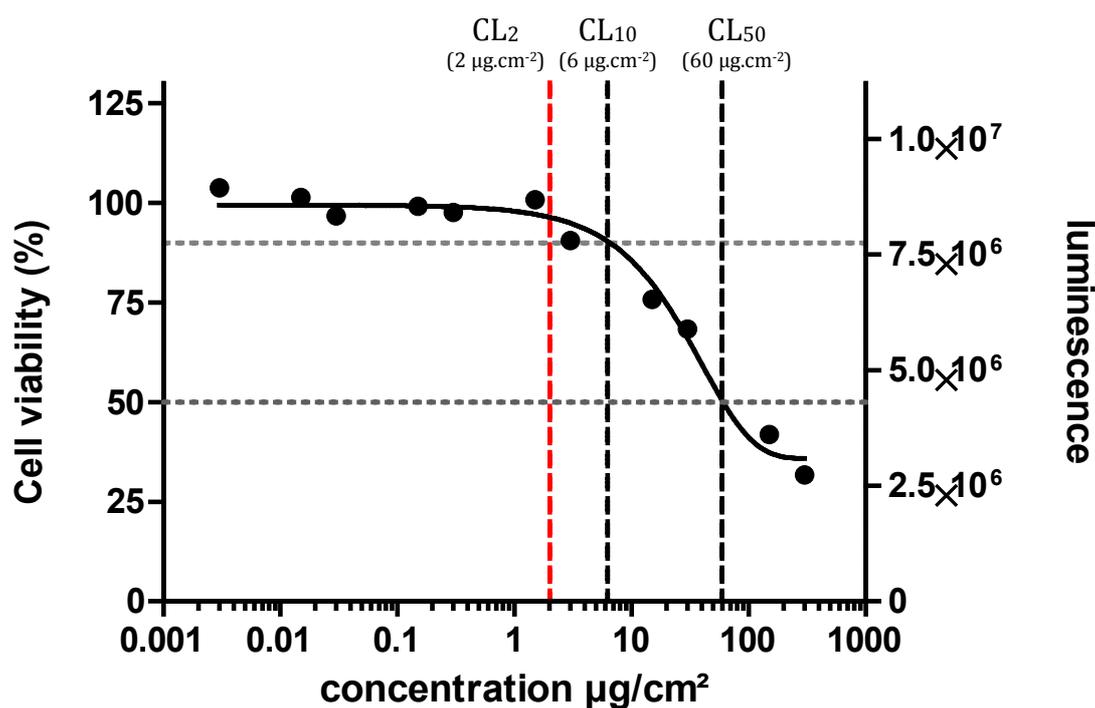


Fig. 68: Cell viability of primary culture of HBEC (n-3) after 24-h exposure to Fe-NP

2.3.5. Modulation of gene expression

In order to assess the impact of Fe-NP on human bronchial cells, we conducted a transcriptomic analysis of 380 genes encoding proteins mainly involved in inflammation, oxidative stress, DNA repair and apoptosis, in primary cells derived from one donor and exposed ($2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 6, 24 and 48 hours. Fifty-five genes were regarded as being differentially expressed since they displayed at least a 4-fold difference in transcript level ($\text{RQ} \geq 4$ or ≤ 0.25) after Fe-NP exposure. One should notice that the highest and most numerous deregulating were observed after 6-h exposure. These results are described in the table 20.

Tab. 20: Differential gene expression in bronchial epithelial cells exposed to Fe_MCMC relative to non-exposed cells. Relative quantities (RQ) were calculated based on the comparative threshold cycle method ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$), with non-exposed cells as calibrator. – RQ ≤ 0.25 in green – RQ ≥ 0.25 in red

Gene name	RQ		
	6-h exposure	24-h exposure	48-h exposure
<i>GPR156</i> *	0,044	0,563	0,44
<i>TNFSF11</i> *	0,05	0,148	0,714
<i>CCR10</i> *	0,051	0,388	1,498
<i>CASP5</i> *	0,086	0,206	0,454
<i>CSF2RB</i>	0,099	1,709	0,907
<i>NOS2</i>	0,103	4,345	1,969
<i>SCARF1</i>	0,111	0,268	0,132
<i>TLR1</i>	0,128	0,2	0,578
<i>CXCL10</i>	0,15	0,505	0,399
<i>SGK2</i>	0,154	0,383	0,331
<i>TNFSF10</i>	0,197	0,38	0,944
<i>TGFB3</i>	0,213	0,801	0,796
<i>NEIL3</i>	0,247	3,003	2,074
<i>CARD8</i>	0,25	0,599	0,808
<i>IL27</i>	0,478	2,104	0,052
<i>GPX2</i>	0,584	0,173	0,609
<i>SEPP1</i>	0,631	0,117	0,666
<i>IL19</i>	0,745	0,117	1,207
<i>TLR4</i>	0,758	0,062	0,547
<i>MMP19</i>	0,771	0,363	0,052
<i>CSF1R</i>	0,977	0,939	0,192
<i>IL2RG</i>	1,558	0,425	0,059
<i>IL7R</i>	2,337	0,098	0,884
<i>IL16</i>	2,932	0,765	0,823
<i>MUC13</i>	3,434	2,886	0,108
<i>AREG</i>	4,018	1,566	0,957
<i>CXCL1</i>	4,053	0,164	0,863
<i>HBEGF</i>	4,401	0,674	1,033
<i>SOCS3</i>	4,533	0,85	1,205
<i>MMP13</i>	4,538	0,097	0,983
<i>TGFA</i>	4,682	0,851	0,81
<i>ADAM8</i>	5,785	1,245	1,022
<i>MMP9</i>	6,279	3,332	3,364
<i>FGFR1</i>	7,376	2,266	0,982
<i>CXCL2</i>	7,786	0,618	0,883
<i>CCL20</i>	9,021	0,15	0,636
<i>LTA</i>	13,369		10,406
<i>ADAMTS1</i>	13,99	1,406	1,163
<i>IL17D</i>	16,38	6,207	
<i>CXCL3</i>	17,45	0,408	0,984
<i>LTB</i>	17,817	6,037	12,372
<i>IL8</i> *	21,958	0,248	0,581
<i>NOS3</i>	23,87		5,864
<i>PTX3</i>	27,287		
<i>MMP12</i>	29,969	0,095	0,106
<i>CXCL5</i>	37,886	0,659	0,555
<i>CXCR4</i>	47,819	6,409	
<i>PTGS2</i> *	49,896	1,171	1,251
<i>CSF3</i>	51,441		
<i>IL1R2</i>	55,534	6,469	
<i>IL24</i>	64,025	6,237	
<i>MMP3</i> *	89,588	0,551	0,323
<i>IL13RA2</i> *	109,507	12,773	
<i>MMP1</i> *	511,94	17,932	0,619
<i>CSF2</i> *	539,29	6,476	9,433

A set of 10 genes was selected: the 8 genes exhibiting the highest expression variation in response to Fe-NP exposure (4 down regulated genes: *GRP156*, *TNFSF11*, *CCR10*, *CASP5* and 4 up regulated genes: *MMP3*, *IL13RA1*, *MMP1*, *CSF2*), and *IL8* and *PTGS2* for their known implication in inflammation processes. The sensitivity of these ten genes to iron NPs was assessed in three independent primary cultures of bronchial epithelial cells.

After 6-h exposure, down and up-regulations observed for the 10 selected genes in the first primary cell culture were confirmed in the 3 independent primary cell cultures (table 21). Statistically significant differences only concerned *TNFSF11*, which was under expressed in exposed cells, and *PTGS2*, *MMP3*, *MMP1* and *IL13RA2*, which were over expressed in exposed cells. Highest deregulations were measured for *MMP1* and *MMP3* with 9.79 and 9.38 fold change, respectively. For longer times of exposure (24 and 48 h), no significant difference was observed.

Tab. 21: Difference statistically significant between the controls and the samples exposed to 2 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ of Fe-NP. One way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test, * $p < 0,05$ _ $n = 9$ (3 patients in 3 replicates)

Gene name	RQ		
	6-h exposure	24-h exposure	48-h exposure
<i>TNFSF11</i>	⬇ 2,83 *	⬇ 1,98	⬇ 1,50
<i>CASP5</i>	⬇ 1,59	⬇ 1,61	⬇ 1,50
<i>GPR156</i>	⬇ 1,25	⬇ 1,06	⬇ 1,58
<i>CCR10</i>	⬇ 1,01	⬆ 1,64	⬆ 1,06
<i>IL8</i>	⬆ 2,73	⬆ 1,01	⬆ 1,02
<i>IL13RA2</i>	⬆ 3,56 *	⬆ 2,42	⬆ 1,09
<i>CSF2</i>	⬆ 3,74	⬆ 2,46	⬆ 1,66
<i>PTGS2</i>	⬆ 4,44 *	⬆ 1,57	⬆ 1,25
<i>MMP3</i>	⬆ 9,38 *	⬆ 1,39	⬇ 1,17
<i>MMP1</i>	⬆ 9,79 *	⬆ 3,90	⬆ 1,05

2.3.6. Production of ROS in primary cultures of bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP

The production of ROS following Fe-NP exposure (2 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) was measured every 10 min during 3 hours in primary cells derived from 3 different donors. To evaluate the effects of Fe-NP, we subtracted the ROS production of non-exposed cells (NE) (figure 71) to that of cells exposed to Fe-NP or to PMA for positive controls. We observed a rapid increase of ROS production after Fe-NP and PMA exposure (figure 71). However, the ROS production increased and then stabilized after 95 min of Fe-NP exposure. For positive controls, the ROS production was maximal after 45 min of PMA exposure and then gradually decreased (figure 69). This experiment also described a loss of efficiency of NAC during Fe-NP exposure, which did not occur after PMA exposure (figures 69).

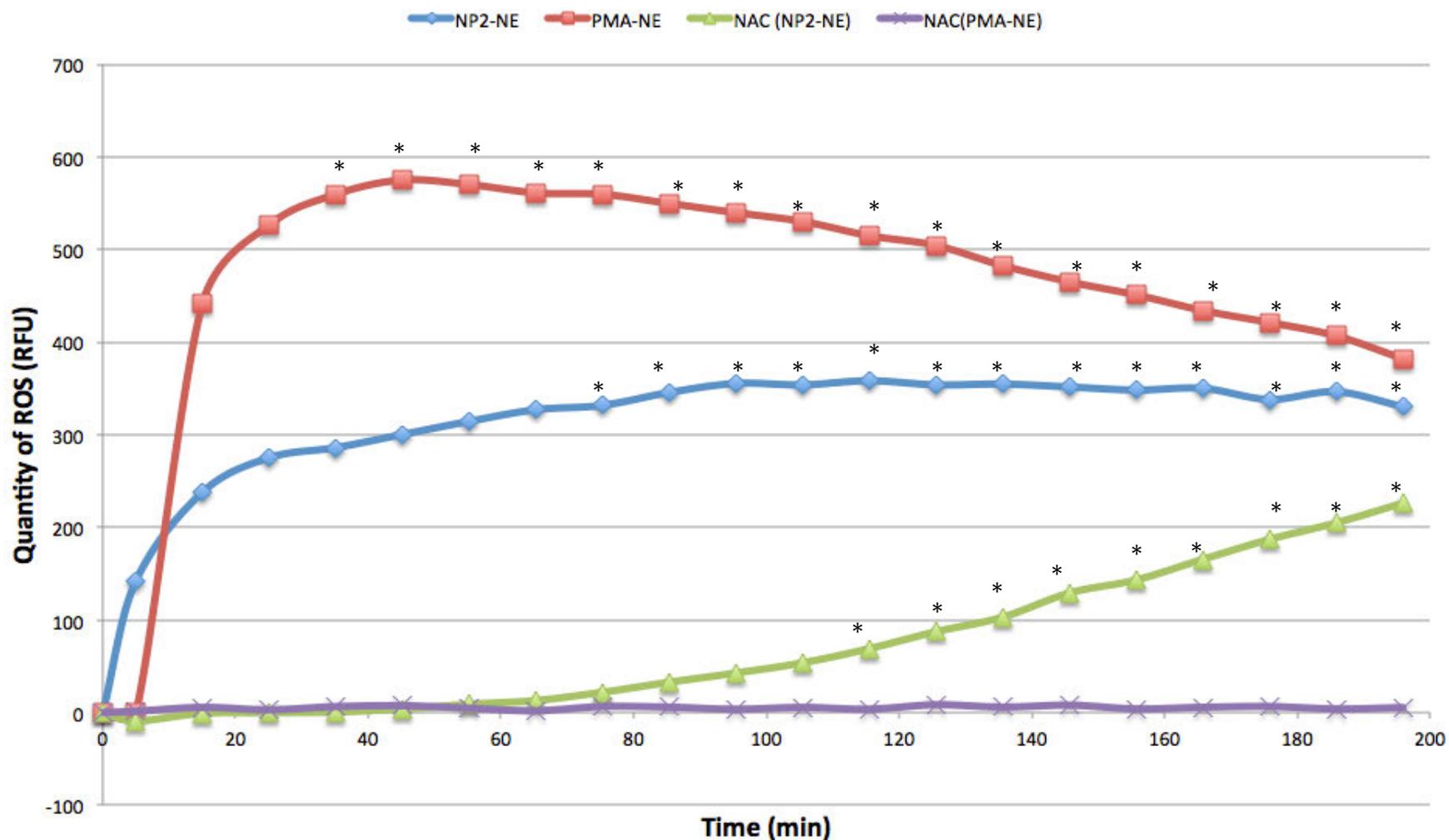


Fig. 69: Evolution of ROS production in bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP. The production of ROS of exposed cells was normalized with that of non-exposed cells. NE: non-exposed cells - NP2-NE: results of cells exposed to Fe-NP ($2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) normalized with non-exposed cells - PMA-NE: results of cells exposed to PMA normalized with non-exposed cells - NAC (NP2-NE): results of cells exposed to Fe-NP ($2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) with NAC normalized with non-exposed cells with NAC - NAC(PMA-NE): results of cells exposed to PMA with NAC normalized with non-exposed cells with NAC - Kruskal Wallis test with Dunnett's *post hoc* test with T5min as reference to see the evolution over time, * $p < 0,05$ _ $n = 12$ (3 patients in 4 replicates).

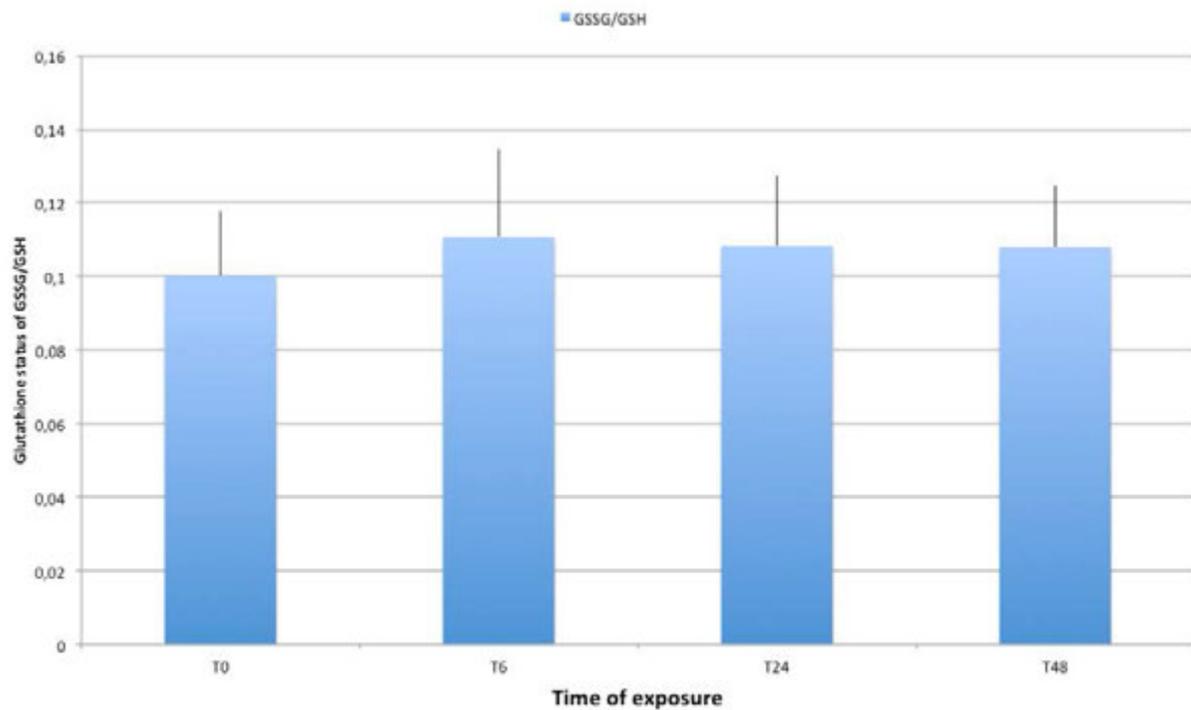


Fig. 70: Effect of Fe-NP on intracellular glutathione status (GSSG/GSH) content in HBECs. Results are expressed as the means \pm SD of three independent experiments conducted in triplicates (n=9)_NE: no exposed - T6: 6h of exposure - T24: 24h of exposure - T48: 48h of exposure. One way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test, *p<0,05 _ n = 9 (3 patients in triplicates)

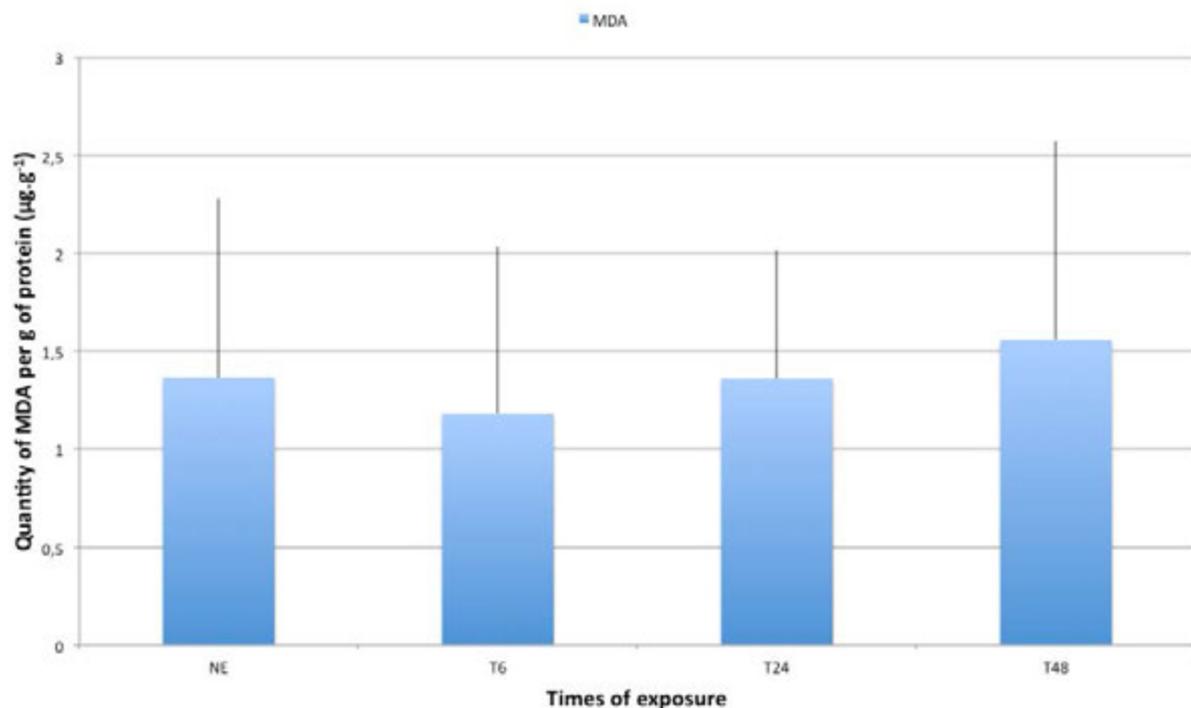


Fig. 71: Changes in malondialdehyde (MDA) concentrations in HBECs following Fe-NP exposure. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments conducted in triplicates (n=9)_NE: no exposed - T6: 6h of exposure - T24: 24h of exposure - T48: 48h of exposure. One way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test, *p<0,05 _ n = 9 (3 patients in triplicates).

2.3.1. Glutathione status and production malondialdehyde evolution in primary cultures of bronchial epithelial cells exposed to Fe-NP

To evaluate the effects of Fe-NP on the antioxidant system of bronchial epithelial cells, we measured the oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH), and the MDA production as indicator of lipid peroxidation. As shown in figures 70 and 71, exposures of HBECs to 2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ of Fe-NP for 6h, 24 h and 48 h did not seem to induce significant modification of glutathione status and MDA production. Only a slight increase of the ratio of GSSG/GSH (figure 70) and a faint decrease of MDA production were observed after 6-h exposure (figure 71).

2.4. Discussion

The aim of this study was to investigate the toxicity of Fe-NP in primary cultures of human bronchial epithelial cells taking into account (1) the physico-chemical propriety of nanoparticles (size distribution, surface area, element analysis, zeta potential, volume specific surface area), (2) their uptake by cells, (3) their capacity to induce cytotoxicity, (4) their impact on the response to inflammation and oxidative stress.

First, we determined the Fe-NP characteristics following the recommendations of Card and Magnuson (2010). As Bhattacharya *et al.* (2009), we observed an agglomeration of Fe-NP with an oxidation of their surface once they were suspended in culture medium. However, the determination of the VSSA allowed us to verify that even agglomerated our Fe-NP conserved their NP reactivity. Indeed, a VSSA above 60 $\text{m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$ would mean an average size below 100 nm, thus indicating a high nanomaterial or nanostructure content (Kreyling *et al.*, 2010). The VSSA of the iron nanoparticles was calculated to be 218.27 $\text{m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$, suggesting that that the nanoparticle agglomerates keep their nanoparticle reactivity. He *et al.* (2008) have demonstrated that smaller particles (Fe_2O_3 -NP) in the nanosize range tend to agglomerate when suspended in a low pH liquid. Therefore, the increase in the size of agglomerates at lower pH was directly proportional to the size of the particles. Following the conclusions of He *et al.* (2008), it may be presumed that the Fe_2O_3 -nanoparticles after reacting with some reducing agent (as ascorbic acid) had an alteration of their surface ionic composition and surrounding pH. This is in agreement with the studies of Kumar *et al.* (2007) who found that the adsorption of biomolecules on the surface of particles followed by modification of the zeta potential and the agglomerate size played a vital role in their reactivity to the surrounding environment. Our study confirmed these results because the characterisation of our nanoparticles allowed to highlight a high surface oxidation of Fe-NP in biological medium. In a previous study, we reported that the suspension medium of Fe-NP play an important role on the surface crystallinity of Fe-NP. The immersion in HBSS had little effect on the surface composition and the increase of the oxide layer (*article in press submission*). In contrast, in the present study, we observed that the

immersion of Fe-NP in BEGM medium increased the oxide layer and radically changed the surface composition. These modifications caused an upper adsorption of biological molecules such as DNA (*article in press submission*) suggesting possible modifications of the behaviour and toxicity of the Fe-NP.

As several studies (Bhattacharya *et al.*, 2009; 2012; Könczöl *et al.*, 2011), we confirmed the penetration of Fe-NP in bronchial epithelial cells. Our study highlighted that, even agglomerated, nanoparticles penetrated into cells, suggesting they could exert intracellular damages. The penetration mechanisms of nanoparticles are not well identified. The endocytosis of NP via the clathrin pathway was proposed by Dombu *et al.* (2010). According to Canete *et al.* (2010), cationic iron nanoparticles coated with amino-dextran were internalized into cells mainly by a macropinocytosis process. Paur *et al.* (2011) showed that different nanoparticle internalisation pathways were possible: pinocytosis, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis and caveolae-mediated endocytosis; the internalisation mechanisms depend on the cell and nanoparticle types.

According to Khan *et al.* (2012), the toxicological impact of iron oxide nanoparticles is still in paradox (Mahmoudi *et al.*, 2011). Some studies had shown low or no toxicity whereas others reported significant toxicity for this nanomaterial. For instance, Karlsson *et al.* (2008b) evaluated the toxicity of bare iron oxide nanoparticles and found no or very low toxic effect on the human lung A549 cell line up to concentrations of 20-80 mg.ml⁻¹. Other studies had showed that bare iron oxide NPs exhibited significant toxicity in similar exposure conditions in human fibroblast cells (Gupta *et al.*, 2003; Gupta and Wells, 2004). At the opposite, Khan *et al.* (2012) have shown that bare iron oxide NPs were significantly cytotoxic for A549 cells by inducing necrosis at concentrations above 25 mg.ml⁻¹ but not for normal human lung fibroblast cells (IMR-90). In our study, we observed a cytotoxic effect of iron NP on bronchial epithelial cells after 24 h of exposure at 15 µg.cm⁻² (CL₅₀). However, since our aim was to use concentrations close to environmental conditions, we chose a non cytotoxic concentration (CL₂) to access the cellular impact of iron NP.

Studies concerning the impact of iron nanoparticles on the modulation of gene expression in lung cells are limited (Arenz *et al.*, 2006; Monteiller *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Brandenberger *et al.*, 2010; Foldberg *et al.*, 2012). Using custom TaqMan™ Low Density Arrays, we observed that Fe-NP altered the expression of about ten genes involved mainly in the cellular inflammatory response in primary cells from one donor at 6-h exposure. We confirmed the modulation of expression of a selection of 10 of the most deregulated genes in an independent series of primary cells (*GRP156*, *TNFSF11*, *CR10*, *CASP5*, *IL8*, *PTGS2*, *MMP3*, *IL13RA2*, *MMP1*, *CSF2*). However, only six of these genes exhibited statistically significant variations of expressions: *TNFSF11* which was slightly down regulated after 6-h exposure to Fe-NP, *IL13R2*, *PTGS2*, *MMP3* and *MMP1* which were up regulated. To our knowledge, the modulation of expression of *TNFSF11*, *MMP1*,

MMP3 and *IL13RA2* had never been demonstrated in lung cells in response to nanoparticle or particle exposure.

Even if there are few studies on TNFSF11 action in lung cells, the protein TNFSF11 was shown to be a dendritic cell survival factor and is involved in the regulation of T cell-dependent immune response. This protein was shown to activate antiapoptotic kinase AKT/PKB through a signaling complex involving SRC kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), which indicates that this protein may have a role in the regulation of cell apoptosis. As a consequence, a decrease of the *TNFSF11* expression could decrease the activation of antiapoptotic protein.

IL13RA2 is a receptor for interleukine 13 (IL13), which is a major inducer of fibrosis in many chronic infectious and autoimmune diseases (Fichtner-Feigl *et al.*, 2006). It acts as a scavenger receptor. Described primarily as a decoy, IL13RA2 is a potent antagonist of IL-13 bioactivity in epithelial cells. The cell surface IL13RA2 would be a potentially critical mediator of IL-13 clearance in humans. (Kasaian *et al.*, 2011). Therefore, the up-regulation of IL13RA2 secondary to FE-NP exposure could be a defense mechanisms to reduce the activity of IL13.

Metalloproteases are involved in tissue remodelling and repair during development and inflammation. There are 23 genes encoding for metalloproteinase in humans. Concerning MMP1, Foley *et al.* (2012; 2013) specified that this protease has been implicated in a wide range of pathophysiologic processes, including arthritis, atherosclerosis, thrombosis, tumorigenesis, and metastasis (Brinckerhoff *et al.*, 2000; Trivedi *et al.*, 2009). Moreover, *MMP1* overexpression has been associated with many cancer types, including lung cancer (Foley *et al.*, 2012). Similarly, Lindner *et al.* (2012) observed alterations of expression of *MMP1* and *MMP3* in lung cells under pro-inflammatory conditions. In our study, the over-expression of these genes could result from the activation of an inflammatory process secondary to iron NP exposure as suggested by the increased expression of *IL8*.

Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*), also known as cyclooxygenase 2, is a key enzyme in prostaglandin biosynthesis, and acts both as a dioxygenase and as a peroxidase. It is regulated by specific stimulatory events, suggesting that it is responsible for the prostanoid biosynthesis involved in inflammation and mitogenesis. The modulation of *PTGS2* gene expression has already been studied in lung cell lines after exposures to 1,2 naphthoquinone or diesel exhaust particles (Ahn *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2012). As in our study, the authors showed an increased of the expression of *PTGS2* after exposure to pollutants. Indeed, exposure of BEAS-2B cells to 1–10 μM of 1,2 naphthoquinone for 0–4 hours resulted in dose- and time-dependent inductions in *PTGS2* (or *COX2*) (Cheng *et al.*, 2012). Similarly, Ahn *et al.* (2008) demonstrated that treatment with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of diesel exhaust particles for 24 h induced the expression of *PTGS2* at both transcriptional and protein levels.

Among the toxic mechanisms induced by nanoparticles, the generation of ROS is the most widely studied (Park *et al.*, 2008). ROS overproduction was observed in cells

treated with C60 fullerenes, SWNTs (single-walled nanotubes), cerium oxide nanoparticles, and other metal particles (Hussain *et al.*, 2005; Green and Howman, 2005; Park *et al.*, 2008; Limbach *et al.*, 2007), and, in particular, in lung cells exposed to iron NP (Keenan *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2012). After nanoparticle exposure, ROS overproduction would exert toxicity either through direct cellular macromolecule alterations (Donaldson *et al.*, 2005; Keenan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Bhattacharya *et al.*, 2012) or through interference in the antioxidant defence system (Xia *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2006). This was confirmed by Khan *et al.* (2012) for iron oxide nanoparticles in various cell types (Apopa *et al.*, 2009; Naqvi *et al.*, 2010; Buyukhatipoglu and Clyne, 2011). In the present study, we also observed a rapid increased of ROS production after iron NP exposure. This over production was maintained up to 3-h exposure. Furthermore, Watanabe *et al.* (2013) showed that iron nanoparticles caused a dose-dependent increase in ROS production with concentrations from 10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in A549 cells.

For further analyses of oxidative stress, we investigated the effects of Fe-NP on MDA production and modulation of glutathione status. In our exposure condition (2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), under conditions compatible with environmental exposures, Fe-NP did not seem to have any effect on lipid peroxidation of membrane (no effect on MDA production) and on the modulation of glutathione status. There are few study on the effects of nanoparticles on the production of MDA in lung cells. Contrary to our study, Ahmad *et al.* (2012), Lin *et al.* (2006) and Radu *et al.* (2010) showed an increased of MDA production after an exposure to, respectively, nanoparticles of granites ($>50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) in IMR90 cells after 6-h exposure, silica nanoparticles ($>10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) in A549 cells after 48-h exposure and hematite nanoparticles ($>12,5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) in MRC-5 cells after 24-h exposure. Concerning the modulation of the glutathione status, some authors studied the level of reduced glutathione (GSH) (Lin *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Radu *et al.*, 2010; Ahamed *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2013). Their results showed a decreased of GSH in all case in lung cells following an exposure to several types of nanoparticles (SiO_2 nanoparticles, TiO_2 nanoparticles, Fe_2O_3 nanoparticles, nickel ferrite nanoparticles, granite nanoparticles and Fe_3O_4 nanoparticles). Globally, these results show the important of (1) the characterization of nanoparticles in their pristine state but also in the suspension medium, (2) the exposure conditions (time, doses, exposure pathway) and the biological model (cell types, characteristics). Each of these parameters can affect the toxicity results and allow us to explain in some cases conflicting results.

In conclusion, Fe-NP could penetrate in HBEC and cause cytotoxicity at high doses. In our study, with low doses of NP (environmentally realistic), we could observe a modulation of expression of gene involved in the inflammation process for 6-h exposure. However, these modifications that need to be confirmed at the protein level, appear not sufficient to induce a significantly measurable oxidative stress. Indeed, for longer times of exposure, lung cells seem to be able to counteract it.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by the Institut de Recherche en Environnement Industriel; the Université de Lille 2; and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais.

The ADEME (the French Agency for Environment and Energy) is acknowledged for their financial support.

We would like to thank Cécile Allet of the BiCeL-IFR114-IMPRT Electron Microscopy Core Facility for access to instruments and technical advice.

We thank Didier Betbeder for access to the Malvern ZetaSizer (Zetasizer II, Malvern Instruments) and the Ecole des Mines in Douai for the determination of specific surface areas of iron nanoparticles.

The authors declare no competing financial interests.

3. Bilan du chapitre 5

Dans ce chapitre, nous avons étudié les effets des nanoparticules de fer, à concentrations environnementales réalistes, sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines. Nous avons ainsi évalué l'impact d'une exposition à des nanoparticules de fer en étudiant leur (1) pénétration, (2) leur cytotoxicité et (3) la modulation de l'expression génique ainsi que (4) le stress oxydant induit.

Nos travaux de recherche ont montré :

- ❖ une pénétration cellulaire des nanoparticules de fer ;
- ❖ une cytotoxicité significative à partir de la DL₅₀ correspondant à une dose de 60 µg.cm⁻².

A faibles concentrations pour être au plus proche de celles rencontrées dans l'environnement, notre étude a montré :

- ❖ une production des espèces réactives de l'oxygène rapidement après l'exposition aux nanoparticules ;
- ❖ une modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation après 6h d'exposition, que les cellules semblent réguler après 24 et 48 h d'exposition,
- ❖ une absence de modification du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit ainsi qu'une absence de peroxydation lipidique.

Les résultats concernant les effets des nanoparticules de fer sur les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines ainsi que nos avancées sur le développement de la cultures primaires en interface air-liquide, nous a permis d'obtenir un financement pour un projet de recherche intitulé « Evaluation des impacts toxicologiques de particules fines (PM_{2,5}) et nanoparticules d'origine environnementale dans la pathogenèse des bronchopneumopathies chroniques (BPCO, asthme) ».

4. Références bibliographiques

- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Siddiqui, M.A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., AlSalhi, M.S. & Alrokayan, S.A. 2011. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*. 283(2-3): 101-108.
- Ahmad, I., Khan, M.I., Patil, G. & Chauhan, L.K.S. 2012. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of micro- and nano-particles of granite on human lung fibroblast cell IMR-90. *Toxicology Letters*, 208: 300-307.
- Ahn, E.K., Yoon, H.K., Jee, B.K., Ko, H.J., Lee, K.H., Kim, H.J. & Lim, Y. 2008. COX-2 expression and inflammatory effects by diesel exhaust particles in vitro and *in vivo*. *Toxicol Lett*, 176(3): 178-87.
- Apopa, P.L., Qian, Y., Shao, R., Guo, N.L., Schwegler-Berry, D., Pacurari, M., Porter, D., Shi, X., Vallyathan, V., Castranova, V., Flynn, D.C. 2009. Iron oxide NPs induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol.*, 6: 1-14.
- Arenz, A., Hellweg, C.E., Stojicic, N., Baumstark-Khan, C. & Grotheer, H.H. 2006. Gene Expression Modulation in A549 Human Lung Cells in Response to Combustion-Generated Nano-Sized Particles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1091: 170-183, doi: 10.1196/annals.1378.064.
- Belade, E., Armand, L., Martinon, L., Kheuang, L., Fleury-Feith, J., Baeza-Squiban, A., Lanone, S., Billon-Galland, M.A., Pairon, J.C. & Boczkowski, J. 2012. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol In Vitro*, 26(1): 57-66.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P.F., Hoffmann, E. & Dopp, E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(17): doi:10.1186/1743-8977-6-17.
- Bhattacharya, K., Hoffmann, E., Schins, R.F., Boertz, J., Prantl, E.M., Alink, G.M., Byrne, H.J., Kuhlbusch, T.A., Rahman, Q., Wiggers, H., Schulz, C. & Dopp, E. 2012. Comparison of micro- and nanoscale Fe⁺³-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicol Sci*, 126(1): 173-82.

- Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Muhlfeld, C., Schmid, O., Ferron, G.A., Maier, K.L., Gehr, P. & Lenz, A.G.** 2010. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1): 56-65.
- Brinckerhoff, C.E., Rutter, J.L. & Benbow, U.** 2000. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res*, 6: 4823-4830.
- Buyukhatipoglu, K & Clyne, A.M.** 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J Biomed Mater Res A*, 96:187-195.
- Cañete, M., Soriano, J., Villanueva, A., Roca, A.G., Veintemillas, S., Serna, C.J., Miranda, R. & Del Puerto Morales, M.** 2010. The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: a morphological approach. *Int J Mol Med*, 26(4):533-9.
- Card, J.W. & Magnuson, B.A.** 2010. A Method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology*, 29(4): 402-410.
- Champion, Y. & Bigot, J.** 1996. Preparation and characterization of nanocrystalline copper powders. *Scripta Materialia*, 35(4): 517-522.
- Cheng, W.Y., Currier, J., Bromberg, P.A., Silbajoris, R., Simmons, S.O. & Samet J.M.** 2012. Linking Oxidative Events to Inflammatory and Adaptive Gene Expression Induced by Exposure to an Organic Particulate Matter Component. *Environ Health Perspect*, 120(2): 267-274.
- Choi, S.J., Oh, J.M. & Choy, J.H.** 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 463-471.
- Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F. & Lo-Guidice, J.M.** 2012. Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(10), 1953-1965.
- Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R. & Betbeder, D.** 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*, 21(35): 355102.

- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W. & Stone, V.** 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 2(10): doi:10.1186/1743-8977-2-10.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C.M., Andersson, P.O., Lejon, C., Österlund, L. & Bucht, A.** 2012. Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*, 6(6): 623–634.
- Eom, H.J. & Choi, J.** 2011. SiO₂ Nanoparticles Induced Cytotoxicity by Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cell, Beas-2B. *Environmental Health and Toxicology*, 26: e2011013.
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K. & Kitani, A.** 2006. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nat Med*, 12(1): 99-106.
- Foldbjerg, R., Irving, E.S., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Thorsen, K., Autrup, H. & Beer, C.** 2012. Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicological sciences*, 130(1): 145–157.
- Foley, C.J., Fanjul-Fernández, M., Bohm, A., Nguyen, N., Agarwal, A., Austin, K., Koukos, G., Covic, L., López-Otín, C. & Kuliopulos, A.** 2013. Matrix metalloprotease 1a deficiency suppresses tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2013.157.
- Foley, C.J., Luo, C., O'Callaghan, K., Hinds, P.W., Covic, L. & Kuliopulos, A.** 2012. Metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. *J Biol Chem*, 287(29): 24330-24338.
- Foster, K.A., Galeffi, F., Gerich, F.J., Turner, D.A. & Muller, M.** 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 79: 136–171.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E. & Shirali, P.** 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology in vitro*, 20: 519-528.
- Gilbert, B., Fakra, S.C., Xia, T., Pokhrel, S., Mädler, L. & Nel, A.E.** 2012. The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 6(6): 4921-4030.

- Green, M. & Howman, E.** 2005. Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. *Chem. Commun.* 121: 121–123.
- Gupta, A.K., Berry, C., Gupta, M. & Curtis, A.** 2003. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Trans Nanobiosci*, 2: 256-261.
- Gupta A.K. & Wells, S.** 2004. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobiosci*, 3: 66-73.
- He, Y., Wan, J. & Tokunaga, T.** 2008. Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(2): 321e332.
- Herten, M., Rothamel, D., Schwarz, F., Friesen, K., Koegler, G. & Becker, J.** 2009. Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig*, 13(2):149-55.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Casey, A., Davoren, M., Lenz, A.G., Maier, K.L., Duschl, A. & Oostingh, G.J.** 2009a. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 234(3): 378-90.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A., Oostingh, G.J.** 2009b. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 276–281.
- Hu, J., Chen, G. & Lo, I.M.C.,** 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Research*, 39(18): 4528.
- Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L., Martens, J, Billon-Galland, M.A., Fleury-Feith, J., Moisan, F., Pairon, J.C. & Marano, F.** 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260: 142–149.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J.** 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19: 975–983.

- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O. & Zuzana Cervinkova, Z.** 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1382–1387.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. & Möller, L.**, 2008b. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, 21: 1726–1732.
- Kasaian, M.T., Raible, D., Marquette, K., Cook, T.A., Zhou, S., Tan, X.Y. & Tchistiakova, L.** 2011. IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13R α 2. *J Immunol*, 187(1):561-9.
- Keenan, C.R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. & Sedlak, D.L.** 2009. Oxidative Stress Induced By Zero-Valent Iron Nanoparticles And Fe(II) In Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Sciences And Technology*, 43: 4555-4560.
- Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A.H., Chauhan, L.K.S. & Ahmad, I.** 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33: 1477-1488.
- Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M. & Chung, K.H.** 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat Res*, 726(2): 129-135.
- Konczol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski R., Giere, R., Grobety, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. & Mersch-Sundermann, V.** 2011. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 1460–1475.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q.** 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3): 165-168.
- Kumar, A., Sahoo, B., Montpetit, A., Behera, S., Lockey, R. F. & Mohapatra, S. S.** 2007. Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides. *Nanomedicine*, 3: 132–137.

- Lamaison, L.** 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
- Ledoux, L., Laversin, H., Courcot, D., Courcot, L., Zhilinskaya, E.A., Puskaric, E. & Abouhaï, A.** 2006. Characterization of iron and manganese species in atmospheric aerosols from anthropogenic sources. *Atmospheric Research*, 82: 622-632.
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., Stark, W.J.** 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Sciences and Technology*, 41: 4158-4163.
- Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D. & Ma Y.** 2006. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 252-259.
- Lindner, D., Zietsch, C., Becher, P.M., Schulze, K., Schultheiss, H.P., Tschöpe, C. & Westermann, D.** 2012. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int*, 2012:875742.
- Lowry, G.V. & Johnson, K.M.** 2004. Congener-Specific Dechlorination of Dissolved PCBs by Microscale and Nanoscale Zerovalent Iron in a Water/Methanol Solution. *Environmental Science & Technology*, 38(19): 5208-5216.
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M.A. & Hosseinkhani, M.** 2011. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano*, doi:10.1021/nn2021088.
- Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure, J. & Bernard, N.** 2010. Relationship of atmospheric pollution characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to microbial communities living in bryophytes at three differently polluted sites (rural, urban, and industrial). *Microbial Ecology*, 59: 324-334; DOI 10.1007/s00248-009-9580-2.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B. & Donaldson, K.** 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med*, 64(9): 609-615.

- Muhlfeld, C., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** 2008. Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss Medical Weekly*, 138: 387–391.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D.** 2007. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M.Z., Ahmed, F.J., Maitra, A.N., Prashant, C.K. & Dinda, A.K.** 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*, 5: 983-989.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, 113: 823–839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W. & Cox, C.** 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16(6-7): 437-45.
- Otero-González, L., Sierra-Alvarez, R., Boitano, S. & Field, J. A.** 2012. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*, 46(18):10271-8.
- Park, E.J., Choi, J., Park, Y.K. & Park, K.** 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1-2): 90-100.
- Patil, G., Khan, M.I., Patel, D.K., Sultana, S., Prasad, R. & Ahmad, I.** 2012. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells A(549). *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(2): 436-45.
- Paur, H.R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hanninen, O., Kasper, G., Riediker, M., Rothen-Rutishauser, B. & Schmid, O.** 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science*, 42: 668-692.

- Petitot, F., Lestaevel, P., Tournalias, E., Mazzucco, C., Jacquinet, S., Dhieux, B., Delissen, O., Tournier, B.B., Gensdarmes, F., Beaunier, P. & Dublineau, I.** 2013. Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats. *Toxicol Lett*, 217(3): 217-25.
- Radu, M., Munteanu, M.C., Petrache, S., Serban, A.I., Dinu, D., Hermenean, A., Sima, C. & Dinischiotu, A.** 2010. Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochim Pol*, 57(3): 355-60.
- Sayes, C., Wahi, R., Kurian, P., Liu, Y., West, J., Ausman, K., Warheit, D.B. & Colvin, V.L.** 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 92: 174–185.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., Van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P.J. & Schins, R.P.** 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222: 141–151.
- Suliman, Y.A.O., Ali, D., Alarifi, S., Harrath, A.H., Mansour, L. & Alwasel, S.H.** 2013. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells. *Environ Toxicol.*, doi: 10.1002/tox.21880.
- Trivedi, V., Boire, A., Tchernychev, B., Kaneider, N. C., Leger, A. J., O'Callaghan, K., Covic, L. & Kuliopulos, A.** 2009. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*, 137: 332–343.
- Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, M., Pohl, C., Baldi, G., Unger, R.E. & Kirkpatrick, C.J.** 2009. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol*, 6:18.
- Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z. & Muhammed, M.** 2006. Fe₃O₄ and [gamma]-Fe₂O₃ nanoparticles for the adsorption of Co²⁺ from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 298(2): 501-7.
- Veranth, J., Kaser, E., Veranth, M., Koch, M. & Yost, G.** 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*, 4:2.

- Watanabe, M., Yoneda, M., Morohashi, A., Hori, Y., Okamoto, D., Sato, A., Kurioka, D., Nittami, T., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., Kawai, K., Kasai, H. & Totsuka, Y.** 2013. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci*, 14(8): 15546-60.
- Wei-xian, Z.** 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nanoparticle Research*, V5(3): 323.
- Witschger, O. & Fabriès, J.F.** 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *INRS, hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires*, 21-35.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J.N., Li, N., Venkatesen, M.I., Sioutas, C. & Nel, A.** 2004. Quinones and aromatic chemicals compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 112: 1347–1358.
- Zhang, H., Xia, T., Meng, H., Xue, M., George, S., Ji, Z., Wang, X., Liu, R., Wang, M., France, B., Rallo, R., Damoiseaux, R., Cohen, Y., Bradley, K.A., Zink, J.I., Nel, A.E.** 2011. Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 5(4): 2756-2769.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

1. Conclusion

Dans les pays industrialisés, nous assistons à un essor considérable des nanotechnologies et à l'utilisation croissante de nanoparticules créant une course scientifique et commerciale assimilable à une révolution technologique (Auffan, 2007). Avec l'utilisation croissante de nanoparticules dans différents domaines d'activités (automobile, cosmétologie, remédiation de l'environnement, etc.), le risque de relargage dans l'environnement est aussi accru. Parallèlement, des études ont montré la présence de nanoparticules dans l'atmosphère provenant de rejets urbano-industriels, non intentionnels. La proportion de ces dernières augmente avec l'utilisation, dans l'industrie, de filtres de plus en plus efficaces (Muller *et al.*, 2007), retenant les particules micrométriques mais pas les particules nanométriques. Avec ce constat, il est légitime de s'interroger sur leurs impacts environnementaux et sanitaires. Malgré le développement des études toxicologiques et écotoxicologiques, les connaissances des effets biologiques des nanoparticules sont encore limités à cause de la diversité des types de nanoparticules et de leurs propriétés particulières. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches sur les impacts de ces « nouveaux » aérocontaminants sur différentes cibles potentielles. Pour cela, les plantes, et en particulier les bryophytes, premiers organismes à être exposés à des retombés atmosphériques nanoparticulaires, sont d'excellentes sentinelles utilisées depuis des années dans des études de biosurveillance de la qualité de l'air. Parallèlement, ces nanoparticules présentes dans l'air n'impactent pas uniquement les écosystèmes mais aussi la population humaine, par l'intermédiaire de la fonction respiratoire.

C'est dans cette optique que ces recherches ont été menées. Plusieurs axes de recherche ont été définis :

- ❖ caractériser les nanoparticules manufacturées de fer et étudier les modifications de leur surface suite une immersion dans différents milieux biologiques,
- ❖ étudier leurs effets, à des concentrations faibles proches de celles rencontrées dans l'environnement, sur deux cibles potentielles, les bryophytes (*Physcomitrella patens*) dans le cadre d'études d'écotoxicité et l'Homme (cultures primaires de cellules pulmonaires) dans le cadre d'études de toxicité.

Pour cela, nous avons utilisé des nanoparticules de fer fabriquées par le laboratoire Métaux et Céramique à Microstructures Contrôlées (MCMC) représentatives des nanoparticules de fer présentes dans les fumées de rejets industriels (Hervé-Bazin, 2007).

Notre analyse bibliographique nous a permis de mettre en avant les points importants à prendre en compte lors d'études de nanotoxicologie et/ou de « *plant nanotoxicology* » :

- ❖ la caractérisation des nanoparticules à leur état brut mais aussi dans leur milieu de dispersion, ce dernier pouvant modifier les caractéristiques et donc la réactivité des nanoparticules,
- ❖ les conditions d'expositions (temps, doses, voies d'exposition, etc.),
- ❖ les modèles biologiques (espèces, caractéristiques et stade de développement).

Nous avons montré la nécessité d'une approche transversale et transdisciplinaire dans des études de nanotoxicologie (figure 72).

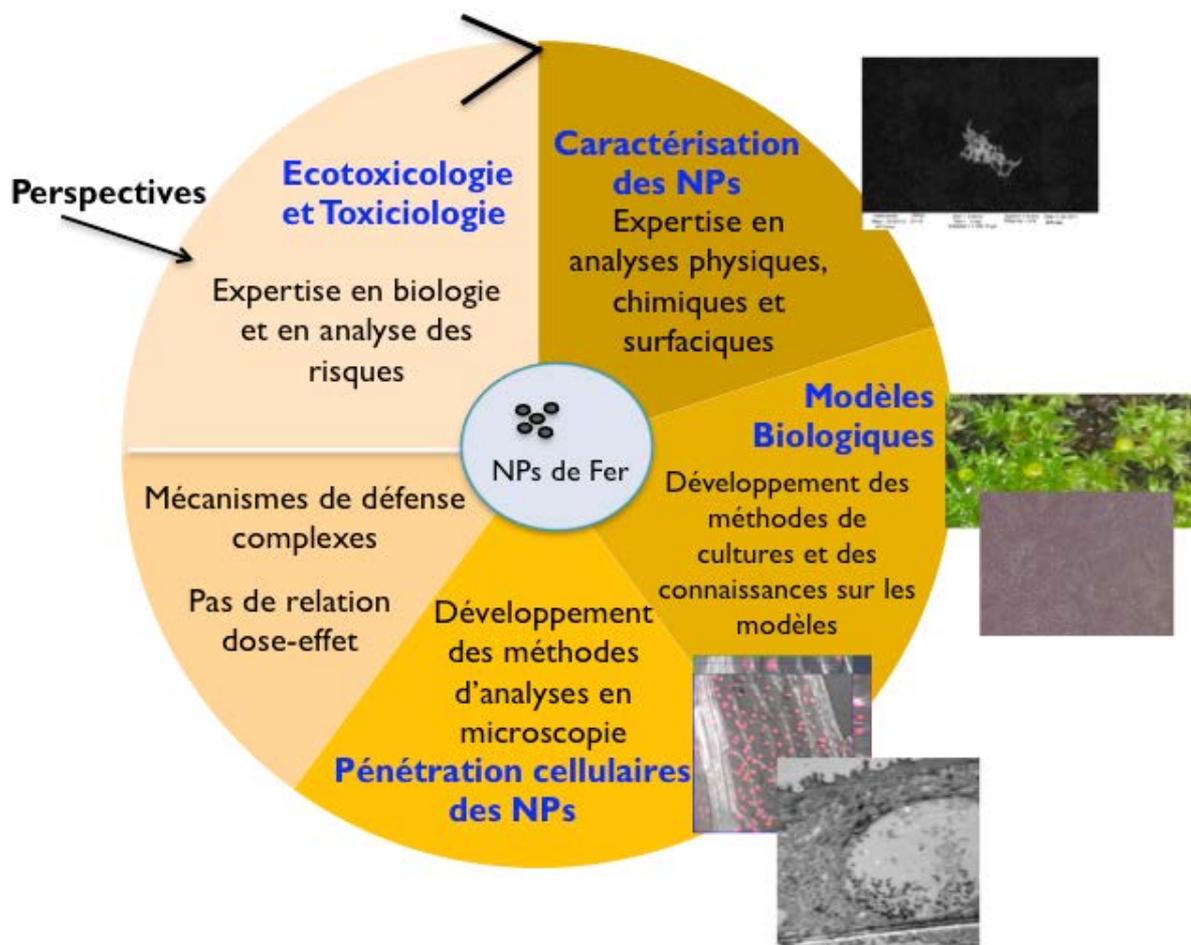


Fig. 72 : Approche transversale et transdisciplinaire nécessaire lors des études de nanotoxicologie et/ou de « *Plant nanotoxicology* » - NPs : nanoparticules

1.1. La caractérisation des nanoparticules

Nous avons défini les principaux caractères des nanoparticules manufacturées de fer utilisées, avec une attention particulière portée à la composition de la surface influençant leur réactivité. Nous avons pu mettre en évidence un impact important de

l'environnement (ou milieu de dispersion) des nanoparticules sur leur surface. En effet, l'eau de Volvic et l'HBSS sont relativement inertes envers l'oxydation surfacique des nanoparticules. En revanche, le milieu de culture des cellules pulmonaires (B-Ali ou BEGM) est beaucoup plus oxydant augmentant la couche d'oxyde de 1 nm après 48h d'immersion. Ces différents milieux entraînent aussi des modifications de la composition de la surface. Elle se compose de 71% de Fe₂O₃ et 29% de FeOH₃; de 55% de Fe₂O₃ et 45%; et de 28% de Fe₂O₃, 55% de FeOOH/FeOCl et 17% de FeOH₃ après, respectivement, un passage dans l'eau de Volvic, l'HBSS et le B-Ali (ou BEGM). Enfin, ces changements de cristallinité ont provoqué des effets sur l'adsorption de la molécule d'ADN à la surface des nanoparticules, avec une adsorption plus importante de la molécule sur les nanoparticules les plus oxydées.

1.2. Les effets biologiques des nanoparticules manufacturées de fer sur des modèles végétaux et humains

Le caractère novateur de cette étude réside dans notre approche pluridisciplinaire alliant la caractérisation physico-chimique mais aussi la toxicologie et l'écotoxicologie. En effet, après une caractérisation complète des nanoparticules de fer, nos travaux nous ont permis d'étudier les effets de celles-ci sur deux cibles potentielles : les plantes au travers les bryophytes et l'Homme au travers les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines.

Dans le cadre de nos études d'écotoxicité, nous avons vérifié l'internalisation foliaire de nos nanoparticules de fer, même agglomérées, chez *Physcomitrella patens* suite à une exposition par dépôt humide. Mais malgré cette pénétration cellulaire, nous n'avons pas montré de phytotoxicité, ni d'induction d'un stress oxydant important suite à une exposition à des concentrations faibles proches de celles rencontrées dans l'environnement. En effet, suite à cette exposition nanoparticulaire, les niveaux d'ATP n'ont pas été diminués et ont même été légèrement augmentés, ce qui peut suggérer une mise en place des systèmes de défense de la plante. De même, les ROS, et les biomarqueurs comme le glutathion et le malondialdéhyde n'ont pas été significativement impactés. La rapide mais faible augmentation des ROS a été contrôlée par l'organisme. De même, nous avons pu constater une légère diminution du ratio GSSG/GSH, pouvant correspondre à une « surcompensation ». Le phénomène conduit à la formation de GSH au niveau de plantes adaptées au stress oxydant témoignant une forte activation des systèmes antioxydants. Cela pourrait ainsi expliquer le contrôle rapide des ROS.

Dans le cadre de nos recherches, l'internalisation des nanoparticules de fer au niveau cellulaire a également été vérifiée. Nous avons observé une cytotoxicité significative à partir de la DL₅₀ soit 60 µg.cm⁻². Désireux de travailler avec une dose environnementale réaliste, nous avons choisi la DL₁₀ assortie d'un facteur de sécurité, soit 2 µg.cm⁻². En utilisant cette dose, nos travaux de recherche ont montré une

augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'une modulation de l'expression de certains gènes impliqués dans l'inflammation, principalement, après 6h d'exposition. Les cellules ont semblé capables de maîtriser cette modulation après 24 h et 48 h d'exposition. Mais nous n'avons pas mis en évidence de modulation significative des biomarqueurs comme le ratio GSSG/GSH et le MDA.

En conclusion, une exposition à des nanoparticules de fer à des concentrations environnementales réalistes ne semble pas avoir d'effet majeur sur *Physcomitrella patens* et ni au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines.

2. Perspectives

Ces travaux ouvrent des perspectives de recherche sur (1) les effets des nanoparticules métalliques modèles permettant de les comparer à ceux (2) de nanoparticules environnementales correspondant à un cocktail de polluants aussi bien métalliques qu'organiques. Ces études devront être complétées avec une caractérisation complète des nanoparticules afin de pouvoir allier effets et caractérisation physico-chimique. Dans le cadre de ces études de danger, il est important d'étudier les effets des nanoparticules sur différentes cibles potentielles et de développer des biomarqueurs permettant à l'organisme de nous servir de sentinelle de l'environnement.

Les bryophytes, organismes sentinelles, peuvent continuer à être utilisées dans des études de biosurveillance de la qualité de l'air. Il serait aussi intéressant de déterminer les mécanismes d'action des nanoparticules et notamment, ceux de pénétration cellulaire et ceux sur le stress oxydant. De même, les études de toxicogénomique méritent d'être continuées afin de développer un ou des biomarqueurs témoignant d'une exposition nanoparticulaire. Enfin, pour mimer au mieux une exposition environnementale, il serait aussi nécessaire d'effectuer des expositions répétées pour étudier les effets des nanoparticules sur le court et le long terme.

Les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines se sont révélées être des modèles intéressants pour l'étude des effets des nanoparticules métalliques. En développant des études en toxicogénomique, la découverte de la modulation d'un ou plusieurs gènes spécifiques à une exposition à des nanoparticules permettraient d'en faire des biomarqueurs utilisables dans des études de biosurveillance humaine. De plus, afin de mimer au mieux les mécanismes d'action toxiques des nanoparticules, le développement des méthodes de cultures primaires des cellules épithéliales bronchiques humaines en interface air-liquide continue au sein de notre équipe de recherche.

Au sein d'un groupement de recherche : l'Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI), des équipes, dont la notre, travaillent sur les effets de

la pollution atmosphérique industrielle sur la santé humaine et les écosystèmes. Dans ce contexte, il nous semblait intéressant d'étudier les effets de nanoparticules environnementales sur la santé pulmonaire. Pour cela, nous avons obtenu un financement auprès de la région Nord-Pas de Calais pour un projet sur la toxicité des nanoparticules environnementales, récoltées sur le littoral dunkerquois, au niveau de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de patients sains et ayant des pathologies sous jacentes comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Ces travaux de recherche ont déjà débuté en collaboration avec l'Ecole des Mines de Douai et l'Institut de Chimie et des Matériaux (Equipe Métaux et Céramiques à Microstructures Contrôlées) de Thiais. Ce projet de recherche permettra ainsi de continuer de développer nos connaissances et nos compétences dans ce domaine de recherche.

3. Références bibliographiques

- Auffan, M.** 2007. Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. PhD. thesis, Université Paul Cézanne, Faculté des Sciences et Techniques.
- Hervé-Bazin, B.** 2007. Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?. EDP Sciences.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D.** 2007. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. *In*: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

Bibliographie Générale

- Abbey, D.E., Nishino, N., McDonnell, W.F., Burchette, R.J., Knutsen, S.F., Lawrence Beeson, W. & Yang, J.X.** 1999. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(2): 373-382.
- Aga, E., Samoli, E., Touloumi, G., Anderson, H.R., Cadum, E., Forsbergz, B., Goodman, P., Goren, A., Kotesovec, F., Kriz, B., Macarol-Hiti, M., Medina, S., Paldy, A., Schindler, C., Sunyer, J., Tittanen, P., Wojtyniak B., Zmirou, D., Schwartz, J. & Katsouyanni, K.** 2003. Short-term effects of ambient, particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur Respir J Suppl*, 40: 28-33.
- Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, AlSalhi MS, Alrokayan SA.** 2011. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*, 283(2-3): 101-108.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B. & Alhadlaq, H.A.** 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2): 578-583.
- Ahmad, I., Khan, M.I., Patil, G. & Chauhan, L.K.S.** 2012. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of micro- and nano-particles of granite on human lung fibroblast cell IMR-90. *Toxicology Letters*, 208: 300-307.
- Ahn, E.K., Yoon, H.K., Jee, B.K., Ko, H.J., Lee, K.H., Kim, H.J. & Lim, Y.** 2008. COX-2 expression and inflammatory effects by diesel exhaust particles in vitro and *in vivo*. *Toxicol Lett*, 176(3): 178-87.
- Alagic, S.C., Serbula, S.S., Tosic, S.B., Pavlovic, A.N. & Petrovic, J.V.** 2013. Bioaccumulation of Arsenic and Cadmium in Birch and Lime from the Bor Region. *Arch Environ Contam Toxicol*, DOI 10.1007/s00244-013-9948-7
- Alguacil, M.M., Torrecillas, E., Caravaca, F., Fernandez, D. A., Azcon, R. & Roldan, A.** 2011. The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy-metal-polluted soil. *Soil Biol. Biochem*, 43(7): 1498–1508.
- Alizadeh, M. & Bordbar, S.** 2013. The influence of microstructure on the protective properties of the corrosion product layer generated on the welded API X70 steel in chloride solution. *Corrosion Science*, 70: 170–179.

- Alowitz, M. & Scherer, M.** 2002. Kinetics of Nitrate, Nitrite, and Cr(VI) Reduction by Iron Metal. *Environ Sci Technol.*, 36(3): 299-306.
- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F. & Domingos, M.** 2011. The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histo-cytochemical techniques. *Environmental Pollution*, 159: 3309-3315.
- AFSSET**, 2006. Les nanomatériaux : Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Maisons-Alfort, AFSSET, 253p.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P. & Boczkowski, J.** 2009. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Revue Maladies Respiratoires*. 26: 625-637.
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P. & Boczkowski, J.** 2011. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Revue des Maladies Respiratoires*, 28: e66-e75.
- Apopa, P.L., Qian, Y., Shao, R., Guo, N.L., Schwegler-Berry, D., Pacurari, M., Porter, D., Shi, X., Vallyathan, V., Castranova, V., Flynn, D.C.** 2009. Iron oxide NPs induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol.*, 6: 1-14.
- Arenz, A., Hellweg, C.E., Stojicic, N., Baumstark-Khan, C. & Grotheer, H.H.** 2006. Gene Expression Modulation in A549 Human Lung Cells in Response to Combustion-Generated Nano-Sized Particles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1091: 170–183, doi: 10.1196/annals.1378.064.
- Ashton, N.W. & Cove, D.J.** 1977. The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 154: 87-95.
- Auffan, M.** 2007. Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. PhD. thesis, Université Paul Cézanne, Faculté des Sciences et Techniques.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., DeMeo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R. & Bottero, J.Y.**, 2006. *In Vitro* Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxic Study. *Environ. Sci. Technol.*, 40(14): 4367-4373.
- Auffan, M., Shipley, H.J., Yean, S., Kan, A.T., Tomson, M., Rose, J. & Bottero, J-Y.** 2007; Nanomaterials as adsorbents, *In Environmental nanotechnology – applications and impacts of nanomaterials* ed. M.R. Wiesner and J-Y. Bottero, pp 371-392.

- Baek, M., Chung, H.E., Yu, J., Lee, J.A., Kim, T.H., Oh, J.M., Lee, W.J., Paek, S.M., Lee, J.K., Jeong, J., Choy, J.H. & Choi, S.J.** 2012. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7: 3081-3097.
- Balasubramanian, S.K., Poh, K.W., Ong, C.N., Kreyling, W.G., Ong, W.Y. & Yu, L.E.** 2013. The effect of primary particle size on biodistribution of inhaled gold nanoagglomerates. *Biomaterials*, 34(22):5439-5452.
- Baktur, R., Patel, H. & Kwon, S.** 2011. Effect of exposure conditions on SWCNT-induced inflammatory response in human alveolar epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 1153-1160
- Barandovski, L., Cekova, M., Frontasyeva, M.V., Pavlov, S.S., Stafilov, T., Steinnes, E. & Urumov, V.** 2008. Atmospheric deposition of trace element pollutants in Macedonia studied by the moss biomonitoring technique. *Environ Monit Assess*, 138: 107-118.
- Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sanchez, A. & Puentes, V.** 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75: 850-857.
- Battke, F., Leopold, K., Maier, M., Schidhalter, U. & Schuster, M.** 2008. Palladium exposure of barley uptake and effects. *Plant biology*, 10: 272-276.
- Belade, E., Armand, L., Martinon, L., Kheuang, L., Fleury-Feith, J., Baeza-Squiban, A., Lanone, S., Billon-Galland, M.A., Pairon, J.C. & Boczkowski, J.** 2012. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol In Vitro*, 26(1): 57-66.
- Berg, J.M., Ho, S., Hwang, W., Zebda, R., Cummins, K., Soriaga, M.P., Taylor, R., Guo, B., Sayes, C.M.** 2010. Internalization of carbon black and maghemite iron oxide nanoparticle mixtures leads to oxidant production. *Chem Res Toxicol*, 23(12): 1874-82.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P.F., Hoffmann, E. & Dopp, E.** 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(17): doi:10.1186/1743-8977-6-17.
- Bhattacharya, K., Hoffmann, E., Schins, R.F., Boertz, J., Prantl, E.M., Alink, G.M., Byrne, H.J., Kuhlbusch, T.A., Rahman, Q., Wiggers, H., Schulz, C. & Dopp, E.** 2012. Comparison of micro- and nanoscale Fe⁺³-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro. *Toxicol Sci*, 126(1): 173-82.
- Boers, J.E., Ambergen, A.W. & Thunnissen, F.B.** 1998. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 157 (6 Pt 1): 2000-2006.

- Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank ; F., Gehr P. & Muhlfeld, C.** 2009. Particles induce apical plasma membrane enlargement in epithelial lung cell line depending on particle surface area dose. *Respir. Res.*, 10: 22.
- Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Muhlfeld, C., Schmid, O., Ferron, G.A., Maier, K.L., Gehr, P. & Lenz, A.G.** 2010. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1): 56-65.
- Brauer, M., Amann, M., Burnett, R.T., Cohen A., Dentener, F., Ezzati, M., Henderson, S.B., Krzyzanowski, M., Martin, R.V., Van Dingenen, R., Van Donkelaar, A. & Thurston, G. D.**, 2012. Exposure assessment for estimation of the global burden of disease attributable to outdoor air pollution. *Environmental Science and Technology*, 46(2): 652-660; DOI: 10.1021/es2025752.
- Brinckerhoff, C.E., Rutter, J.L. & Benbow, U.** 2000. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res*, 6: 4823-4830.
- Briggs, D. & Seah, M.P.** 1990. Practical Surface Analysis. Volume 1. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy" D, Briggs and M.P. Seah (Ed.). John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E.** 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 309-319.
- Brunekreef, B. & Holgate, S.T.** 2002. Air pollution and health. *Lancet*, 360(9341):1233-1242.
- Burklew, C.E., Ashlock, J., Winfrey, W.B. & Zhang, B.** 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PLOS One*, 7(5): e34783.
- Buseck, P.R. & Adachi, K.** 2008. Nanoparticles in the atmosphere. *Elements*, 4: 389-394.
- Buyukhatipoglu, K & Clyne, A.M.** 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J Biomed Mater Res A*, 96:187-195.
- Cañete, M., Soriano, J., Villanueva, A., Roca, A.G., Veintemillas, S., Serna, C.J., Miranda, R. & Del Puerto Morales, M.** 2010. The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: a morphological approach. *Int J Mol Med*, 26(4):533-9.
- Canivet, L. & Denayer, F.O.** 2011. Staining of protonemal cells of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. For better highlighting micronuclei in bryophytes. *Cryptogamie, Bryologie*, 32(3): 211-220.

- Canivet, L., Dubot, P. & Denayer, F.O.** 2014 Atmospheric foliar iron engineered nanoparticle uptake by *Aphanorrhagma patens* (Hedw.) Lindb. *Journal of Bryology*, article accepted
- Card, J.W. & Magnuson, B.A.** 2010. A Method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. *International Journal of Toxicology*, 29(4): 402-410.
- CITEPA**, 2012. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France – Series sectorielles et analyses étendues. CITEPA, Paris, 336 p.
- Chai, L., Wang, Y., Zhai, N., Yang, W. & You, X.** 2013. Sulfate-doped Fe₃O₄/Al₂O₃ nanoparticles as a novel adsorbent for fluoride removal from drinking water. *Water research*, 47: 4040-4049.
- Champion, Y. & Bigot, J.** 1996. Preparation and characterization of nanocrystalline copper powders. *Scripta Materialia*, 35(4): 517-522.
- Chan, R.W.Y., Yuen, K.M., Yu, W.C.L., Ho, C.C.C., Nicholls, J.M., Peiris, J. S. M. & Chan, M.C.W.**, 2010. Influenza H5N1 and H1N1 Virus Replication and Innate Immune Responses in Bronchial Epithelial Cells Are Influenced by the State of Differentiation. *PLoS ONE*, 5(1): e8713. doi:10.1371/journal.pone.0008713.
- Chen, J., Shao, R., Zhang X.D. & Chen C.** 2013. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2677-2688.
- Cheng, W., Ping, Y., Zhang, Y., Chuang, K.H. & Liu, Y.** 2013. Magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for tumor diagnosis. *J Healthc Eng*, 4(1):23-45.
- Cheng, W.Y., Currier, J., Bromberg, P.A., Silbajoris, R., Simmons, S.O. & Samet J.M.** 2012. Linking Oxidative Events to Inflammatory and Adaptive Gene Expression Induced by Exposure to an Organic Particulate Matter Component. *Environ Health Perspect*, 120(2): 267–274.
- Chivasa, S., Murphy, A.M., Hamilton, J.M., Lindsey, K., Carr, J.P. & Slabas, R.** 2009. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *The Plant Journal*, 60: 436-448.
- Cho, W.S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J.** 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 16–24.
- Choel, M.** 2005. Analyse quantitative des particules atmosphériques par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie d'émission X. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en Chimie analytique de l'Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, 209p.

Choi, S.J., Oh, J.M. & Choy, J.H. 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 463-471.

Commisariat de l'Energie Atomique, Du monde macroscopique au nanomonde, ou l'inverse...[2005] [accessed Aout 2013]. Available at: www.cea.fr/content/download/3168/15109/file/tableau-A.pdf

Commission Internationale pour la Protection Radiologique (CIPR), 1994. Publication 66: Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford, Pergamon, 24(1-3), 482 p.

Comité de la Prévention et de la Précaution, 2006. Nanotechnologies, nanoparticules - Quels dangers, quels risques ?. Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris, 64p.

Cooney D.J. & Hickey A.J. 2011. Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction. *Toxicology in vitro*, 25: 1953-1965.

Corbo, G.M., Forastiere, F., Dell'Orco, V., Pistelli, R., Agabiti, N., De Stefanis, B., Ciappi, G. & Perucci, C.A. 1993. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol* 92(4): 616-23.

Corredor, E., Testillano, P.S., Coronado, M.J., Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Marquina, C., Ibarra, M.R., M De La Fuente, J., Rubiales, D., Perezde-Luque, A. & Risueño, M.C., 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *BMC Plant Biology*, 9(45): doi:10.1186/1471-2229-9-45.

Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F. & Lo-Guidice, J.M. 2012. Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(10), 1953-1965

Cove, D. & Quatrano, R.S. 2006. Agravitropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* do not complement mutants having a reversed gravitropic response. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1379-1387.

Cwiertny, D. M., Hunter, G. J., Pettibone, J. M., Scherer, M. M. & Grassian V. H. 2009. Surface chemistry and dissolution of alpha-FeOOH nanorods and microrods: Environmental implications of size-dependent interactions with oxalate. *J Phys Chem C*, 113(6): 2175-2186, DOI: 10.1021/jp807336t.

Dallmann, T.R., De Martini, S.J., Kirchstetter, T.W., Herndon S.C., Onasch T.B., Wood, E.C. & Harley, R.A. 2012. On-road measurement of gas and particle phase pollutant emission factors for individual heavy-duty diesel trucks. *Environmental Science and Technology*, 46(15): 8511-8518 ; DOI: 10.1021/es301936c.

- Denayer, F.O.** 2000. Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes, Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. PhD thesis, Université de Metz.
- Deng, X., Jia, G., Wang, H., Sun, H., Wang, X., Yang, S., Wang, T. & Liu, Y.** 2007. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon*, 45: 1419–1424.
- De Vos, R.C.H., Vonk, M.J., Vooijs, R. & Schat, H.** 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology*, 98: 853-858.
- Dhar, S., Reddy, E.M., Shiras, A., Pokharkar, V. & Prasad B.L.** 2008. Natural gum reduced/stabilized gold nanoparticles for drug delivery formulations. *Chemistry*, 14: 10244–10250.
- Dias, A. M., Hussain, A., Marcos, A. S. & Roque, A. C.** 2011. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnol Adv.*, 29(1): 142-155.
- Dietz, K.J. & Herth, S.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11): 582-589.
- Dockery, D.W., Pope, C.A. III, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G. Jr & Speizer, F.E.** 1993. An association between air pollution and mortality in six US cities. *New Engl J Med*, 329: 1753-1759.
- Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R. & Betbeder, D.** 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*, 21(35): 355102.
- Dominici, F., Peng, R.D., Zeger, S.L., White, R.H. & Samet, J.M.** 2007. Particulate air pollution and mortality in the United States: did the risks change from 1987 to 2000? *Am J Epidemio*, 166(8): 880- 888.
- Donaldson, K., Stone, V., Gilmour, P.S. Brown, D.M. & Macnee, W.** 2000. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Phil. Trans. R. Soc. London. A.358*: 2741-2749.
- Donaldson, K. & Tran, C.L.** 2002. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol.*, 14: 5–27.

- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W. & Stone, V.** 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 2(10): doi:10.1186/1743-8977-2-10
- Doshi, R., Braidia, W., Christodoulatos, C., Wazne, M. & O'Connor, G.** 2008. Nano-aluminum: transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environ Res*, 106: 296–303.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. & Goldbach, H.E.** 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiology Plant*, 134: 151-160.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C.M., Andersson, P.O., Lejon, C., Österlund, L. & Bucht, A.** 2012. Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*, 6(6): 623–634.
- Ellefsen, P. & Tos, M.** 1972. Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae. *Anatomischer Anzeiger*, 130(5): 501-520.
- Elliott, D. & Zhang, W.** 2001. Field Assessment of Nanoscale Bimetallic Particles for Groundwater Treatment. *Environ Sci Technol.*, 35(24): 4922–4926.
- Englert, N.** 2004. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters* 149: 235–242.
- Eom, H.J. & Choi, J.** 2011. SiO₂ Nanoparticles Induced Cytotoxicity by Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cell, Beas-2B. *Environmental Health and Toxicology*, 26: e2011013.
- Eunil, L., Oh, E., Lee, J., Sun, D. & Lee, J.** 2004. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological Sciences*, 81: 121-132.
- Faburé, J.** 2009. Etude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 301p.
- Faburé, J., Meyer, C., Denayer, F., Gaudry, A., Gilbert, D. & Bernard, N.** 2010. Accumulation capacities of particulate matter in an acrocarpous and a pleurocarpous moss exposed at three differently polluted sites (industrial, urban and rural). *Water Air Soil Pollution*, 212: 205-217.
- Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A.A., Al-Khedhairi, A.A., Hegazy, A.K. & Musarrat J.** 2013. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. *Journal of Hazardous Materials*, 250– 251: 318– 332

- Frateur, I., Lartundo-Rojas, L., Méthivier, C., Galtayries, A. & Marcus, P.** 2006. Influence of bovine serum albumin in sulphuric acid aqueous solution on the corrosion and the passivation of an iron-chromium alloy. *Electrochem Acta*, 51: 1550-1557.
- Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J. & Lin, X.** 2013. The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environmental Science and Technology*, 47: 9496-9504.
- Fernandez, V. & Eichert, T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews Plant Sciences*, 28: 36-68.
- Ferreira, A.J., Cemlyn-Jones, J. & Robalo-cordero, C.** 2013. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. *Rev Port Pneumol*, 19(1): 28-37.
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K. & Kitani, A.** 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*, 12(1): 99-106.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A. & Ehwald, R.** 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell wall is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturan II. *Plant Physiology*, 121: 829-838.
- Foldbjerg, R., Dang, D.A. & Autrup, H.** 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*, 85(7): 743-50.
- Foldbjerg, R., Irving, E.S., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Thorsen, K., Autrup, H. & Beer, C.**, 2012. Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicological sciences*, 130(1): 145-157.
- Foley, C.J., Fanjul-Fernández, M., Bohm, A., Nguyen, N., Agarwal, A., Austin, K., Koukos, G., Covic, L., López-Otín, C. & Kuliopulos, A.** 2013. Matrix metalloprotease 1a deficiency suppresses tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2013.157.
- Foley, C.J., Luo, C., O'Callaghan, K., Hinds, P.W., Covic, L. & Kuliopulos, A.** 2012. Metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. *J Biol Chem*, 287(29): 24330-24338.
- Fontan, J., Masclat, P., Montagne, X., Quisefit, J-P., Tymen, G. & Weill, A.** 2005. Les particules : caractérisation pour les problèmes de santé. *Pollution atmosphérique*, 188: 469-474.

- Foster, K.A., Galeffi, F., Gerich, F.J., Turner, D.A. & Muller, M.** 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 79: 136–171.
- Fowler, R., Vllasaliu, D., Falcone, F.H., Garnett, M., Smith, B., Horsley, H., Alexander, C. & Stolnik, S.** 2013. Uptake and transport of B12-conjugated nanoparticles in airway epithelium. *J Control Release*, 172(1):374-381.
- Frank, W., Ratnadewi, D. & Reski, R.** 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220: 384–394.
- Gallego, S.M., Benavidesn M.P. & Tomaro, M.L.** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*. 121: 151-159.
- Gamble, J.F. & Lewis, R.J.** 1996. Health and respirable particulate (PM10) air pollution: a causal or statistical association? *Environ Health Perspect*, 104(8): 838-850.
- Gao, F.Q., Hong, F.H., Liu, C., Zheng, L., Su, M.Y., Wu, X., Yang, F., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Mechanism of nano-anatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach - Inducing complex of Rubisco-Rubisco activase. *Biological Trace Element Research*, 111(1-3): 239-253.
- Gao, F.Q., Liu, C., Qu, C.X., Zheng, L., Yang, F., Su, M.G. & Hong, F.H.** 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO₂ treatment related to the changes of Rubisco activase? *Biometals*, 21(2): 211-217.
- Gao, Y.Q., Gao, N.Y., Deng, Y., Gu, J.S., Shen, Y.C. & Wang, S.X.** 2012. Adsorption of microcystin-LR from water with iron oxide nanoparticles. *Water Environ Res*, 84(7): 562-8.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E. & Shirali, P.** 2006. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology in vitro*, 20: 519-528.
- Garrec, J.P. & Van Haluwyn, C.** 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air*. Tech&Doc., Lavoisier.
- Ghafariyan, M.H., Malakouti, F.J., Dadpour, M., Stroeve, P. & Mahmoudi, M.** 2013. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. *Environ. Sci. Technol*, DOI: 10.1021/es402249b.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10): 1253-1262.

- Ghosh, M., J. M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M. & Mukherjee, A.** 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research*, 749: 60-69.
- Gichner, T., Patkov, T., Sz.Kov, J. & Demnerov, K.** 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559: 49-57.
- Gilbert, B., Fakra, S.C., Xia, T., Pokhrel, S., Mädler, L., Nel, A.E.** 2012. The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 6(6): 4921-4030.
- Gombert, S., Galsomies L., Rausch De Traubennerg, C., Leblond, S., Losno, R., Colin J.L. & Charre, B.** 2005. Pollution atmosphérique par les métaux, Biosurveillance des retombées. EDP sciences/ADEME, LesUlis.
- Gonzalez-Melendi, P., Fernandez-Pacheco, R., Coronado, M.J., Corredor, E., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D. & Perezde-Luque, A.** 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101: 187-195.
- Goodman, C.M., Mccusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M.** 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.*, 15: 897-900.
- Green, M. & Howman, E.** 2005. Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. *Chem. Commun.* 121: 121-123.
- Green, T.R., Fisher, J., Stone, M.H., Wroblewski, B.M. & Ingham, E.** 1998. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages *in vitro*. *Biomaterials*, 19: 2297-2302.
- Grosvenor, .P., Kobe, B. A., Biesinger, M. C. & McIntyre, N.S.** 2004. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. *Surf Interf Anal.*, 36(12): 1564-1574.
- Guggino, W.B. & Guggino, S.E.** 2000. Amiloride-sensitive sodium channels contribute to the woes of the flu. *PNAS*, 97(18): 9827-9829.
- Gupta, A.K., Berry, C., Gupta, M. & Curtis, A.** 2003. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Trans Nanobiosci*, 2: 256-261.

- Gupta A.K. & Wells, S.** 2004. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobiosci*, 3: 66-73.
- Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrián-García, M.E., De Vizcaya-Ruíz, A., Sordo-Cedeño, M. & Ostrosky-Wegman, P.** 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen*, 47: 199–211.
- Hajj, R., Lesimple, P., Nawrocki-Raby, B., Birembaut, P., Puchelle, E. & Coraux, C.** 2007. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *The Journal of Pathology*, 211(3): 340-350.
- Handy, R.D., Owen, R. & Valsami-Jones, E.** 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315-325.
- Hassan, S.E.D., Boon, E., St-Arnaud, M. & Hijri, M.** 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol. Ecol*, 20(16): 3469–3483.
- He, F. & Zhao, D.** 2005. Preparation and characterization of a new class of starch-stabilized bimetallic nanoparticles for degradation of chlorinated hydrocarbons in water. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 3314–3320.
- He, Y., Wan, J. & Tokunaga, T.** 2008. Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(2): 321e332.
- Herten, M., Rothamel, D., Schwarz, F., Friesen, K., Koegler, G. & Becker, J.** 2009. Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig*, 13(2):149-55.
- Hervé-Bazin, B.** 2007. Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?. EDP Sciences.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Casey, A., Davoren, M., Lenz, A.G., Maier, K.L., Duschl, A. & Oostingh, G.J.** 2009a. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 234(3): 378-90.
- Herzog, E., Byrne, H.J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A., Oostingh, G.J.** 2009b. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 276–281.
- Hilger, I. & Kaiser, W.A.** 2012. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine*, 7(9): 1443-1459.

- Hoek, G, Brunekreef, B, Goldbohm, S, Fischer, P. & Van den Brandt, P.** 2002. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*, 360 (9341): 1203-1209.
- Hohe, A. & Reski, R.,** 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Science*, 163(1): 69-74.
- Horev-Azaria, L., Baldi, G., Beno, D., Bonacchi, D., Golla-Schindler, U., Kirkpatrick, J.C., Kolle, S., Landsiedel, R., Maimon, O., Marche, P.N., Ponti, J., Romano, R., Rossi, F., Sommer, D., Uboldi, C., Unger, R.E., Villiers, C. & Korenstein, R.** 2013. Predictive toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative in-vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Part Fibre Toxicol*, 10: 32.
- Hu, J., Chen, G. & Lo, I.M.C.,** 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Research*, 39(18): 4528.
- Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L., Martens, J, Billon-Galland, M.A., Fleury-Feith, J., Moisan, F., Pairon, J.C. & Marano, F.** 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260: 142-149.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J.** 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19: 975-983.
- INERIS,** 2007. Nanotechnologies, Nanomatériaux, Nanoparticules, Quels impacts ? sur l'homme et l'environnement. INERIS, Verneuil en Halatte, 20p.
- INRS,** 2012. Les nanomatériaux. INRS, 52P.
- Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A.** 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc. Chem. Res.*, 41: 1578-1586.
- Jeffery, P.K. & Li, D.,** 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology.*, 10(7): 1655-1662.
- Jerrett, M., Buzzelli, M., Burnett, R.T. & DeLuca, P.F.** 2005. Particulate air pollution, social confounders, and mortality in small areas of an industrial city. *Soc Sci Med*, 60 (12): 2845-2863.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P.** 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res*, 11: 77-89. DOI: 10.1007/s11051-008-9446-4.

- Jiang, W., Chen, X., Niu, Y. & Pan, B.** 2012. Spherical polystyrene-supported nano-Fe₃O₄ of high capacity and low-field separation for arsenate removal from water. *Journal of Hazardous Materials*, 243: 319–325.
- Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V. & Sastry, M.** 2006. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir*, 22: 300–305.
- Kanel, S., Manning, B., Charlet, L. & Choi, H.** 2005. Removal of Arsenic(III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environ. Sci. Technol.*, 39(5): 1291–1298.
- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O. & Zuzana Cervinkova, Z.** 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1382–1387.
- Karlsson, H. L., Holgersson, A. & Moller, L.** 2008a. Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources. *Chem Res Toxicol.*, 21 (3): 726–31.
- Karlsson, H.L, Cronholm, P., Gustafsson, J. & Möller, L.,** 2008b. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, 21: 1726–1732.
- Kasaian, M.T., Raible, D., Marquette, K., Cook, T.A., Zhou, S., Tan, X.Y. & Tchistiakova, L.** 2011. IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13R α 2. *J Immunol*, 187(1):561-9.
- Kaveh, R., Li, Y.S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L. & Van Aken, B.** 2013. Changes in Arabidopsis thaliana gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, DOI: 10.1021/es402209w.
- Keenan, C.R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. & Sedlak, D.L.** 2009. Oxidative Stress Induced By Zero-Valent Iron Nanoparticles And Fe(II) In Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Sciences And Technology*, 43: 4555-4560.
- Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A.H., Chauhan, L.K.S. & Ahmad, I.** 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33: 1477-1488.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z.R., Watanabe, F. & Biris, A.S.** 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10): 3221-3227.

- Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Nedosekin, D.A., Dervishi, E., Biris, A.S., Shashkov, E.V., Galanzha, E.I. & Zharov, V.P.** 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3): 1028-1033.
- Kim, C.S. & Kang, T.C.** 1997. Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 55: 899-905.
- Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M. & Chung, K.H.** 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat Res*, 726(2): 129-135.
- Kim, K.H., Jahan, S. A. & Kabir, E.** 2013. A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma. *Environment International*, 59: 41–52.
- Klancnik, K., Drobne, D., Valant, J. & Dolenc Koce, J.** 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 85-92.
- Konczol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski R., Giere, R., Grobety, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. & Mersch-Sundermann, V.** 2011. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 1460–1475.
- Koppen, G., Toncelli, L.M., Triest, L. & Verschaeve, L.** 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mechanisms of Ageing and Development*, 110: 13–24.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q.** 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3): 165-168.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Moller, W.** 2006. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J. Aerosol Med.*, 19: 74–83.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S. & Moller, W.** 2013. differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Accounts of Chemical Research*, 46(3): 714-722.
- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., Ziesenis, A.** 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health*, 65: 1513-30.

- Kumar, A., Sahoo, B., Montpetit, A., Behera, S., Lockey, R. F. & Mohapatra, S. S.** 2007. Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides. *Nanomedicine*, 3: 132–137.
- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V. & Yadav, S.K.** 2013. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environment*, 461-462: 462-468.
- Kumari, M., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N.** 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of Total Environment*, 407 : 5243-5246.
- Künzli, N., Kaiser, R., Medina, S., Studnicka, M., Chanel, O., Filliger, P., Herry, M., Horak, F. Jr., Puybonnieux-Textier, V., Quénel, P., Schneider, J., Seethaler, R., Vergnaud, J.C., Sommer, H.** 2000. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*, 356 (9232): 795-801.
- Kwon, Y.M., Xia, Z., Glyn-Jones, S., Beard, D., Gill, H.S., Murray, D.W.** 2009. Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages *in vitro*. *Biomed. Mater.*, 4.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C.** 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, *In* : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux, Masson, Paris, 1-9.
- Lamaison, L.** 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
- Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., White, J. C. & Vanek, T.** 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of Hazardous Materials*, 241– 242: 55– 62.
- Landsiedel, R., Fabian, E., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Wohlleben, W., Wiench, K. & Oesch, F.** 2012. Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol*, 86: 1021-1060.
- Lanone, S. & Boczkowski, J.** 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials, molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.*, 6(6): 651-663.
- Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., Jorgensen, T.J.** 2010. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics*. 4: 873–886.

- Lartundo-Rojas, L.** 2007. Influence de l'adsorption de protéine (BSA) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17Cr en solution aqueuse. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Paris VI, Paris, 180p.
- Larue, C.** 2011. Impact de nanoparticules de TiO₂ et de nanotubes de carbone sur les végétaux. Thèse pour l'obtention de grade de docteur d'AgroParisTech, Paris, 296p.
- Larue, C., Khodja, H., Herlin-Boime, N., Brisset, F., Flank, A.M., Fayard, B., Chaillou, S. & Carrière, M.** 2011. Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. *Journal of Physics: Conference Series*, 304: 1-7.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard B., Flank, A.M., Brisset, F. & Carrière, M.** 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*, 431: 197-208.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, RN.** 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.*, 108(6) 2064-2110.
- Ledoux F.** 2003. Les aérosols particulaires atmosphériques sur le Dunkerquois: caractérisations chimiques, physiques, spectroscopiques et évaluation de leur toxicité. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque.
- Ledoux, L., Laversin, H., Courcot, D., Courcot, L., Zhilinskaya, E.A., Puskaric, E. & Abouhaïss, A.** 2006. Characterization of iron and manganese species in atmospheric aerosols from anthropogenic sources. *Atmospheric Research*, 82: 622-632.
- Lee, B., Sarin, L., Johnson, N.C. & Hurt, R.H.** 2009. A Nano-Selenium Reactive Barrier Approach for Managing Mercury over the Life-Cycle of Compact Fluor. *Environ Sci Technol*, 43(15): 5915-5920.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J. & Alvarez P.J.** 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem*, 29(3): 669-675.

- Lenz, A.G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K.L., Eickelberg, O., Stoeger, T. & Schmid, O.** 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Res Int*, 2013: 652632.
- Li, X., Zhang, J. & Gu, H.** 2011. Adsorption and Desorption Behaviors of DNA with Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles. *Langmuir*, 27: 6099-6106.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. and Stark, W.J.,** 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 39(23): 9370.
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., Stark, W.J.** 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Sciences and Technology*, 41: 4158-4163.
- Lin, D. & Xing, B.** 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243–250.
- Lin, D. & Xing, B.** 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 42: 5580-5585.
- Lin, H., Li, H., Cho, H.J., Bian, S., Roh, H.J., Lee, M.K., Kim, J.S., Chung, S.J., Shim, C.K. & Kim D.D.** 2007. Air-Liquid Interface (ALI) Culture of Human Bronchial Epithelial Cell Monolayers as an *In Vitro* Model for Airway Drug Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(2): 341-350.
- Lin, K.S., Dehvari, K., Liu, Y.J., Kuo, H. & Hsu, P.J.** 2013. Synthesis and characterization of porous zero-valent iron nanoparticles for remediation of chromium-contaminated wastewater. *J Nanosci Nanotechnol*, 13(4): 2675-2681.
- Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D. & Ma Y.** 2006. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 252–259.
- Lindner, D., Zietsch, C., Becher, P.M., Schulze, K., Schultheiss, H.P., Tschöpe, C. & Westermann, D.** 2012. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int*, 2012:875742.
- Lira, M.C.B., Santos-Magalhães, N.S., Nicolas, V., Marsaud, V., Silva, M.P.C., Ponchel, G. & Vauthier, C.** 2011. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1): 162-70, DOI:10.1016/j.ejpb.2011.02.013.

- Liu, X., Hurt, R.H. & Kane, A.B.** 2010. Biodurability of single-walled carbon nanotubes depends on surface functionalization. *Carbon*, 48: 1961–1969.
- Lodenius, M.** 2013. Use of plants for biomonitoring of airborne mercury in contaminated areas. *Environmental Research*, 125: 113–123.
- López-Moreno, M.L., De la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videoa, J.R. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ Sci Technol.*, 44(19): 7315–7320.
- Lopez-Souza, N., Favoreto, S., Wong, H., Ward, T., Yagi, S., Schnurr, D., Finkbeiner, W.E., Dolganov, G.M., Widdicombe, J.H., Boushey, H.A. & Avila P.C.** 2009. *In vitro* susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin. Immunol.*, 123 (6): 1384–1390.
- Loriol C.** 2006. Les O-fucosyltransférases - Caractérisation des enzymes bovines et étude préliminaire du rôle de Pofut1 murine dans la différenciation de la cellule musculaire. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'université de limoges, Limoges, 306p.
- Lovern, S.B. & Klaper, R.** 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25: 1132–1137.
- Lowry, G.V. & Johnson, K.M.** 2004. Congener-Specific Dechlorination of Dissolved PCBs by Microscale and Nanoscale Zerovalent Iron in a Water/Methanol Solution. *Environmental Science & Technologie*, 38(19): 5208-5216.
- Lundborg, M., Johard, U., Lastrm, L., Gerde, P. & Camner, P.** 2001. Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environmental Research Section A*, 86: 244-253.
- Lunde, C., Baumann, U., Shirley, N.J., Drew, D.P. & Fincher, G.B.** 2006. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAr) genes in *Physcomitrella patens*: Implications for the evolution of the MDHAR family in plants. *Plant Molecular Biology*, 60: 259–275.
- Lv, L.Z., Tong, C.Q., Yu, J., Han, M. & Gao, J.Q.** 2013. Mechanism of enhanced oral absorption of hydrophilic drug incorporated in hydrophobic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 2709-2717.
- Ma, H., Phillip, L. Williams, P.L., Stephen, A. & Diamond, S.A.** 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85.

- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. & Kolmakov, A.** 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408: 3053–3061.
- Ma, Y., Li, Y. & Wang, F.** 2009. Corrosion of low carbon steel in atmospheric environments of different chloride content. *Corrosion Science*, 51(55): 997–1006.
- Machado, S., Stawinski, W., Slonina, P., Pinto, A.R., Grosso, J.P., Nouws, H.P.A., Albergaria, J.T. & Delerue-Matos, C.** 2013. Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen. *Science of the Total Environment*, 461–462: 323–329.
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M.A. & Hosseinkhani, M.** 2011. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano*, doi:10.1021/nn2021088.
- Manier N.** 2008. Etude d'un nouveau modèle biologique végétal (*Trifolium repens*) en écotoxicologie, applicable aux sols contaminés par les métaux lourds. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 313p.
- Mariet, C., Gaudry, A., Ayrault, S., Moskura, S., Denayer, F. & Bernard, N.** 2011. Heavy metal bioaccumulation by the bryophyte *Scleropodium purum* at three French sites under various influences: rural conditions, traffic, and industry. *Environ Monit Assess*, 174: 107–118
- Martin, A., Lang, D., Hanke, S., Mueller, S., Sarnighausen, E., Vervliet-Scheebaum, M. & Reski, R.** 2009. Targeted gene knockouts reveal overlapping functions of the five *Physcomitrella patens* FtsZ isoforms in chloroplast division, chloroplast shaping, cell patterning, plant development, and gravity sensing. *Molecular Plant*, 2(6): 1359-1372.
- Martinet, Y., Anthoine, D. & Petiet, G.** 1999. Les maladies respiratoires d'origines professionnelles. 2^{ème} édition. Paris, Masson, Collection médecine du travail, 288 p.
- Maouche, K., Polette, M., Jolly, T., Medjber, K., Cloëz-Tayarani, I., Changeux, J.P., Burlet, H., Terryn, C., Coraux, C., Zahm, J.M., Birembaut, P. & Tournier, J.M.** 2009. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *American Journal of Pathology*, 175(5): 1868-1882.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P. & Pospisek, M.** 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 336: 46–50.

- Marusenko, Y., Shipp, J., Hamilton, J.A., Morgan, J.L.L., Keebaugh, M., Hill, H., Dutta, A., Zhuo, X., Upadhyay, N., Hutchings, J., Herckes, P., Anbar, A.D., Shock, E. & Hartnett H.E.** 2013. Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*, 174: 150-156.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H. & Ferjani, E.** 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Science*. 127: 129-137.
- Mengel, K.**, 2002 Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition In Proceedings of the International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants. Tagliavini M., Toselli M., Bertschinger L., Neilsen D. Thalheimer M., Eds.; *International Society Horticultural Science: Leuven, Belgium*, pp 33-47.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., Crapo, J.D.** 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(6): 613-624.
- Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure, J. & Bernard, N.** 2010. Relationship of atmospheric pollution characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to microbial communities living in bryophytes at three differently polluted sites (rural, urban, and industrial). *Microbial Ecology*, 59: 324–334; DOI 10.1007/s00248-009-9580-2.
- Mittmann, F., Dienstbach, S., Weisert, A. & Forreiter, C.** 2009. Analysis of the phytochrome gene family in *Ceratodon purpureus* by gene targeting reveals the primary phytochrome responsible for photo- and polarotropism. *Planta*, 230: 27–37.
- Mody, V.V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H.R.** 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci*, 2(4): 282-289. DOI: 10.4103/0975-7406.72127.
- Möller, W., Felten, K., Sommerer, K., Scheuch, G., Meyer, G., Meyer, P., Häussinger, K. & Kreyling, W.G.** 2008. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med*, 177: 426-32.
- Monica, R.C. & Cremonini, R.** 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62: 161–165.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B. & Donaldson, K.** 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med*, 64(9): 609-615.

- Moore, M.N.** 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32: 967–976.
- Muhlfeld, C., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** 2008. Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss Medical Weekly*, 138: 387–391.
- Mueller, N.C., Braun, J., Bruns, J., Cernik, M., Rissin, P., Rickerby, D. & Nowack, B.** 2012. Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environ Sci Pollut Res*, 19:550–558.
- Muller, D., Mattis, I., Kolgotin, A., Ansmann, A., Wandinger, U. & Althausen, D.** 2007. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In: Singh, U.N., Pappalardo, G., Eds. Lidar technologies, techniques, and measurements for atmospheric remote sensing III. Proceedings of SPIE, volume 6750, SPIE publications, Florence.
- Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface*, 7(Suppl 1): 27-40.
- Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y. & Kumar, D.S.** 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179: 154-163.
- Nali, C., Balducci, E., Frati, L., Paoli, L., Loppi, S. & Lorenzini, G.** 2007. Integrated biomonitoring of air quality with plants and lichens: A case study on ambient ozone from central Italy. *Chemosphere*, 67: 2169–2176.
- Namkung, W., Finkbeiner, W.E. & Verkman, A. S.** 2010. CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 2639–2648.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M.Z., Ahmed, F.J., Maitra, A.N., Prashant, C.K. & Dinda, A.K.** 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int IJ Nanomedicine*, 5: 983-989.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H. & Sigg, L.** 2008. Environmental behaviour and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372–386.
- Navarro, D.A, Bisson M.A. & Aga, D.A.** 2012. Investigating uptake of water-dispersible CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles by Arabidopsis thaliana plants. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212: 427-435.

- Neenu, S., Gareth, J.S., Nelson, B.C., Marquis, B.J., Maffei, T.G.G., Brown, A.P., Williams, P.M., Wright, C.J. & Doak, S.H.** 2012. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33(1): 163-170.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N.** 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B.** 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105(4): 411-414
- Nowack, B. & Bucheli, T.D.** 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150: 5–22.
- Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Bear, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. & Driessen, M.** 2005. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry and kinetics. *Environ Sci Technol*, 39: 1221–1230.
- Nutt, M., Hughes, J. & Wong, M.** 2005. Designing Pd-on-Au Bimetallic Nanoparticle Catalysts for Trichloroethene Hydrodechlorination. *Environ Sci Technol*, 39(5):1346-1353.
- Oberdörster, G., Ferin, J., Finkelstein, G., Wade, P. & Corson, N.** 1990. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles ? II Lung lavage studies. *J Aerosol Sci*, 21: 384-387.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, 113: 823–839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C.** 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following wholebody inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health*, 65: 1531-1543.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W. & Cox, C.** 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16(6-7): 437-45.
- Oberdorster, G., Stone V., Donaldson, K.** 2007. Toxicology of NPs: a historical perspective. *Nanotoxicology*, 1: 2–25

- OCDE**, 2009. Report on preliminary review of OECD test guidelines for their applicability to manufactured nanomaterials. OCDE, 207p.
- OCDE**, 2013. Le Screening Moléculaire et la Toxicogénomique. OCDE (accessed octobre 2013). Disponible at : <http://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/lescreeningmoleculaireetlatoxicogenomique.htm>
- Ogawara, K., Yoshida, M., Furumoto, K., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K. & Kimura T.** 1999. Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats. *J Drug Target*, 7: 213–221.
- Ohno, K., Mori, C., Akashi, T., Yoshida, S., Tago, Y., Tsujii, Y. & Tabata Y.** 2013. Fabrication of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging from Polymer-Brush-Afforded Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Biomacromolecules*, 14(10):3453-3462.
- Okon, E., Pouliquen, D., Okon, P., Kovaleva, Z.V., Stepanova, T.P., Lavit, S.G., Kudryavtsev, B.N. & Jallet, P.** 1994. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Invest*, 71: 895–903.
- Olive, P.L. & Banath, J.P.** 1993. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵IIdUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64(4): 349-358.
- Olofsson, L., Rindzevicius, T., Pfeiffer, I., Kall, M. & Hook, F.** 2003. Surface-based goldnanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection. *Langmuir*. 19: 10414–10419.
- Östling O. & Johanson K.J.** 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian celled. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Ostro, B.D., Lipsett, M.J., Mann, J.K., Krupnick, A. & Harrington, W.** 1993. Air pollution and respiratory morbidity among adults in southern California. *Am J Epidemiol*, 137(7): 691-700.
- Otero-González, L., Sierra-Alvarez, R., Boitano, S. & Field, J. A.** 2012. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*, 46(18):10271-8.
- Oukarroun, A., Bras, S., Perreault, F. & Popovic, R.** 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 80–85.

- Oukarroun, A., Barhoumi, L., Pirastru, L; & Dewez, D.** 2013. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4): 902–907.
- Padham, A.K., Hopkins, M.T., Wang, T.W., Mcnamara, L.M., Lo, M., Richardson, L.G.L., Smith, M.D., Taylor, C.A. & Thompson, J.E.** 2007. Characterization of a plastid triacylglycerol lipase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 1372-1384.
- Panda, K.K., Acharya, V. M.M., Krishnaveni, R., Padhi, B.K., Sarangi, S.N., Sahu, S.N. & Panda, B.B.** 2011. *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 25(5): 1097-1105.
- Park, E.J., Choi, J., Park, Y.K. & Park, K.** 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1-2): 90-100.
- Pateraki, St., Assimakopoulos, V.D., Maggos, Th, Fameli, K.M., Kotroni, V. & Vasilakos, Ch.** 2013. Particulate matter pollution over a Mediterranean urban area. *Science of the Total Environment*, 463–464: 508–524.
- Patil, G., Khan, M.I., Patel, D.K., Sultana, S., Prasad, R. & Ahmad, I.** 2012. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells A(549). *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(2): 436-45.
- Patlolla, A.K., Berry, A., May, L. & Tchounwou, P.B.** 2012. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9: 1649-1662.
- Paur, H.R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hanninen, O., Kasper, G., Riediker, M., Rothen-Rutishauser, B. & Schmid, O.** 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science*, 42: 668-692.
- Petala, E., Dimosa, K., Douvalisc, A., Bakasc, T., Tucekb, J., Zborilb, R. & Karakassidesa, M.A.** 2013. Nanoscale zero-valent iron supported on mesoporous silica: Characterization and reactivity for Cr(VI) removal from aqueous solution. *Journal of hazardous materials*, 261: 295-306.
- Petersen, E. & Nelson, B.** 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal Bioanal Chem*, 398(2): 613-650.

- Petitot, F., Lestaevel, P., Tournalias, E., Mazzucco, C., Jacquinet, S., Dhieux, B., Delissen, O., Tournier, B.B., Gensdarmes, F., Beaunier, P. & Dublineau, I.** 2013. Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats. *Toxicol Lett*, 217(3): 217-25.
- Petrovykh, D. Y., Kimura-Suda, H. Whitman, L. J. & Tarlov, M. J.** 2003. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *JACS*, 125: 5219-5226
- Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., Mccray, P.B. & Zabner, J.** 2010. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300: L25-L31.
- Pietropaoli, A.P., Frampton, M.W., Hyde, R.W., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Cox, C., Speers, D.M., Frasier, L.M., Chalupa, D.C., Huang, L.S., Utell, M.J.** 2004. Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol*, 16: 59-72.
- Pope, C.A. 3rd, Ezzati, M. & Dockery, D.W.** 2009. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*, 360 (4): 376-386.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K. & Thurston, G.D.** 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9): 1132-1141.
- Pui, D.Y., Qi, C., Stanley, N., Oberdörster, G. & Maynard, A.** 2008. Recirculating air filtration significantly reduces exposure to airborne nanoparticles. *Environ Health Perspect*, 116: 863-866.
- Radu, M., Munteanu, M.C., Petrache, S., Serban, A.I., Dinu, D., Hermenean, A., Sima, C. & Dinischiotu, A.** 2010. Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochim Pol*, 57(3): 355-60.
- Ramos-Godínez, M. del P., González-Gómez, B.E., Montiel-Dávalos, A., López-Marure, R. & Alfaro-Moreno, E.** 2013. TiO₂ nanoparticles induce endothelial cell activation in a pneumocyte-endothelial co-culture model. *Toxicol In Vitro*, 27(2): 774-81.
- Ren, H.X., Liu, L., Liu, C., He, S. Y., Huang, J., Li, J. L., Zhang, Y., Huang, X.J. & Gu, N.** 2011. Physiological investigation of magnetic iron oxide nanoparticles towards Chinese Mung Bean. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7(5): 677-684.

- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y, Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Brad Barbazuk, N.A.W., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van De Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S. & Boore, J.L.** 2008. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*, 319: 64-69.
- Renwick, L.C., Donaldson, K. & Clouter, A.** 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172: 119-127.
- Reski, R.** 2010. Moss methods – Cell culture. [en ligne]. Fribourg: Plant Biotechnology. [consulté le 14 octobre 2010]. Disponible sur internet: <http://www.plant-biotech.net/>.
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., & Gardea-Torresdey, J.L.** 2013. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environmental Science & Technology*, 47: 5635-5642.
- Rimetz, J.** 2007. Les aérosols de pollution en zone urbaine et industrielle sous influence marine. Physico-chimie des particules. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 284p.
- Rinaudo, V., Barberi, P., Giovannetti, M. & Van der Heijden, M.G.A.** 2010. Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant Soil*, 333(1-2): 7-20.
- Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell S.H. & Hogan, B.L.M.** 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31): 12771-12775.
- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Muhlfeld, Ch. & Gehr, P.** 2009a. Nanoparticle-cell membrane interactions. In P. Gehr, Ch. Muhlfeld, B. Rothen-Rutishauser & F. Blank (Eds.), Particle-Lung Interactions. *Informa Healthcare*: New York, pp. 226-242.

- Rothen-Rutishauser, B., Grass, R.N., Blank, F., Limbach, L.K., Muhlfield, C., Brandenberger, C., Raemy, D.O., Gehr, P. & Stark, W.J.** 2009b. Direct combination of nanoparticle fabrication and exposure to lung cell cultures in a closed setup as a method to simulate accidental nanoparticle exposure of humans. *Environmental Science and Technology*, 43(7): 2634–2640.
- Roux J.**, 2010. Régénération et remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidose. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Champagne-Ardenne, 212p.
- Rubasinghe, G., Kyei, P.K., Scherer, M.M. & Grassian, V.H.** 2012. Proton-promoted dissolution of α -FeOOH nanorods and microrods: Size dependence, anion effects (carbonate and phosphate), aggregation and surface adsorption. *J Colloid and Int Sci*, 385: 15–23.
- Ruffini Castiglione, M. & Cremonini, R.**, 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2): 161-165.
- Rzepka, M.A. & Cuny, D.** 2008. Biosurveillance végétale et fongique des ETM atmosphériques. *Air Pur*, 75: 66-79.
- Sahu, D., Kannan, G.M., Vijayaraghavan, R., Anand, T. & Khanum, F.** 2013. Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. *ISRN Toxicol.* 2013: 316075.
- Sakurai, Y., Tada, H., Gonda, K., Takeda, M., Cong, L., Amari, M., Kobayashi, Y., Watanabe, M., Ishida, T. & Ohuchi, N.** 2012. Development of silica-coated silver iodide nanoparticles and their biodistribution. *Tohoku J Exp Med*, 228(4): 317-23.
- San Roman, I., Alonso, M.L., Bartolomé, L., Galdames, A., Goiti, E., Ocejó, M., Moragues, M., Alonso, R.M. & Vilas, J.L.** 2013. Relevance study of bare and coated zero valent iron nanoparticles for lindane degradation from its by-product monitorization. *Chemosphere*, 93(7): 1324-1332.
- Santhosh, P.B. & Ulrih, N.P.** 2013. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*, 336 8–17.
- Sayed El-Temsah, Y. & Joner, E.J.** 2010. Impact of Fe and Ag Nanoparticles on Seed Germination and Differences in Bioavailability During Exposure in Aqueous Suspension and Soil. *Environmental Toxicology*, 42-49, DOI 10.1002/tox.
- Sayes, C., Wahi, R., Kurian, P., Liu, Y., West, J., Ausman, K., Warheit, D.B. & Colvin, V.L.** 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 92: 174–185.
- Sayes, C.M., Reed, K.L. & Warheit, D.B.** 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97(1): 163-180.

- Schönherr, J.** 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*, 212: 112–118.
- Schönherr, J.** 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2471– 2491.
- Schönherr, J. & Luber, M.** 2001. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant Soil*, 236: 117–122.
- Schützendübel, A. & Polle, A.** 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351–1365
- Schwartz, J.** 1994. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ Res*, 64(1): 36-52.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks**, 2010. Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”. SCENIHR, 46p.
- Seeger, E.M., Baun, A., Kästner, M. & Trapp, S.** 2009. Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *J Soils Sediments*, 9:46–53.
- Sharma, H.S., Patnaik, R., Sharma, A., Sjöquist, P.O. & Lafuente, J.V.** 2009. Silicon dioxide nanoparticles (SiO₂, 40-50 nm) exacerbate pathophysiology of traumatic spinal cord injury and deteriorate functional outcome in the rat. An experimental study using pharmacological and morphological approaches. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 9(8): 4970-4980.
- Sharma, H.S. & Sharma A.** 2012. Neurotoxicity of Engineered Nanoparticles from Metals. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11: 65-80.
- Sharma, S.S. & Dietz, K.J.** 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14: 43–50
- Shaw, A.K. & Hossain, Z.** 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, in press.
- Shebani, E., Shahana, S., Janson, C. & Roomans, G.M.,** 2005. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue Cell*, 37(2): 145-152.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Singh, K.K.** 2006. Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067: 182-190.

- Singh, P.K., Singh, M. & Vyas, D.** 2010. Biocontrol of fusarium wilt of chickpea using arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium leguminosorum biovar. *Caryologia*, 63(4): 349–353.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., Kostarelos, K.** 2006. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3357–3362.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., Van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P.J. & Schins, R.P.** 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222: 141–151.
- Spurny, K.R.** 1998. On the physics, chemistry and toxicology of ultrafine anthropogenic, atmospheric aerosols (UAAA): new advances. *Toxicol Let*, 96-97: 253-261.
- Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroepel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J. & Schulz, H.** 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ. Health Perspect.*, 114: 328–333.
- Suliman, Y.A.O., Ali, D., Alarifi, S., Harrath, A.H., Mansour, L. & Alwasel, S.H.** 2013. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells. *Environ Toxicol.*, doi: 10.1002/tox.21880.
- Sun, S.Q., He, M., Wang, G.X. & Cao, T.** 2010. Heavy Metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss brachythecium piligerum chad. *Inc. Environ Toxicol*, 26: 453–458.
- Sung, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Song, M.Y., Song, K.S., Ryu, H.R., Yoon, J.U., Jeon, K.S., Jeong, J., Han, B.S., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Kim, D.W., Kelman, B.J. & Yu, I.J.** 2011. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 8: 16.
- Tabata, Y. & Ikada, Y.** 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. *Biomaterials*, 9: 356-362.
- Tagliari de Brito, K.C., Torres de Lemos, C., Vaz Rocha, J.A., Mielli, A.C., Matzenbacher, C. & Ferrão Vargas, V.M.** 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 14-20.
- Tang, W., Li, Q., Gao, S. & Shang, J.K.** 2011. Arsenic (III,V) removal from aqueous solution by ultrafine α -Fe₂O₃ nanoparticles synthesized from solvent thermal method. *Journal of Hazardous Materials*, 192: 131– 138.

- Tausz, M., Sircelj, H. & Grill, D.** 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, 55(404): 1955-1962.
- Thornton, L.E., Keren, N., Ohad, I. & Pakrasi, H.B.,** 2005. *Physcomitrella patens* and *Ceratodon purpureus*, mosses as model organisms in photosynthesis studies. *Photosynthesis Research*, 83: 87–96.
- Thwala, M., Musee, N., Sikhwivhilu, L. & Wepener, V.** 2013. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environmental Science Processes & Impacts*, 15(10): 1830-1843.
- Tomasevic, M., Vukmirovic, Z., Rajsic, S., Tasic, M. & Stevanovic, B.** 2005. Characterization of trace metal particles deposited on some deciduous tree leaves in an urban area. *Chemosphere*, 61: 753-760.
- Tripathi, S.T.S., Sonkar, S.K. & Sarkar, S.** 2011. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3): 1176-1181.
- Trivedi, V., Boire, A., Tchernychev, B., Kaneider, N. C., Leger, A. J., O'Callaghan, K., Covic, L. & Kuliopulos, A.** 2009. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*, 137: 332–343.
- Tseng, W.K., Chieh, J.J., Yang, Y.F., Chiang, C.K., Chen, Y.L., Yang, S.Y., Horng, H.E., Yang, H.C. & Wu, C.C.** 2012. A noninvasive method to determine the fate of Fe₃O₄ nanoparticles following intravenous injection using scanning SQUID biosusceptometry. *PLoS One*, 7(11): e48510.
- Tuutijärvi T, Vahala R, Sillanpää M, Chen G.** 2012. Maghemite nanoparticles for As(V) removal: desorption characteristics and adsorbent recovery. *Environ Technol*, 33(16-18): 1927-36.
- Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, M., Pohl, C., Baldi, G., Unger, R.E. & Kirkpatrick, C.J.** 2009. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol*, 6:18.
- Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z. & Muhammed, M.** 2006. Fe₃O₄ and [gamma]-Fe₂O₃ nanoparticles for the adsorption of Co²⁺ from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 298(2): 501-7.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. & Schins, R.P.** 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1: 1–20.

- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M. & Dumat, C.** 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science and Technology*, 44: 1036-1042.
- Valanne N.** 1984. Photosynthesis and photosynthetic products in mosses. *The experimental Biology of Bryophytes*, 257-273.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. & Telser, J.** 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266(1-2): 37-56.
- Van Haluwyn, C., Cuny, D. & Garrec, J.P.** 2011. Introduction générale - Définitions, concepts et enjeux généraux de la biosurveillance de la qualité de l'air. *Pollution Atmosphérique*, 7-12.
- Veranth, J., Kaser, E., Veranth, M., Koch, M. & Yost, G.** 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*, 4:2.
- Viegi, G., Maio, S., Pistelli, F., Baldacci, S. & Carrozzi, L.** 2006. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology*, 11(5): 523-532.
- Wahajuddin & Arora, S.** 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, 7: 3445-3471.
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J.Q., Shan, X. & Xing, B.** 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants, *Nanotoxicology* 5: 30-42.
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J.C., Qu, P. & Xing, B.** 2012. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 25(7): 1512-21.
- Wanner, A., Salathe, M. & O'riordan, T.G.,** 1996. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 154(6 Pt 1): 1868-1902.
- Watanabe, M., Yoneda, M., Morohashi, A., Hori, Y., Okamoto, D., Sato, A., Kurioka, D., Nittami, T., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., Kawai, K., Kasai, H. & Totsuka, Y.** 2013. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci*, 14(8): 15546-60.
- Weckx, J.E.J. & Clijster, H.M.M.** 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiologia Plantarum*, 96: 506-512.

- Wei-xian, Z.** 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nanoparticle Research*, V5(3): 323.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V. & Alvarez, P.J.J.,** 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40(14): 4337-4445.
- Witschger, O. & Fabriès, J.F.** 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *INRS, hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires*, 21-35.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J.N., Li, N., Venkatesen, M.I., Sioutas, C. & Nel, A.** 2004. Quinones and aromatic chemicals compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 112: 1347–1358.
- Xu, C. & Sun, S.** 2013. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 732–743.
- Xu, J.H., Gao, N.Y., Deng, Y. & Xia, S.Q.** 2013. Nanoscale iron hydroxide-doped granular activated carbon (Fe-GAC) as a sorbent for perchlorate in water. *Chemical Engineering Journal*, 222: 520–526.
- Yamamoto, Y., Hachia, A. & Matsumoto, H.** 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminium and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology*, 38: 1333-1339.
- Yan, S., Zhao, L., Li, H., Zhang, Q., Tan, J., Huang, M., He, S. & Li, L.** 2013. Single-walled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. *Journal of Hazardous Materials*, 246– 247: 110– 118.
- Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., Liu, C., Gao, F.Q., Wu, C. & Yang, P.** 2006. Influences of nanoanatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110(2): 179-190.
- Yang, F., Liu, C., Gao, F.Q., Su, M.Y., Wu, X., Zheng, L., Hong, F.S. & Yang, P.** 2007. The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂ treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research*, 119(1): 77-88.
- Zechmeister, H.G., Grodzinska, K. & Szarek-Lukaszewska, G.,** 2003. Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts ADN applications. Elsevier science, Oxford. Chap. 10: 329-376. 997p.

- Zhang, H., Xia, T., Meng, H., Xue, M., George, S., Ji, Z., Wang, X., Liu, R., Wang, M., France, B., Rallo, R., Damoiseaux, R., Cohen, Y., Bradley, K.A., Zink, J.I., Nel, A.E.** 2011. Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*, 5(4): 2756-2769.
- Zhang, S., Jiang, Y., Chen, C.S., Creeley, D., Schwehr, K.A., Quigg, A., Chin, W.C. & Santschi, P.H.** 2013. Ameliorating effects of extracellular polymeric substances excreted by *Thalassiosira pseudonana* on algal toxicity of CdSe quantum dots. *Aquatic Toxicology*, 126: 214– 223.
- Zhang, W.** 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J Nanopart Res*, 5:323-323.
- Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Ren, M., Varela-Ramirez, A., Li, C., Hernandez-Viezcas, J.A., Aguilera, R.J. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2012a. Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies. *Chemical Engineering Journal*, 184: 1– 8.
- Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela-Ramirez, A., Zhang, J.Y. & Gardea-Torresdey, J.L.** 2012b. Stress Response and Tolerance of Zea mays to CeO₂ Nanoparticles: Cross Talk among H₂O₂, Heat Shock Protein, and Lipid Peroxidation. *ACS NANO*, 6(11): 9615-9622.
- Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P. & Liu, C.** 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally and growth aged seeds of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104(1): 83-91.
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J.Q. & Jin, Y.**, 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 713-717.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

ANNEXE 2 :

Liste des gènes composants les plaques TLDA employées.

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs99999901_s1	18S	Eukaryotic 18S rRNA
Hs00174179_m1	ACE	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
Hs00153853_m1	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10
Hs01106104_m1	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12
Hs00234221_m1	ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17
Hs00174246_m1	ADAM8	ADAM metallopeptidase domain 8
Hs00177638_m1	ADAM9	ADAM metallopeptidase domain 9 (meltrin gamma)
Hs00199608_m1	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1
Hs00153957_m1	AGER	advanced glycosylation end product-specific receptor
Hs00419572_m1	ALKBH2	alkB, alkylation repair homolog 2 (E. coli)
Hs00286731_m1	ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)
Hs00167524_m1	ALOX12	arachidonate 12-lipoxygenase
Hs00609608_m1	ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase
Hs01095330_m1	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase
Hs00559441_m1	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
Hs00172396_m1	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
Hs00205565_m1	APEX2	APEX nuclease (apurinic/aprimidinic endonuclease) 2
Hs00544364_m1	APTX	aprataxin
Hs00155832_m1	AREG	amphiregulin
Hs01112307_m1	ATM	ataxia telangiectasia mutated
Hs00187841_m1	ATOX1	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)
Hs00354807_m1	ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
Hs00188930_m1	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
Hs99999001_m1	BAX	BCL2-associated X protein
Hs99999018_m1	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
Hs99999146_m1	BCL2L1	BCL2-like 1
Hs00609632_m1	BID	BH3 interacting domain death agonist
Hs01552756_m1	BPI	bactericidal/permeability-increasing protein
Hs01556194_m1	BRCA1	breast cancer 1, early onset
Hs00609060_m1	BRCA2	breast cancer 2, early onset
Hs01123611_m1	CARD6	caspase recruitment domain family, member 6
Hs00209095_m1	CARD8	caspase recruitment domain family, member 8
Hs00354836_m1	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
Hs00609648_m1	CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00201637_m1	CASP14	caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00892481_m1	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00234387_m1	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00233438_m1	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00237061_m1	CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00154250_m1	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00169152_m1	CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs01018151_m1	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00154260_m1	CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00156308_m1	CAT	catalase
Hs00171072_m1	CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1
Hs00237013_m1	CCL11	chemokine (C-C motif) ligand 11
Hs00234646_m1	CCL13	chemokine (C-C motif) ligand 13
Hs00171074_m1	CCL17	chemokine (C-C motif) ligand 17

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00268113_m1	CCL18	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
Hs00171149_m1	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19
Hs00234140_m1	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
Hs00355476_m1	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
Hs99999110_m1	CCL21	chemokine (C-C motif) ligand 21
Hs01574247_m1	CCL22	chemokine (C-C motif) ligand 22
Hs00171082_m1	CCL24	chemokine (C-C motif) ligand 24
Hs00608373_m1	CCL25	chemokine (C-C motif) ligand 25
Hs00171146_m1	CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26
Hs00219797_m1	CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28
Hs00234142_m1	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3
Hs99999148_m1	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4
Hs00174575_m1	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
Hs00171147_m1	CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7
Hs00271615_m1	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8
Hs00174298_m1	CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1
Hs00706455_s1	CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10
Hs00356601_m1	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
Hs00266213_s1	CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3
Hs9999919_m1	CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4
Hs00152917_m1	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5
Hs00171121_m1	CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
Hs99999080_m1	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
Hs00174764_m1	CCR8	chemokine (C-C motif) receptor 8
Hs00258535_m1	CCR9	chemokine (C-C motif) receptor 9
Hs00154297_m1	CD27	CD27 molecule
Hs00174297_m1	CD70	CD70 molecule
Hs01386064_m1	CMKLR1	chemokine-like receptor 1
Hs00845692_m1	CRLF2	cytokine receptor-like factor 2
Hs99999084_m1	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Hs99999197_m1	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
Hs00929873_m1	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Hs00538896_m1	CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
Hs00166144_m1	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
Hs99999083_m1	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
Hs01114427_m1	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
Hs00355049_m1	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
Hs00171086_m1	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Hs00236937_m1	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
Hs00171042_m1	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Hs00171138_m1	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Hs00171022_m1	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
Hs00222859_m1	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Hs00236966_m1	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Hs00171061_m1	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
Hs00171085_m1	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
Hs00970538_m1	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Hs00174146_m1	CXCR1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1
Hs00174304_m1	CXCR2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00171041_m1	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3
Hs00976734_m1	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Hs00174843_m1	CXCR6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
Hs00929113_m1	CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1
Hs00252658_s1	CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2
Hs00207388_m1	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
Hs00399179_m1	DISP1	dispatched homolog 1 (Drosophila)
Hs00213694_m1	DUOX1	dual oxidase 1
Hs00204187_m1	DUOX2	dual oxidase 2
Hs00194957_m1	EBI3	Epstein-Barr virus induced 3
Hs01099999_m1	EGF	epidermal growth factor (beta-urogastrone)
Hs01076092_m1	EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
Hs01012157_m1	ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
Hs00361161_m1	ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
Hs01554450_m1	ERCC3	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
Hs00193342_m1	ERCC4	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4
Hs00164482_m1	ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
Hs00972920_m1	ERCC6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
Hs01122123_m1	ERCC8	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8
Hs00243513_m1	EXO1	exonuclease 1
Hs00163653_m1	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
Hs00181225_m1	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Hs01092738_m1	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)
Hs00266645_m1	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
Hs00940253_m1	FGF7	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
Hs00241111_m1	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
Hs01552926_m1	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
Hs01073586_m1	FOXM1	forkhead box M1
Hs00265954_m1	FPR2	formyl peptide receptor 2
Hs01574392_m1	FPR3	formyl peptide receptor 3
Hs00231122_m1	GATA3	GATA binding protein 3
Hs00375015_m1	GLRX2	glutaredoxin 2
Hs00537796_m1	GPR156	G protein-coupled receptor 156
Hs00173717_m1	GPR44	G protein-coupled receptor 44
Hs02516751_s1	GPX1	glutathione peroxidase 1
Hs01591589_m1	GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
Hs00173566_m1	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)
Hs00157812_m1	GPX4	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)
Hs00559733_m1	GPX5	glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)
Hs00699698_m1	GPX6	glutathione peroxidase 6 (olfactory)
Hs00210410_m1	GPX7	glutathione peroxidase 7
Hs00380670_m1	GPX8	glutathione peroxidase 8 (putative)
Hs00167317_m1	GSR	glutathione reductase
Hs00609286_m1	GSS	glutathione synthetase

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00263393_m1	GTF2I	general transcription factor Iii
Hs00277212_m1	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
Hs00193417_m1	GZMM	granzyme M (lymphocyte met-ase 1)
Hs00181813_m1	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor
Hs01037385_s1	HMGB1	high-mobility group box 1
Hs00427665_g1	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
Hs99999152_m1	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
Hs00256882_s1	IFNA1	interferon, alpha 1
Hs00265051_s1	IFNA2	interferon, alpha 2
Hs00277188_s1	IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast
Hs99999041_m1	IFNG	interferon, gamma
Hs00988304_m1	IFNGR1	interferon gamma receptor 1
Hs00194264_m1	IFNGR2	interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
Hs00737883_m1	IFNK	interferon, kappa
Hs01547656_m1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
Hs99999020_m1	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
Hs00961619_m1	IL10	interleukin 10
Hs00387004_m1	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha
Hs00175123_m1	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta
Hs01055414_m1	IL11	interleukin 11
Hs00168405_m1	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
Hs99999037_m1	IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
Hs00538165_m1	IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1
Hs00155486_m1	IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2
Hs00174379_m1	IL13	interleukin 13
Hs00609817_m1	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1
Hs00152924_m1	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2
Hs01003716_m1	IL15	interleukin 15
Hs00542604_m1	IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha
Hs00189606_m1	IL16	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
Hs00174383_m1	IL17A	interleukin 17A
Hs00975262_m1	IL17B	interleukin 17B
Hs00171163_m1	IL17C	interleukin 17C
Hs00370528_m1	IL17D	interleukin 17D
Hs00369400_m1	IL17F	interleukin 17F
Hs01056323_m1	IL17RA	interleukin 17 receptor A
Hs00914532_m1	IL17RB	interleukin 17 receptor B
Hs01038788_m1	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
Hs00977691_m1	IL18R1	interleukin 18 receptor 1
Hs00604659_m1	IL19	interleukin 19
Hs99999028_m1	IL1A	interleukin 1, alpha
Hs00174097_m1	IL1B	interleukin 1, beta
Hs00168392_m1	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I
Hs01030384_m1	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II
Hs00893626_m1	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist
Hs00174114_m1	IL2	interleukin 2
Hs00218888_m1	IL20	interleukin 20
Hs00205346_m1	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha
Hs00376373_m1	IL20RB	interleukin 20 receptor beta
Hs00222327_m1	IL21	interleukin 21

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00222310_m1	IL21R	interleukin 21 receptor
Hs01574154_m1	IL22	interleukin 22
Hs01058653_m1	IL22RA1	interleukin 22 receptor, alpha 1
Hs00364814_m1	IL22RA2	interleukin 22 receptor, alpha 2
Hs00413259_m1	IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19
Hs00332759_m1	IL23R	interleukin 23 receptor
Hs01114274_m1	IL24	interleukin 24
Hs00224471_m1	IL25	interleukin 25
Hs00218189_m1	IL26	interleukin 26
Hs00377366_m1	IL27	interleukin 27
Hs00945029_m1	IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha
Hs00907777_m1	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha
Hs00168402_m1	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta
Hs00173950_m1	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)
Hs99999081_m1	IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
Hs01098710_m1	IL31	interleukin 31
Hs00371172_m1	IL31RA	interleukin 31 receptor A
Hs00992441_m1	IL32	interleukin 32
Hs00608141_m1	IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)
Hs00174122_m1	IL4	interleukin 4
Hs00166237_m1	IL4R	interleukin 4 receptor
Hs99999031_m1	IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
Hs00602482_m1	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha
Hs99999032_m1	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
Hs01075667_m1	IL6R	interleukin 6 receptor
Hs00174360_m1	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
Hs99999033_m1	IL7	interleukin 7
Hs00902334_m1	IL7R	interleukin 7 receptor
Hs99999034_m1	IL8	interleukin 8
Hs00914237_m1	IL9	interleukin 9
Hs00233707_m1	ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
Hs00559580_m1	ITGAE	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
Hs01127543_m1	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
Hs00242692_m1	LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent
Hs00236874_m1	LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
Hs00168505_m1	LTA4H	leukotriene A4 hydrolase
Hs00242739_m1	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
Hs00609525_m1	LTB4R	leukotriene B4 receptor
Hs01885851_s1	LTB4R2	leukotriene B4 receptor 2
Hs00158922_m1	LTBR	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
Hs00168529_m1	LTC4S	leukotriene C4 synthase
Hs00172470_m1	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
Hs00179866_m1	MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
Hs00233958_m1	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
Hs00899662_m1	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
Hs00942589_m1	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
Hs00237119_m1	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
Hs00275699_m1	MMP19	matrix metalloproteinase 19
Hs00234422_m1	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa)

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
		type IV collagenase)
Hs00968308_m1	MMP3	matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
Hs00159163_m1	MMP7	matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)
Hs00957562_m1	MMP9	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
Hs01012594_m1	MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase
Hs00165162_m1	MPO	myeloperoxidase
Hs00953523_m1	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
Hs00989003_m1	MSH3	mutS homolog 3 (E. coli)
Hs00264721_m1	MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)
Hs00737165_m1	MSRA	methionine sulfoxide reductase A
Hs00159357_m1	MUC1	mucin 1, cell surface associated
Hs00419779_m1	MUC12	mucin 12, cell surface associated
Hs00217230_m1	MUC13	mucin 13, cell surface associated
Hs00377336_m1	MUC15	mucin 15, cell surface associated
Hs01065189_m1	MUC16	mucin 16, cell surface associated
Hs00959753_s1	MUC17	mucin 17, cell surface associated
Hs00543315_m1	MUC19	mucin 19, oligomeric
Hs03005094_m1	MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
Hs00416321_m1	MUC20	mucin 20, cell surface associated
Hs03649367_mH	MUC3B	mucin 3B, cell surface associated;mucin 3A, cell surface associated
Hs00366414_m1	MUC4	mucin 4, cell surface associated
Hs00873638_m1	MUC5AC	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming
Hs00861588_m1	MUC5B	mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming
Hs00401231_m1	MUC6	mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming
Hs00379529_m1	MUC7	mucin 7, secreted
Hs01014856_m1	MUTYH	mutY homolog (E. coli)
Hs00165362_m1	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1;neutrophil cytosolic factor 1B pseudogene;neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene
Hs01084940_m1	NCF2	neutrophil cytosolic factor 2
Hs00226327_m1	NEIL1	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
Hs00376746_m1	NEIL2	nei like 2 (E. coli)
Hs00217387_m1	NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)
Hs00765730_m1	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
Hs00174517_m1	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
Hs00368367_m1	NLRC4	NLR family, CARD domain containing 4
Hs00918082_m1	NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
Hs00196075_m1	NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
Hs00223394_m1	NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
Hs00167223_m1	NOS1	nitric oxide synthase 1 (neuronal)
Hs00167257_m1	NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible
Hs01574659_m1	NOS3	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
Hs00225846_m1	NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5
Hs00267385_m1	NTHL1	nth endonuclease III-like 1 (E. coli)
Hs00213454_m1	OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
Hs00171165_m1	OSM	oncostatin M
Hs00384278_m1	OSMR	oncostatin M receptor
Hs00250562_m1	OXR1	oxidation resistance 1
Hs00178247_m1	OXSRL1	oxidative-stress responsive 1
Hs00228839_m1	PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2
Hs00234994_m1	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00966522_m1	PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)
Hs00183486_m1	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Hs01019589_m1	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
Hs00160076_m1	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor
Hs00179898_m1	PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
Hs00173860_m1	PLA2G2D	phospholipase A2, group IID
Hs00160263_m1	POLB	polymerase (DNA directed), beta
Hs01106271_m1	PRDX1	peroxiredoxin 1
Hs00853603_s1	PRDX2	peroxiredoxin 2
Hs00428953_g1	PRDX3	peroxiredoxin 3
Hs00197394_m1	PRDX4	peroxiredoxin 4
Hs00201536_m1	PRDX5	peroxiredoxin 5
Hs00705355_s1	PRDX6	peroxiredoxin 6
Hs00169473_m1	PRF1	perforin 1 (pore forming protein)
Hs01597752_m1	PRTN3	proteinase 3
Hs00235003_m1	PTGDR	prostaglandin D2 receptor (DP)
Hs00168748_m1	PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)
Hs00168752_m1	PTGER1	prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42kDa
Hs00168754_m1	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa
Hs00168755_m1	PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
Hs00168761_m1	PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
Hs00610420_m1	PTGES	prostaglandin E synthase
Hs00228159_m1	PTGES2	prostaglandin E synthase 2
Hs00168763_m1	PTGFR	prostaglandin F receptor (FP)
Hs00168765_m1	PTGIR	prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)
Hs00400932_m1	PTGR1	prostaglandin reductase 1
Hs00924803_m1	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
Hs01573471_m1	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
Hs00173615_m1	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
Hs00395488_m1	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)
Hs00203118_m1	PYCARD	PYD and CARD domain containing
Hs00192541_m1	RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
Hs00234102_m1	RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)
Hs01092477_m1	SCARF1	scavenger receptor class F, member 1
Hs01104466_m1	SELS	selenoprotein S
Hs01032845_m1	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1
Hs00358340_m1	SFTPD	surfactant protein D
Hs00367639_m1	SGK2	serum/glucocorticoid regulated kinase 2
Hs00247263_m1	SIRT2	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (S. cerevisiae)
Hs00705164_s1	SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
Hs02330328_s1	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
Hs00916176_m1	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble
Hs00167309_m1	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Hs00162090_m1	SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular
Hs00607800_m1	SRXN1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)
Hs00169054_m1	TBXA2R	thromboxane A2 receptor
Hs00217832_m1	TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
Hs00608187_m1	TGFA	transforming growth factor, alpha
Hs00998130_m1	TGFB1	transforming growth factor, beta 1

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs00234244_m1	TGFB2	transforming growth factor, beta 2
Hs00234245_m1	TGFB3	transforming growth factor, beta 3
Hs00610318_m1	TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1
Hs00559660_m1	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
Hs00231483_m1	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1
Hs00413978_m1	TLR1	toll-like receptor 1
Hs00999403_m1	TLR10	toll-like receptor 10
Hs00610101_m1	TLR2	toll-like receptor 2
Hs01551077_m1	TLR3	toll-like receptor 3
Hs00152939_m1	TLR4	toll-like receptor 4
Hs00152825_m1	TLR5	toll-like receptor 5
Hs00271977_s1	TLR6	toll-like receptor 6
Hs00152971_m1	TLR7	toll-like receptor 7
Hs00152972_m1	TLR8	toll-like receptor 8
Hs00928321_m1	TLR9	toll-like receptor 9
Hs99999043_m1	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
Hs01113602_m1	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
Hs00269492_m1	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
Hs00366278_m1	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
Hs00187192_m1	TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator
Hs00171993_m1	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
Hs00533968_m1	TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
Hs00234356_m1	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Hs00243522_m1	TNFSF11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
Hs00611242_m1	TNFSF12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
Hs00182411_m1	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
Hs00174286_m1	TNFSF8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
Hs00172728_m1	TOP3B	topoisomerase (DNA) III beta
Hs00153349_m1	TP53	tumor protein p53
Hs00371508_m1	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
Hs00263639_m1	TSLP	thymic stromal lymphopoietin
Hs00422172_m1	UNG	uracil-DNA glycosylase
Hs00365485_m1	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
Hs99999070_m1	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
Hs00173634_m1	VEGFB	vascular endothelial growth factor B
Hs00220205_m1	XAB2	XPA binding protein 2
Hs00166045_m1	XPA	xeroderma pigmentosum, complementation group A
Hs01104206_m1	XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C
Hs00959834_m1	XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
Hs00538799_m1	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
Hs00193725_m1	XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3
Hs00243327_m1	XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
Hs00221707_m1	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)
Hs00750856_s1	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6

ANNEXE 3 :

Synthèse bibliographique des effets des nanoparticules sur les cellules pulmonaires

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
NPs de fer nickel (NiFe₂O₄-NPs)	26 ± 17 nm Diamètre hydrodynamique : 97 nm ± 23 nm dans le milieu	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 10% sérum de veau fœtal (SVF), pénicilline, streptomycine 1-100 µg.ml ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la viabilité • Induction d'un stress oxydant avec une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution du glutathion réduit (GSH) • Surexpression des gènes codant pour les protéines p53 (cycle cellulaire) et bax, casp3 et casp9 (apoptose) • Diminution des gènes codant pour protéines anti-apoptotique (survivin et bcl2) • Surexpression des enzymes caspase 3 et 9 	Ahamed et al., 2011
CuO-NPs	Sphère de 52,51 ± 10,23 nm Diamètre hydrodynamique : 65,52 nm	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 10% SVF, pénicilline, streptomycine 10-50 µg.ml ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> • Induction stress oxydant : <ul style="list-style-type: none"> • Diminution du GSH • Augmentation de la lipoperoxydation membranaire (LPO), des catalases (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD) • Surexpression des protéines p53 et HSP70 et de l'expression des protéines de réparation de l'ADN ROD51 et MSH2 	Ahamed et al., 2010
Particules de tailles nanométriques générées par combustion	Générées lors de la combustion du propane	A549-NK-κB-EGFP/Neo (A549 marquée avec sonde fluorescente)	Milieu de culture 48h Différentes dilutions	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la viabilité et de la croissance cellulaire • Modulation différente des gènes étudiés mais modulés pour la plupart par l'activation du facteur de transcription NF- κB • Modification des résultats en fonction des conditions d'exposition (présence ou pas de sérum) 	Arenz et al., 2006
Nanotubes de carbones à paroi simple (SWCNT)	/	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 10% SVF, pénicilline, streptomycine 4 et 8 µg.ml ⁻¹ (2-80 µg.ml ⁻¹) 0 à 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression d'IL8 dans les deux conditions d'exposition mais plus importante en présence de sérum • L'expression d'IL8 reste élevée une exposition à des SWCNTs même après leur retrait • En condition de prolifération, modification de l'expression d'IL8 suite à une exposition à SWCNTs • Pas d'augmentation d'IL8 dose-dépendante 	Baktur et 2011

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
Fe₂O₃-NPs TiO₂-NPs	34,39 ± 17 m ² .g ⁻¹ 49,71 ± 0,19 m ² .g ⁻¹	BEAS 2B IMR-90 (Fibroblastes humain)	Milieu de culture : • Defined keratinocyte serum free medium (D-KSFM), gentamycine (BEAS-2B) • Earl's Modified Eagle's Medium (EMEM), 10% SVF, gentamycine (IMR90) 2-50 µg.cm ⁻² 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires • Les cellules IMR-90 sont plus sensibles au regard des effets cytotoxiques et génotoxiques par rapport au BEAS-2B • Effets des TiO₂-NPs : <ul style="list-style-type: none"> • Pas de dommage à l'ADN (Test des comètes) • Cytotoxicité pour les IMR90 mais pas pour les BEAS-2B • Formation intracellulaire de ROS • Formation d'adduits à l'ADN (8OHdG) • Effets des Fe₂O₃-NPs : <ul style="list-style-type: none"> • Cassures à l'ADN (Test des comètes) • Cytotoxicité pour les IMR90 et les BEAS-2B • Formation intracellulaire de ROS mais avec un décalage dans le temps • Pas de formation d'adduits à l'ADN (8-OHdG) 	Bhattacharya et al., 2009
Fe₂O₃-NPs (Comparaison avec des microparticules : Fe₂O₃-PM)	<100 nm (NPs)	BEAS 2B IMR-90	Milieu de culture : • Defined keratinocyte serum free medium (D-KSFM), antibiotiques (BEAS-2B) • RPMI 1640, glutamine, NEAA, SVF (IMR90) 10-250 µg.ml ⁻¹ 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires • Cytotoxicité pour les BEAS-2B • Augmentation de la mort cellulaire • Génotoxicité (Test des comètes) plus importantes pour les IMR90 que les BEAS-2B • Augmentation importante des ROS pour les BEAS-2B • Effets des nanoparticules plus importants que les effets des microparticules de même composition chimique 	Bhattacharya et al., 2012

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
LMH (Layered metal hydroxide nanoparticle = $Mg_{0.68}Al_{0.32}(OH)_2(CO_3)_{0.16} \cdot 0.1H_2O$) Fe-NPs Silica-NPs SWCNT	LMH : 200 ± 15 nm Fe-NPs : 20–30 nm, Silica-NPs : 14 nm, SWCNT : diamètre de 1,2–1,5 nm, et longueur supérieure à $2,5 \mu m$	<u>Cellules pulmonaires</u> : A549 et L-132 (cellules normales) <u>Autres types cellulaires</u> : HeLa (cervical denocarcinoma) Et HOS (osteosarcoma cells)	Milieu de culture <250 $\mu g \cdot ml^{-1}$ et 250 à 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 48-72h	<ul style="list-style-type: none"> Effets des LMH : <ul style="list-style-type: none"> Peu d'effets sur la prolifération et la viabilité cellulaire sur les 4 lignées (48h à $<250 \mu g \cdot ml^{-1}$) 72h de 250 à 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$: induction d'une inflammation, d'un stress oxydant et de dommages membranaires au niveau des lignées cancéreuses (A549>HOS>HeLa). Résultats différents pour les autres NPs : <ul style="list-style-type: none"> Fe-NPs : mort cellulaire avec dommages membranaires SWCNTs : stress oxydant par apoptose Si-NPs : inflammation sans mort cellulaire pour les 4 lignées cellulaires LMH : pas d'effet cytotoxique sur les L-132 (réponse inflammatoire, stress oxydant, dommages membranaires) à une concentration $<250 \mu g/ml$ et peu de ROS produits Ces résultats montrent une sélectivité des cellules cancéreuses face à la toxicité des LMH. 	Choi et al., 2009 (Nanomédecine)
TiO₂-NPs	5 préparations de TiO ₂ -NPs : <ul style="list-style-type: none"> Rutile_9 nm (R9) Rutile_5 nm (R5) Anatase_14 nm (A14) Anatase_60 nm (A60) P25 : 80% d'anatase et 20% de rutile 	Lignées cellulaires : A549 et BEAS-2B Cultures primaires : NHBE	NPs préparées dans le PBS et déposées dans le milieu de culture (BEGM) 5-500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 2h-24h	<ul style="list-style-type: none"> Effets P25 : augmentation de ROS et une sécrétion d'IL8 dans les trois types cellulaires Effets NPs de rutile et anatase pures : <ul style="list-style-type: none"> augmentation de ROS et d'IL8 dans les A549 augmentation des ROS mais pas d'IL8 dans les BEAS-2B Effets des pures TiO₂-NPs : <ul style="list-style-type: none"> relargage de médiateurs de l'inflammation (IL6, G-CSF, VEGF) dans les NHBE mais pas au niveau des 2 lignées cellulaires 	Ekstrand-Harmanström et al., 2012

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
NPs de Silica : Fumed silica-NPs Porous silica-NPs	Fumed silica-NPs (7 nm) Porous silica-NPs (5-15 nm)	BEAS-2B	Milieu de culture : DMEM/F12, 10% SVF, antibiotiques 1 mg.L ⁻¹ 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires • Effets des Silica-NPs : <ul style="list-style-type: none"> • Formation de ROS • Induction des enzymes du stress oxydant : heme oxygenase 1 (HO-1) mais pas des SOD • Les études des facteurs de transcription NF-κB/nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf-2)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) ont montré que les silica-NPs ont entraîné une toxicité via un stress oxydant au travers HO-1 et via la voie du Nrf-2-ERK-MAPK • Les cellules sont plus sensibles au porous silica-NPs que aux fumed silica-NPs 	Eom et Choi, 2011
PVP coated Ag-NPs	PVP : Poly Vinyl pyrrolidane 30-50 nm	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 1% SVF, antibiotiques 0-20µg.ml ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des NPs au niveau cellulaire • Cytotoxicité dose-dépendante (Tests MTT et annexinV/propidium iodide) • Augmentation des ROS et des dommages membranaires • Augmentation de l'apoptose et des adduits à l'ADN 	Foldberg et al., 2011
NPs de fer cobalt (Co-Fe-NPs)	Forme non sphérique	Cellules pulmonaires humaines : A549 NCIH441 Autres cellules : Coupes de cellules de poumons de rats, Lignées cellulaires HepG2 (foie), Lignées cellulaires MDCK (reins), Lignées cellulaires Caco-2 TC7 (intestins), TK6 (lymphoblastes) Cellules dendritiques primaires souris	Milieu de cultures (pour les cellules pulmonaires) : RPMI 1640, L-glutamine, 10% SVF, pénicilline et streptomycine 0,05-1,2 mM soit 23,5 à 282 µg/ml ⁻¹ 24h-72h	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du stress oxydant dépendant du type cellulaire • Corrélation entre cytotoxicité et stress oxydant • Sensibilité des cellules : TK6> Coupes de poumons> NCIH441> Caco-2 = MDCK> A549> HepG2 = cellules dendritique • La corrélation observée entre le stress oxydatif causé par la présence de la Co-Fe-NPs, avec la hiérarchie de la sensibilité des différents types cellulaires, suggère que le stress oxydant est un mécanisme possible de la toxicité de Co-Fe-NPs. 	Horev-Azaria et al., 2013

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
nZVi (nanoparticules de fer) (Fe(II) : fer ionique)	/	16HBE	PBS 0-300 µM 1h	<ul style="list-style-type: none"> • Une exposition à des nZVi et à une concentration équivalente de Fe(II) entraîne une diminution de la viabilité de manière dose-dépendante et une augmentation des ROS • Cette étude démontre que la présence de fer oxydé entraîne une production d'oxydants et donc des problèmes au niveau des cellules pulmonaires. • Induction d'une autophagie dans les A549 mais pas dans les IMR-90 • Cytotoxicité au niveau des A549 mais pas au niveau des IMR-90 (intérêt en nanomédecine) : <ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'ATP, augmentation du potentiel membranaire des mitochondries et augmentation des ROS 	Keenan et al., 2009
Fe-NPs	Oxyde de fer 51 ± 14,7 nm (30 à 65 nm)	A549 IMR90	Milieu de culture 10-100 µg.ml ⁻¹ 1h-24h	<p>Mort des cellules des cancéreuses A549 par nécrose et induisant une autophagie par la voie Akt-AMPK-mTOR provoquée par la production de ROS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des NPs au niveau cellulaire par vésicules d'endocytose dans le cytoplasme et au niveau nucléaire • Dommages à l'ADN (test des comètes) et formation de micronoyaux de manière dose-dépendante • Les SOD protégeraient des effets génotoxiques • L'augmentation des ROS serait un facteur important dans l'induction des effets génotoxiques. 	Khan et al., 2012 (Nanomédecine)
Ag-NPs	43-260 nm	BEAS-2B	Milieu de culture 0,01-10 µg.ml ⁻¹ 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires par endocytose au niveau cytoplasmique mais pas au niveau du noyau • Augmentation des ROS après 24h d'exposition • Effets génotoxiques (test micronoyaux et test des comètes) après respectivement 24h et 4h d'exposition • Activation des c-Jun-Terminal Kinases (JNK) sans augmentation du facteur NF-κB mais avec une dégradation décalée du I κB. 	Kim et al., 2011
Fe₃O₄-NPs	20-60 nm	A549	Préparation des NPs dans du milieu sans sérum Exposition dans RPMI avec 10%SVF, L-glutamine et pénicilline et streptomycine	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de diminution de la viabilité • Pas d'effets sur les marqueurs du stress oxydant (au niveau des transcrits) : heme oxygenase 1 (HMOX-1), SOD-2, glutamate-cysteine synthetase, catalytic subunit (GCS) • Mais augmentation de marqueurs pro-inflammatoires (IL8, IL6, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) 	Konczol et al., 2011
ZnO-NPs	24-71 nm	A549	Exposition en cultures classiques et en cultures en interface air-liquide (IAL)	<ul style="list-style-type: none"> • Exposition en cultures classiques et en cultures en interface air-liquide (IAL) • 0,7-2,5 µg.cm⁻² 	Lenz et al., 2013

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
Low solubility-low toxicity particles (LSLTP)	NPs (surface spécifique en $m^2 \cdot g^{-1}$): TiO ₂ -NPs : 50,6 Noir de Carbone – CB-NPs : 254 DQ-Quartz : 10,1 Cobalt – Co-NPs : 36,2 Nickel – Ni-NPs : 36,9 (Comparaison avec des microparticules) <u>Microparticules</u> (surface spécifique en $m^2 \cdot g^{-1}$): BaSO ₄ : 3,68 TiO ₂ : 6,64 CB : 7,92	A549	DMEM sans SVF 15 à 250 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 4h à 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Réponses pro-inflammatoires plus importantes suite à une exposition à des TiO₂-NPs et CB-NPs que pour les fines particules de même composition à masse identique • Stress oxydant confirmé par la diminution de GSH pour toutes les NPs et les microparticules • Inflammation plus importante suite à une exposition à des DQ-Quartz que à des LSLTP • Mise en évidence d'une relation dose-effet 	Monteiller et al., 2007
	CeO-NPs	NPs d'Oxyde de cérium 15 nm 25 nm 30 nm 45 nm	BEAS-2B	Milieu de culture : DMEM/F12, 1% SVF, pénicilline et streptomycine 5-40 $\mu g \cdot ml^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des NPs au niveau cellulaire • Induction d'une mort cellulaire • Augmentation des ROS • Diminution du GSH • Induction de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant : HO-1, CAT, glutathione-S-transférase, thioredoxine réductase • Les ROS induiraient l'activation des casp3 cytosoliques et une condensation de la chromatine
NPs de dolomite	39 ± 18 nm Diamètre hydrodynamique : 122± 28 nm (Comparaison avec des microparticules)	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 1% SVF, pénicilline et streptomycine 100-400 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 24h-72h	<ul style="list-style-type: none"> • Effets plus importants des NPs par rapports aux microparticules • Effets dose et temps dépendants : • Diminution de la viabilité cellulaire et du GSH • Augmentation des dommages membranaires, des ROS, du MDA et de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL6) • Effets génotoxiques par induction de micronoyaux 	Patil et al., 2012

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
ZnO-NPs	50 nm agglomération dans le milieu de culture	L-132	Milieu de culture : DMEM/F12, 1% SVF, pénicilline et streptomycine 5-100 µg.ml ⁻¹ 24h	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la viabilité de manière dose-dépendante • Modification de la morphologie par rétrécissement des cellules, condensation nucléaire et formation de corps apoptotiques • Diminution du GSH • Augmentation des ROS, de la fragmentation de l'Adn et de l'expression des gènes des métallothionéines • Corrélation entre résultats <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> concernant le cytotoxicité et l'inflammation induite • Résultats <i>in vivo</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Fe-NPs : peu effets • SC-NPs : inflammation et cytotoxicité • As-NPs : inflammation réversible et transitoire • ZnO-NPs et ZNO-PM : inflammation réversible un mois après l'exposition • Résultats cytotoxicité <i>in vitro</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Variabilité de réponses surtout à des doses élevées • Dosage LDH : les cellules L2 sont plus sensibles, et la cytotoxicité est plus importante suite à une exposition à des ZnO-NPs ou ZnO-PM par rapport à des SC-NPs ou AS-NPs • Les macrophages se sont révélés résistants • Les résultats des cocultures reflètent les résultats des cellules épithéliales. • Résultats inflammation <i>in vitro</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Pas de production de cytokines (MIP-2) par les cellules L2 • Suite à une exposition des macrophages (et dans une moindre mesure les cocultures) à des CS-NPs et des AS-NPs : sécrétion ces facteurs chimiotactiques • Mesure de TNFα dans le milieu de cultures témoignant une petite activité inflammatoire • Pour les co-cultures : sécrétion IL6 suite à une exposition à des CS-NPs, AS-NPs et ZnO-NPs 	Sahu et al., 2013
Carbonyl iron (Fe-NPs)		Comparaison études <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>			
Crystalline Silica (SC-NPs)		<i>In vivo</i> : rats - Male CrI:CD (SD)IGS BR	<i>In vivo</i> : instillation intratrachéale 1-5mg.kg ⁻¹ 24h-3 mois		
Precipitated amorphous silica (AS-NPs)	90 à 500 nm	<i>In vitro</i> : Cultures de cellules épithéliales pulmonaires de rats L2 Macrophages alvéolaires primaires	<i>In vitro</i> : cultures cellulaires classiques et cocultures Exposition dans le milieu de culture 0,0052-520 µg.cm ⁻² 1h-48h		Sayes et al., 2007
ZNO-PM (microparticules)					

Nanoparticules	Caractéristiques	Types cellulaires	Voies d'exposition	Effets	Références
Ag	5639 ± 10,6 nm Diamètre hydrodynamique : 272 nm	A549	Milieu de culture : DMEM/F12, 1% SVF, pénicilline et streptomycine 5-100 µg.ml ⁻¹ 24h-48h	<ul style="list-style-type: none"> • Cytotoxicité dose et temps dépendant mis en évidence par les tests MTT et LDH • Induction d'un stress oxydant dose et temps dépendants indiqué par : <ul style="list-style-type: none"> • Diminution du GSH • Une augmentation des ROS, du MDA, des SOD et des CAT • Induction des caspases 3 et 9 et de facteurs pro-inflammatoires comme les IL-1β et IL-6 • Production de dommages à l'ADN (Test des comètes) • Observations d'altérations morphologiques 	Suliman et al., 2013
CuO-NPs	/	A549	Milieu de culture : F12 Ham Kaighn's modified medium, 10% SVF, L-glutamine, pénicilline et streptomycine 10-100 mg.l ⁻¹ 6h-48h	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité des NPs plus importante que celle des PM • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires et dans les organites par endocytose • Diminution de la viabilité cellulaire • A 15 mg.l⁻¹, dommage au niveau des mitochondries via la production de ROS ; surexpression des gènes p38 et p53 et dommages à l'ADN (test des comètes) • Exportation des NPs au niveau extracellulaire • Dissolution des CuO-NPs et production d'ions Cu²⁺ responsables pour la moitié de la toxicité totale des CuO-NPs. 	Wang et al., 2012
NPs magnétiques de Fe₃O₄ (MgNPs-Fe₃O₄)	Agglomération des NPs dans le milieu	A549	Milieu de culture : Ham's F-12 Medium, 10% SVF, pénicilline et streptomycine 10-100 mg.l ⁻¹ 12h-24h	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des nanoparticules au sein des cellules pulmonaires • Dommage membranaire seulement à haute concentration (100 mg.l⁻¹) • A faible concentration (10 mg.l⁻¹) : <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des ROS, • Formation d'adduits à l'ADN (8OHdG), • Diminution du GSH • Augmentation de la glycoprotéine de surface CD44+ (impliquée dans l'adhésion cellulaire, les processus inflammatoires, etc.) dose dépendante • Augmentation du gène HO-1 suite à une exposition à 1 mg.l⁻¹ dose dépendante • Malgré ces effets : effets minimales sur la viabilité et faible augmentation du nombre de cellules en apoptose 	Watanabe et al., 2013

De nombreux sites industriels émettent, non-intentionnellement, depuis des années des particules ultra-fines dans l'air. De nombreuses questions se posent sur leurs effets sur les écosystèmes et la santé humaine. Dans ce contexte, nous avons axé nos recherches autour de nanoparticules de fer manufacturées (Fe-NP), représentatives de celles que l'on retrouve dans les fumées des industries métallurgiques dunkerquoises et nous avons mené en parallèle des études d'écotoxicité et de toxicité. L'objectif principal de ces recherches était d'étudier l'impact de Fe-NP manufacturées exposées par voie aérienne sur deux modèles biologiques : *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. et des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC). Pour répondre à ces objectifs, nous avons dû passer par l'étape indispensable qu'est la caractérisation fine de notre modèle de NP. En effet, la caractérisation physico-chimique doit être la plus complète possible (8 paramètres) de façon à déterminer, au préalable, leurs propriétés de surface. Puis, nous avons vérifié leur pénétration au sein de nos modèles biologiques. Puis, des biomarqueurs liés au stress oxydant ont été dosés chez la bryophyte, exposée à des concentrations faibles en Fe-NP. Premièrement, aucune perte de vitalité chez notre plante n'a pu être observée au cours du temps aux doses testées. Nos études n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation significative des espèces réactives de l'oxygène et du malondialdéhyde ; ainsi qu'une modulation significative du ratio GSSG/GSH, même si un phénomène de « sur-compensation » peut être évoqué sur le long terme, conduisant à la production de GSH au sein de notre plante témoignant d'une adaptation de la plante au stress. Enfin une analyse toxicogénomique a montré des modulations de l'expression (non significatives) de tous les isoformes des gènes d'intérêt étudiés aux doses testées. Dans le cadre d'études de toxicité, nous avons caractérisé notre modèle cellulaire par coloration immunocytoologique. Puis, un test de viabilité nous a permis de choisir notre dose d'exposition : $2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Les travaux sur le stress oxydant et la modulation de l'expression génique ont été réalisés sur des cultures de cellules issues de trois patients différents pour prendre en compte la variabilité interindividuelle. Contrairement à certaines publications, nous n'avons pas montré une augmentation dose-dépendante des ROS. Puis, notre étude pangénomique, nous a permis de sélectionner 10 gènes d'intérêt dont l'étude approfondie a mis en évidence des effets précoces (dès 6 h d'exposition) sur des gènes impliqués dans des phénomènes inflammatoires. Néanmoins, les Fe-NP n'ont pas causé d'augmentation significative du MDA et du ratio GSSG/GSH après plusieurs jours d'exposition. Suite à ces résultats, il est maintenant envisageable de mener des recherches sur les impacts des nanoparticules d'origine environnementale à l'aide de nos deux modèles biologiques et d'améliorer les connaissances concernant leur danger potentiel pour l'environnement et la santé humaine.

Mots clés : nanoparticules, bryophytes, cultures primaires, cellules bronchiques humaines, écotoxicologie, toxicologie

Characterization and toxicity of engineered iron nanoparticles on *Physcomitrella patens* Hedw. Bruch & Schimp. and human bronchial epithelial cells (HBEC): towards use in biomonitoring of airborne nanoparticle contaminants

Many industries emit, unintentionally, ultra-fine particles in the air, for many years. Many questions arise about their effects on ecosystems and human health. In this context, we focused our research on the iron-engineered nanoparticles (Fe-NP), representative of industrial smoke emitted by metallurgical industries and we conducted, in parallel, toxicity and ecotoxicity studies. The main objective of this work was to study the impact of Fe-NP exposed by air in two biological models: *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. and primary cultures of human bronchial epithelial cells (HBEC). To meet these objectives, we had to characterize our NP model. Indeed, the physico-chemical characterization must be as complete as possible (8 parameters) to determine, firstly, their surface properties. Then, we checked their penetration within our biological models. And, oxidative stress biomarkers were measured in the bryophyte, exposed to low concentrations of Fe-NP. Firstly, any loss of vitality could be observed over time at the doses tested. Our studies have failed to demonstrate a significant increase of reactive oxygen species and malondialdehyde, and a significant modulation of the ratio GSSG/GSH, although the phenomenon of "over-compensation" can be discussed, over the long term, leading to the production of GSH in our plant showing a plant adaptation to stress. Finally a toxicogenomic analysis showed modulation of expression (not significant) of all isoforms of the genes of interest studied at the doses tested. For toxicity studies, we characterized our cellular model by immunocytoological staining. Then, a viability test allowed us to choose the exposure dose: $2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. The research on oxidative stress and the modulation of gene expression were performed on cells derived from three different patients to take into account individual variability. Unlike some publications, we did not show a dose-dependent increase of ROS. Then, the pangenomic study has allowed us to select 10 genes. A detailed study of this genes showed early effects (from 6 h of exposure) in genes involved in inflammation. However, Fe-NP did not cause any significant increase of MDA and GSSG/GSH ratio after several days of exposure. Following these results, it is now possible to conduct research on the impacts of ultra-fine particles using our two biological models and improve knowledge about their potential danger on the environment and human health.

Key words : nanoparticles, bryophytes, primary cultures, human bronchial cells, ecotoxicology, toxicology